

Reivindicaciones

1. Un método para el aislamiento y purificación de colágeno II a partir de tejido cartilaginoso que comprende:
 - a. Remover del cartílago el tejido adyacente no cartilaginoso con una herramienta cortopunzante
 - b. Cortar el cartílago en trozos de 0,5 a 1 cm³
 - c. Lavar el cartílago con una mezcla de un solvente polar en agua durante 15 a 25 horas en serie ascendente de concentración desde una concentración inicial de 50% hasta una de 100%, donde el solvente polar se selecciona de etanol, propanol, isopropanol, dimetil éter, éter etílico y acetona.
 - d. Lavar con agua por 5 a 10 horas tres veces.
 - e. Tratar el cartílago lavado con una solución de una proteasa entre 0,01 a 1% en pH 3 a 8, por 20 a 30 horas, donde la proteasa se selecciona de tripsina, papaína, pancreatina, quimotripsina A, quimotripsina B, pancreatopeptidasa B, ficina, catepsina y quimopapaina.
 - f. Homogenizar la suspensión de cartílago/enzima, con un mezclador de aspas entre 500 a 5000 rpm por 5 a 30 min.
 - g. Lavar el pellet con agua por 1 a 5 horas.
 - h. Agitar la mezcla a 4 a 35°C por 20 a 35 horas en un agitador orbital entre 60 a 100 rpm
 - i. Centrifugar la mezcla de 3000 a 5000 rpm por 15 a 45 min
 - j. Tratar el pellet con una solución de pepsina 0,01 a 1% p/v en pH 2 a 3 usando ácido acético o ácido clorhídrico, por 20 a 30 horas.
 - k. Centrifugar la mezcla de 3000 a 5000 rpm por 15 a 45 min
 - l. Lavar con agua por 5 a 10 horas tres veces.
 - m. Resuspender en ácido acético 0,25 a 0,75M en agitación por 20 a 40 horas.
 - n. Centrifugar la mezcla de 3000 a 5000 rpm por 15 a 45 min y desechar el pellet.
 - o. Adicionar al sobrenadante NaCl hasta alcanzar una concentración entre 0,5 a 1M agitando por 20 a 30 horas.
 - p. Lavar el precipitado obtenido con agua por 5 a 10 horas.
 - q. Adicionar una base fuerte hasta alcanzar un pH 4 a 6, la base fuerte se selecciona de NaOH, KOH y NH₃.
 - r. Lavar con agua por 5 a 10 horas tres veces.
 - s. Resuspender el pellet en una solución ácida de 0,01 a 1 M, el ácido se selecciona entre ácido acético o ácido clorhídrico.
2. Soportes biocompatibles elaborados con colágeno tipo II de la reivindicación 1 caracterizados porque tiene una porosidad entre 93 - 98%, resistencia a la tensión 0,05 – 0.15 MPa y capacidad de absorción de agua entre 500 y 1200%.

ELABORACIÓN DE SOPORTES DE COLÁGENO II A PARTIR DE TRÁQUEA BOVINA

SECTOR TECNOLÓGICO DE LA INVENCION

La presente invención resuelve los inconvenientes asociados con las bajas propiedades mecánicas del colágeno tipo II basando la digestión enzimática del cartílago bovino en una proteasa, logrando que los soportes elaborados con este biomaterial tengan una mayor capacidad de absorber y mantener agua en su interior conservando propiedades básicas necesarias para su uso en ingeniería de tejidos, como son una alta porosidad y biocompatibilidad.

ESTADO DE LA TÉCNICA

El cartílago articular está permanentemente expuesto a fuerzas de compresión y tensión mecánica, lo cual lo hace vulnerable a lesiones que resultan en enfermedades crónicas degenerativas como la osteoartritis (*Hardmeier et al., 2009, J Tissue Eng Regen Med*). Por ser un tejido avascular, el cartílago cuando se daña no se repara; por eso, las lesiones del cartílago requieren intervenciones quirúrgicas. Actualmente, la técnica de microfractura es la más usada en el tratamiento de las lesiones condrales, ya que se puede realizar mediante cirugía artroscopia mínimamente invasiva. Una vez se identifica la lesión, se cepillan sus bordes con un rasurador y los fragmentos de cartílago resultantes se remueven para crear un lecho limpio en el lugar del defecto. Luego, el hueso subcondral del lecho preparado en la limpieza es microperforado varias veces para que sangre y se forme un coágulo; el cual, contiene células mesenquimales capaces de diferenciarse a condrocitos y de generar nuevo cartílago. El principal inconveniente de éste procedimiento es que el neo-cartílago no presenta las mismas características mecánicas e histológicas del tejido hialino original. El nuevo tejido está constituido por una mezcla de colágeno I y II, se denomina fibrocartílago y presenta propiedades mecánicas inferiores a las del cartílago hialino original (*Matsiko et al., 2013, Materials*). Los injertos de cartílago propio o de donante de la misma u otra especie (auto, alo y xenoinjertos), también son utilizados en el tratamiento de las lesiones condrales. Presentan limitaciones, que en el autoinjerto tienen que ver con la poca disponibilidad de tejido donante y la morbilidad que se produce en el sitio donante (*Chiang & Jiang 2009, J Formos Med Assoc*). Cuando se trata de homo y xenoinjertos existe riesgo de infección y puede haber la posibilidad de que se presente rechazo inmunológico (*Puppi et al., 2010, Prog Polym Sci*).

Por las razones expuestas, se han explorado otros tratamientos; entre los que se encuentra la implantación de condrocitos autólogos (ACI). El primer reporte de esta técnica describió el aislamiento y cultivo de condrocitos a partir de cartílago sano del paciente y la posterior inyección de los mismos en las áreas defectuosas. Dos años después de efectuado el procedimiento, en 11 de 15 pacientes con trasplante femoral y 1 de 7 pacientes con trasplante patelar, se encontró cartílago hialino (Brittberg et al., 1994, *N Engl J Med*). Éste procedimiento tiene como desventajas la doble intervención, la morbilidad causada en el sitio donante y los riesgos de volver a colocar células que aunque propias, han sido cultivadas sobre superficies que inducen su dediferenciación; lo cual, puede resultar en pérdida de condrocitos después de la implantación (*Matsiko et al., 201, Materials; Haleem & Chu, 2010, Oper Tech Orthop*). Lo anterior ha llevado a desarrollar matrices o soportes, de origen natural y sintético, capaces de proporcionar un ambiente adecuado para la adhesión, proliferación y diferenciación celular.

Los biomateriales naturales evaluados han sido el ácido hialurónico, cuyos productos de degradación han demostrado ser citotóxicos (*Knudson et al., 2000*); el alginato y la agarosa que han mostrado pobres propiedades mecánicas y baja biocompatibilidad (*Chiang & Jiang; 2009, J Formos Med Assoc*); la fibrina con bajas propiedades mecánicas (*van Susante et al; 1999, Biomaterials*) y capaz de desencadenar respuesta inflamatoria (Kawabe & Yoshinao; 1991, *Clin Orthop Relat Res*). Finalmente, el colágeno II, que por su biocompatibilidad es el biomaterial más utilizado.

Entre los materiales de origen sintético utilizados en estudios preclínicos se encuentran el ácido poliláctico (PLA), el ácido poliglicólico (PLGA) y sus copolímeros (PLA/PLGA). Desafortunadamente, tienen el inconveniente de que los productos de su degradación pueden causar inflamación y muerte celular (*Matsiko et al; 2013, Materials; Nesic et al 2006, Adv Drug Deliv Rev*).

En el mercado existen productos aprobados por agencias regulatorias de otros países, como la FDA, para uso humano; entre ellos Carticel®, Biocart™ y BioSeed®-C. Carticel®, primera terapia celular autóloga aprobada por la FDA en el año de 1997, es un producto que contiene condrocitos autólogos cultivados. Está indicado en el tratamiento de lesiones sintomáticas del cartílago del cóndilo femoral, que no incluyen a la osteoartritis generalizada. Solamente puede ser aplicado por cirujanos que hayan completado el programa de entrenamiento en biocirugía establecido por Genzyme, la compañía que lo patenta y produce. Biocart™ Autologous Cartilage Regeneration System es producido por PROCHON Biotech LTD. Es un sistema de regeneración de cartílago

conformado por condrocitos autólogos, provenientes de cartílago sano tomado de zonas que no soportan peso, que después de ser expandidos *in vitro* en presencia del factor de crecimiento FGF2v son cultivados en un soporte tridimensional poroso. Los dos, el factor de crecimiento y el soporte son productos patentados por ésta compañía. Después de su cultivo, el sistema es empacado en condiciones de esterilidad y suministrado a cirujanos que hacen parte del sistema clínico de Biocart, quienes han sido entrenados en el manejo y procedimiento quirúrgico de implantación del producto mediante cirugía artroscópica (<http://www.lonza.com/about-lonza/media-center/news/2009/prochon-biotech-selects-lonza.aspx> Revisado el 04/04/2016). BioSeed®-C, es un sustituto de cartílago constituido por un soporte tridimensional sembrado con condrocitos autólogos expandidos *in vitro*. El soporte está hecho con ácido poliglicólico o poliglactina 910 y poli-p-dioxanona que contiene un adhesivo de fibrina, denominado Tisseel o Tissucol Duo; en él, se siembran y cultivan los condrocitos autólogos previamente expandidos *in vitro* (http://www.biotissue.de/documents/BC%20Guidelines%20EN_Nov11.pdf. Revisado el 04/04/2016).

Neocart® es un producto diferente a los mencionados, porque es elaborado con condrocitos autólogos que han sido cultivados *in vitro* en condiciones que permiten la formación de tejido similar al cartílago hialino; el cual, una vez obtenido se implanta en el sitio de la lesión. Actualmente, se encuentra en estudios clínicos fase III (<http://www.neocartimplant.com/neocart>. Revisado en 04/04/2016). Finalmente, Chondrotissue® es un soporte tridimensional libre de células que se implanta en la zona lesionada y proporciona una matriz para que las células mesenquimales que llegan al sitio después de realizar una microfractura proliferen, se adhieran, diferencien y recambien el soporte por cartílago hialino (<http://biotissue.ch/chondrotissue/patients/chondrotissue/> Revisado el 04/04/2016)

Ante la posibilidad de implantar soportes solos y dada la experiencia en ingeniería de tejidos y en el aislamiento de colágeno I y elaboración de soportes tridimensionales con éste biomaterial, se buscó establecer una metodología de aislamiento de colágeno II con el que se puedan elaborar soportes tridimensionales que puedan ser empleados en el tratamiento de lesiones de cartílago articular.

La familia de proteínas del colágeno, es la más abundante en la matriz extracelular de los tejidos conectivos de los vertebrados. Su uso como biomaterial se debe a que por ser proteínas altamente conservadas en mamíferos son biocompatibles, biodegradables, poco vistas por el sistema inmune

y con características químicas que promueven la adhesión, diferenciación y proliferación celular (*Parenteau-Bareil et al., 2010, Materials*). El colágeno II es el principal componente de cartílago articular; es empleado como material para ingeniería de tejido cartilaginoso (*Matsiko et al., 2013, Materials*), ya que cuando se usa para cultivar condrocitos estos mantienen su fenotipo y su capacidad de sintetizar componentes de la matriz extracelular de cartílago (*Nehrer et al; 1997, J Biomed Mater Res (Appl Biomater); Pieper et al; 2002, Biomaterials; Gigante et al; 2003, J Mater Sci Mater Med*). El colágeno II, también induce la diferenciación condrogénica de células madre mesenquimales (*Bosnakovski et al; 2005, Biotechnol Bioeng*). Los condrocitos y células madre mesenquimales sembradas sobre soportes de colágeno I tienden a tomar una morfología fibroblastoide (*Hardmeier et al., 2010, J Tissue Eng Regen Med*), produciendo colágeno tipo I en lugar de colágeno tipo II y convirtiendo a la matriz extracelular en una red fibrótica que pierde sus características elásticas y amortiguadoras (*Aigner & Stove, 2003, Adv Drug Deliv Rev*).

Métodos reportados de extracción de colágeno tipo II usan tejidos como el cartílago articular de rodilla porcina (CN103352063), el cual es difícil de procesar debido a su espesor y a la manera tan firme en que está integrado al hueso, por lo tanto de esta fuente se obtiene menos materia prima y con la probabilidad de presentar contaminantes de tejido adyacente. Muchos de los procedimientos reportados utilizan clorhidrato de guanidina como agente caotrópico para eliminar los proteoglicanos (CN103352063, CN105132502, CN103341211), lo cual implica más procesos de lavado, para asegurar su eliminación debido a la toxicidad de esta sal. Por otra parte, la pepsina es ampliamente usada para liberar el colágeno de la matriz extracelular del cartílago (CN103352063, CN105132502, CN103341211), lo cual está asociado a la disminución del peso molecular del colágeno debido a la eliminación de los telopéptidos, disminuyendo las propiedades mecánicas de este biomaterial como lo encontramos al desarrollar la metodología de esta solicitud. Muchos procesos de purificación de proteínas hacen uso de la diálisis (CN103352063, CN105132502, CN103341211), un proceso que elimina moléculas de bajo peso molecular que es bastante costoso e implica largos tiempos de operación, lo cual nos llevó a reemplazar este proceso por ciclos de lavado y centrifugación.

La presente invención resuelve los inconvenientes asociados con las bajas propiedades mecánicas del colágeno tipo II obtenido por métodos convencionales, el cual puede ser empleado en la elaboración de soportes para uso en ingeniería de tejidos, donde es importante que soporte esfuerzos mecánicos. Además, los soportes elaborados con este biomaterial tienen una mayor

capacidad de absorber y mantener agua en su interior y conservan propiedades básicas necesarias para su uso en ingeniería de tejidos como los son una alta porosidad y biocompatibilidad.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** presenta la **Porosidad de los soportes** de colágeno obtenidos con los tratamientos tripsina y tripsina-pepsina. Control (■), 0,05% genipina (■), 0,1% de genipina (■).

En la **Figura 2** se representa la **Capacidad de absorción de agua de los soportes en función de la concentración del genipina**. Los soportes son los obtenidos con el tratamiento tripsina después de inmersión en agua desionizada a 32°C durante 24 h (■) y 48h (■) y el tratamiento tripsina-pepsina después de 24 h (■) y 48h (■).

En la **Figura 3** se grafica el **Módulo elástico de los soportes en función de la concentración de genipina**. Se muestran los datos del módulo de Young correspondientes a los soportes obtenidos con las metodologías tripsina (■) y tripsina-pepsina (■).

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Para desarrollar el procedimiento reivindicado se modificó sustancialmente una metodología de extracción de colágeno II basada en la digestión enzimática de cartílago bovino con tripsina (Steven and Thomas, 1973, Biochem. J), con el fin de mejorar la hidrofiliidad del producto final. Con tal propósito, se introdujeron etapas adicionales de desengrase, digestión enzimática y neutralización que no han sido reportadas en la literatura y que desembocaron en una nueva metodología. El colágeno II aislado con éste nuevo procedimiento es de mayor hidrofiliidad y solubilidad que el colágeno II aislado con la metodología tradicional; el cual, por su baja solubilidad no es empleado con frecuencia en aplicaciones de ingeniería de tejidos que requieran materiales hidrofílicos e hidrosolubles. El colágeno II obtenido con el nuevo procedimiento, es un biomaterial más versátil que el colágeno II tradicional ya que puede utilizarse sin mayores desafíos técnicos de manejo, en la fabricación de microesferas e hidrogeles de interés terapéutico.

La materia prima que se utiliza en la presente invención, proviene de tejido cartilaginoso de mamíferos; principalmente, tráquea bovina debido a su alto contenido de colágeno II. Para iniciar el procedimiento, con una herramienta corto-punzante se remueven los tejidos adyacentes a los anillos cartilaginosos de la tráquea bovina y éstos se cortan en fragmentos pequeños. Luego el

tejido es lavado con una mezcla de un solvente polar en agua en serie ascendente de concentración (desde una concentración inicial del 50% hasta el 100%), durante 15 a 25 horas; el solvente polar puede ser seleccionado de etanol, propanol, isopropanol, dimetil éter, éter etílico y acetona. Después, el tejido limpio debe lavarse con agua por 5 a 10 horas, tres veces. Una vez el cartílago esté limpio, debe ser cortado en pequeños trozos, lavado con éter para reducir impurezas lipídicas durante 20 o 30 horas, lavado con una serie ascendente de un solvente polar en agua (concentración inicial del solvente polar del 50% hasta el 100%) y lavado repetidamente con agua. Posteriormente, el tejido limpio debe ser congelado a -20°C hasta su utilización.

Con el fin de eliminar el contenido de proteoglicanos, el cartílago limpio se digiere con una proteasa entre 0,01 y 1% en un tampón fosfato salino PBS a un pH entre 3,0 y 8,0. La proteasa debe ser seleccionada de tripsina, quimotripsina A, quimotripsina B, pancreatopeptidasa B, cathepsina, papaína, quimopapaína y ficina. La suspensión resultante debe ser mezclada con un homogenizador de aspas para reducir el tamaño de partícula, con el fin de que se facilite la hidratación del tejido cartilaginoso. La suspensión resultante debe ser mantenida en agitación constante a una temperatura que debe estar entre 4°C y 35°C , durante 20 a 30 horas. Posteriormente, la suspensión debe centrifugarse a 3000 a 5000 rpm durante 15 a 45 minutos para recuperar el cartílago digerido no solubilizado. Luego, el sobrenadante es decantado y el pellet lavado con agua por una 1 a 5 horas y luego resuspenderlo en una solución ácida (pH de 2 a 3) de pepsina en una concentración entre 0.01 y 1% p/v. El ácido debe ser seleccionado entre ácido clorhídrico y ácido acético en concentraciones que varíen entre 0.1 y 1 M. La mezcla anterior debe ser mantenida en agitación constante a una temperatura entre 4°C y 35°C , durante 20 a 30 horas. Para recuperar la proteína colágena disuelta (Col TP), se debe centrifugar empleando las condiciones anteriormente descritas centrifugación y decantamiento del sobrenadante. El pellet se lava de forma repetida para remover completamente los residuos de la enzima. El Col TP es resuspendido en una solución de ácido acético entre 0,25M y 0,75M a un pH entre 2,4 y 3,2 y mantenido en agitación constante a una temperatura entre 4°C y 35°C durante 20 a 40 horas. Posteriormente, la suspensión obtenida se centrifuga entre 3000 a 5000 rpm durante 15 a 45 minutos para recuperar la proteína disuelta y desechar el pellet con las proteínas contaminantes no disueltas. Para aumentar su pureza, se precipita la proteína empleando sales haciendo *salting out*, mediante la adición de una sal neutra hasta una concentración entre 0,5 a 1,0 M y manteniendo en agitación por 20 a 30 horas; la sal neutra se selecciona de NaCl, KCl, AlCl_3 y NH_4Cl . El precipitado se lava con agua y se hace una reprecipitación de ColTP adicionando una base fuerte

hasta alcanzar un pH 4 a 6; la base fuerte se selecciona de NaOH, KOH y NH_3 . El pellet se lava con agua entre 3 a 5 veces retirar las sales, es precipitado lavado es resuspendido con una solución ácida de 0,1 a 1 molar, el ácido se puede seleccionar entre ácido acético o ácido clorhídrico.

EJEMPLOS DE APLICACIÓN PRÁCTICA

Ejemplo 1. Procesamiento del tejido

A anillos de tráquea bovina se les eliminan los tejidos adyacentes con un bisturí y el cartílago remanente es cortado en trozos de 0,5 a 1 cm^3 . Luego es lavado con etanol al 70% durante 24 horas, posteriormente con etanol al 96% durante 24 horas y finalmente, se hace un lavado con éter etílico por 24 horas. El cartílago limpio y deshidrato es lavado con etanol al 96% durante 24 horas y posteriormente con etanol al 70% durante 24 horas. El solvente es eliminado del tejido, mediante lavados con agua por 20 horas.

Ejemplo 2. Remoción de proteoglicanos

El tejido cartilaginoso obtenido del paso anterior es tratado con tripsina 0,02% en un tampón fosfato salino PBS pH 7,4 y sometido a un proceso de homogenización. La suspensión se mantiene en agitación a 4°C durante 24 horas. Se centrifuga a 5000 rpm durante 30 min. Finalmente, se realizan al menos tres lavados del pellet recuperado con agua desionizada por 1 a 5 horas.

Ejemplo 3. Disolución ácida y precipitación (Col T)

El cartílago tratado se resuspende en ácido acético 0,5 M pH 2,4 y se mantiene en agitación a 4°C durante 32 horas y posteriormente, se centrifuga a 5000 rpm durante 30 min. Al sobrenadante se adiciona una solución de cloruro de sodio NaCl 5M hasta alcanzar una concentración final de 0,8 M. La suspensión con la proteína precipitada se mantiene en agitación a 4°C durante 24 horas y después se centrifuga a 5000 rpm durante 30 min.

Ejemplo comparativo 4. Disolución ácida y precipitación (Col TP)

El pellet obtenido del ejemplo 2, es resuspendido en una solución de pepsina 0.04% p/v a pH 2,4 durante 24 horas. Luego se centrifuga a 5000 rpm por 30 min, se hacen dos lavados con agua y se resuspende en una solución de ácido acético 0,5 M en agitación por 25 horas. Al cartílago digerido enzimáticamente se adiciona NaCl hasta alcanzar una concentración 0,8M y se mantiene en agitación por 24 horas. Después se lava con agua por 5 a 10 horas y se adiciona NaOH hasta alcanzar un pH 4,5.

Ejemplo 5. Solubilización

Se realizan lavados del colágeno (Col T y Col TP) con agua desionizada hasta alcanzar una conductividad inferior a 200 μ S/cm (tres veces durante 5 a 10 horas). Finalmente, la suspensión obtenida se lleva a una concentración de 15mg/mL a pH de 2,4 adicionando ácido acético 0,5 M.

Ejemplo 6. Elaboración de soportes de colágeno tipo II

La concentración de la suspensión de colágeno tipo II (Col T y Col TP) se ajusta a 5 mg/mL con ácido acético 0,5 M y se sirve en moldes de teflón. La suspensión se desgasifica, se congela a -20°C por 24 horas y se liofiliza durante 48 horas. Los soportes se entrecruzan con genipina se evaluaron concentraciones de: 0%, 0,05% y 0,1% p/v en etanol al 70% durante 48 horas bajo agitación. Se elimina el exceso de entrecruzante realizando al menos tres lavados con etanol al 70% y agua desionizada. Finalmente, los soportes hidratados se congelan a -20°C durante 24 horas y liofiliza durante 48 horas.

Ejemplo 7. Porosidad

La porosidad de los soportes elaborados con colágeno II proveniente de cada uno de los métodos de aislamiento, fue similar y disminuyó al aumentar la concentración de genipina (**Figura 1**). En todos los casos los valores de porosidad siempre fueron mayores al 90%, lo cual sugiere que los soportes permiten el crecimiento de las células, su adecuada distribución en el interior del soporte y el intercambio de nutrientes y otras sustancias provenientes del medio (Zeltinger et al., 2001) .

Ejemplo 8. Capacidad de absorción de agua

Este ensayo permitió observar la capacidad de los soportes para absorber y mantener agua en su estructura, lo cual es una característica muy importante para la función del cartílago. (**Figura 2**). Todas las muestras mantuvieron su estructura durante la hidratación.

Ejemplo 9. Ensayo de tracción

La determinación del módulo de elasticidad de los soportes mediante el ensayo de tracción presentado en la (**Figura 3**), indica que los soportes elaborados con el colágeno aislado empleando tripsina-pepsina, tuvieron valores del módulo de Young menores que los soportes elaborados con colágeno aislado usando digestión con tripsina; indicando, que estos últimos tienden a deformarse en menor medida al estar sometidos al mismo esfuerzo. Este fenómeno puede estar relacionado con el comportamiento presentado por los soportes en los ensayos para determinar su estabilidad

térmica, que como se explicó está asociado a la disminución del peso molecular del colágeno debido al doble tratamiento enzimático y a la eliminación de los telopéptidos por parte de la pepsina.

Ejemplo 10. Ensayo de capacidad hemolítica

Se determinaron los valores de la capacidad hemolítica de los soportes (**Tabla 1**) y según la clasificación de materiales basada en el índice hemolítico de la ASTM F 756-00, 2000, se puede concluir que los soportes no son hemolíticos, ya que presentan un porcentaje de hemólisis entre 0 – 2%, indicando un alto grado de citocompatibilidad. Durante el proceso de extracción de la proteína y obtención de los soportes se retiraron efectivamente las moléculas que podrían generar respuestas adversas al entrar en contacto con la sangre (Guyton&Hall 2011, Kumar et al., 2010, Rojas et al., 2012).

Tabla 1. Valores de la capacidad hemolítica de los soportes.

Muestra		Hemólisis (%)
Tripsina	Control	0,31 ± 0,14
	Genipina 0,05%	1,05 ± 0,24
	Genipina 0,1%	0,30 ± 0,02
Tripsina-pepsina	Control	0,65 ± 0,07
	Genipina 0,05%	0,18 ± 0,09
	Genipina 0,1%	0,16 ± 0,02

Bogotá, 5 de octubre de 2017

Director

JOSÉ LUIS SALAZAR LÓPEZ

Dirección de Nuevas Creaciones

Delegatura para la Propiedad Industrial

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Carrera 13 No. 27-00

Asunto: NC2017/0007381

Respuesta al Oficio 11432 de 2017. Solicitud de Patente de Invención denominada "ELABORACIÓN DE SOPORTES DE COLÁGENO II A PARTIR DE TRÁQUEA BOVINA", antes titulada "Procedimiento de aislamiento y purificación de colágeno II a partir de tráquea bovina"

Solicitante: Universidad Nacional de Colombia

Respetado Director:

Por medio del presente, me permito dar respuesta al requerimiento de forma No. 11432 de 2017 respecto de la Patente de Invención titulada "ELABORACIÓN DE SOPORTES DE COLÁGENO II A PARTIR DE TRÁQUEA BOVINA" (antes titulada "Procedimiento de aislamiento y purificación de colágeno II a partir de tráquea bovina"), radicada bajo el número NC2017/0007381, en los siguientes términos:

1. Documento de cesión de derechos (respuesta al punto 1 del Oficio 11432 de 2017)

Con el fin de dar respuesta al oficio mencionado, me permito anexar el documento de cesión de derechos de los inventores al solicitante, respecto de la invención de la referencia.

Con base en lo anterior, se completan los requisitos de forma exigidos en los artículos 26 y 39 de la D. 486.

2. Documento Descriptivo (respuesta al punto 2 del Oficio 11432 de 2017)

Sobre el particular cabe indicar que se realizaron los cambios y aclaraciones sugeridos por el Examinador, de manera tal que la información descrita en el capítulo descriptivo corresponda a la información reclamada en las reivindicaciones.

Para lo anterior se presenta un nuevo capítulo descriptivo, con las modificaciones y aclaraciones mencionadas, divulgando así la invención de manera suficientemente clara y completa, tal como lo exige el artículo 28 de la D. 486.

3. Reivindicaciones (respuesta al punto 3 del Oficio 11432 de 2017)

Con el fin de dar respuesta a las observaciones realizadas por el Examinador de Patentes, me permito señalar que se realizaron los cambios y aclaraciones necesarias para que la información descrita corresponda a la materia reclamada. En virtud de lo anterior, se redactó nuevamente la reivindicación 1 de forma que la información se encuentre completamente soportada en la descripción.

Para lo anterior, se presenta un nuevo capítulo reivindicatorio, el cual consideramos se encuentra enteramente sustentado en la descripción, tal como lo requiere el artículo 30 de la D. 486.

4. Unidad de invención 'a priori' (respuesta al punto 4 del oficio 11432 de 2017)

Para resolver la observación realizada por el Examinador respecto de la falta de unidad de invención, se cambió el título del documento relacionando la elaboración de soportes de colágeno tipo II a partir de tráquea bovina. El título, así como la descripción, incluyen información que involucra el aislamiento y la purificación del colágeno tipo II a partir de tráquea bovina y cómo las condiciones y etapas de este procedimiento permiten obtener soportes con ciertas características definidas a partir de ciertas partes del proceso.

5. Cambio de título

Finalmente cabe señalar, que como consecuencia de los cambios realizados en el capítulo descriptivo y reivindicatorio, atendiendo las sugerencias realizadas por el Examinador, se solicita el cambio de título de la invención de: "Procedimiento de aislamiento y purificación de colágeno II a partir de tráquea bovina", a: "ELABORACIÓN DE SOPORTES DE COLÁGENO II A PARTIR DE TRÁQUEA BOVINA"

Todo lo anterior, con la finalidad de cumplir con la totalidad de los requisitos de forma fondo descritos, entre otros, en los artículos 26, 28, 30 y 39 de la Decisión Andina 486 de 2000.

Agradezco de antemano la atención prestada y la atenta colaboración en las gestiones requeridas.

Cordialmente,

LAURA VICTORIA CAMACHO CASTELLANOS

Apoderada Universidad Nacional de Colombia

C.C. No. 41.951.272 de Armenia

TP 136.043

Anexos: Documento de cesión, nuevo capítulo descriptivo y nuevo capítulo reivindicatorio.



CONTRATO DE CESIÓN

CELEBRADO ENTRE "LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA" DENOMINADA LA ENTIDAD CESIONARIA Y "MARTHA RAQUEL FONTANILLA DUQUE, MARÍA ELISA SOTO HERRERA, EDWARD BAUDILIO SUESCA QUINTERO, SERGIO ALEXANDER CASADIEGOS RINCÓN" DENOMINADOS LOS CEDENTES.

Entre los suscritos: **MARTHA RAQUEL FONTANILLA DUQUE**, mayor de edad, identificada con C.C No 41.659.245, en calidad de INVESTIGADORA PRINCIPAL y Profesora Titular del Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias; y **MARÍA ELISA SOTO HERRERA**, mayor de edad, identificada con C.C No 1.115.068.974, estudiante de la Maestría en Ingeniería Química; **EDWARD BAUDILIO SUESCA QUINTERO**, mayor de edad identificado con C.C No 79.996.280 y **SERGIO ALEXANDER CASADIEGOS RINCÓN**, mayor de edad, identificado con C.C No 80.037.160, en calidad de estudiantes asistentes de investigación; en adelante **LOS CEDENTES**; por una parte y por la otra, **JAIME FRANKY RODRÍGUEZ**, identificado con cédula de ciudadanía No. 19.343.653 de Bogotá, quien en su condición de Vicerrector de Sede nombrado mediante Resolución No. 561 del 13 de Junio de 2016 y acta de posesión No. 372 del 15 de Junio de 2016, actuando de conformidad con el Artículo 4 numeral 4 literal b, del Manual de Convenios y Contratos adoptado mediante Resolución de Rectoría No. 1551 del 19 de Diciembre de 2014, en nombre y representación de la Universidad Nacional de Colombia, ente universitario autónomo del orden estatal, vinculado al Ministerio de Educación Nacional de Colombia, regido actualmente por el Decreto 1210 de 1993, con domicilio en la Carrera 45 No 26 - 85, Edificio Uriel Gutiérrez de la ciudad de Bogotá D. C. - Colombia, y quien para los efectos del presente instrumento se denominará en adelante **LA UNIVERSIDAD** o **LA CESIONARIA**, hemos convenido celebrar el presente **CONTRATO DE CESIÓN** para dar cumplimiento a lo previsto en el literal k) del artículo 26 de la Decisión 486 de la CAN, previas las siguientes :

CONSIDERACIONES

1. La Dirección de Investigación de la Sede Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia realizó la Convocatoria "Proyectos de investigación, desarrollo, innovación y creación artística de la DIB" - Tercer Corte-2012.
2. La docente investigadora **MARTHA RAQUEL FONTANILLA DUQUE** presentó a la mencionada convocatoria la propuesta de investigación "*Elaboración y caracterización de soportes de colágeno tipo II*" con Código Hermes 14704, la cual fue aprobada y financiada.
3. De igual forma, El Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación - Colciencias realizó la Convocatoria 569-2012 "Para la Conformación de un Banco de Proyectos elegibles de investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, que contribuyan al fortalecimiento de las capacidades en CTeI del país".
4. La estudiante de Maestría en Ingeniería Química **MARÍA ELISA SOTO HERRERA**, aplicó a la convocatoria mencionada en el numeral anterior, con el trabajo de tesis denominado "*Estandarización de un método de purificación de colágeno tipo II y elaboración de soportes para ingeniería de tejido cartilaginoso*", bajo la dirección de la Profesora **MARTHA RAQUEL FONTANILLA DUQUE**. Dicho trabajo fue aprobado y financiado tras presentar la propuesta de "*Evaluación de condrogenesis en soportes de colágeno II y cartilago hialino descelularizados, sembrados con condrocitos*."
5. Dentro de las cláusulas de ejecución del proyecto de investigación financiado por Colciencias, se pactó expresamente que la titularidad de los derechos de propiedad

40

CONTRATO DE CESIÓN

CELEBRADO ENTRE "LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA" DENOMINADA LA ENTIDAD CESIONARIA Y "MARTHA RAQUEL FONTANILLA DUQUE, MARÍA ELISA SOTO HERRERA, EDWARD BAUDILIO SUESCA QUINTERO, SERGIO ALEXANDER CASADIEGOS RINCÓN" DENOMINADOS LOS CEDENTES.

intelectual sobre los resultados que se llegaren a obtener de la investigación, pertenecerían a la entidad ejecutora, es decir, a la Universidad Nacional de Colombia.

6. El objetivo general de la tesis de maestría "*Estandarización de un método de purificación de colágeno tipo II y elaboración de soportes para ingeniería de tejido cartilaginoso*" fue establecer y estandarizar una metodología para obtener colágeno tipo II y producir soportes de éste material.
7. El objetivo general del proyecto financiado por la DIB de la Universidad Nacional de Colombia "*Elaboración y caracterización de soportes de colágeno tipo II*", fue desarrollar y caracterizar soportes de colágeno tipo II y evaluar la ocurrencia de condrogenesis en ellos.
8. El objetivo general del proyecto financiado por Colciencias "*Evaluación de condrogenesis en soportes de colágeno II y cartílago hialino descelularizados, sembrados con condrocitos*", fue desarrollar y caracterizar soportes de colágeno tipo II y de cartílago hialino descelularizado y evaluar la calidad de tejido cartilaginoso obtenido de ellos".
9. Dentro de los impactos esperados por los proyectos de investigación se encuentra hacer accesible el uso de condrocitos autólogos, para el tratamiento de lesiones condrales a los pacientes colombianos, puesto que los procedimientos quirúrgicos en los que se utiliza cartílago artificial autólogo -comercializados en Estados Unidos y Europa (ej.: Carticel®, BioCart)- se realizan por medio de la intervención de instituciones autorizadas, encargadas de llevar a cabo la toma de muestra y el procesamiento del producto. De esta forma, obligan a los pacientes colombianos, que requieran acceder a estos tratamientos, viajar a USA, Grecia, Israel o Italia.
10. Alcanzado el documento descriptivo requerido se plantea el presente contrato de cesión para satisfacer los requisitos exigidos para el trámite de patente, entendiéndose perfectamente por **LOS CEDENTES** cuál es el sentido y las consecuencias de la firma de este contrato.
11. En consecuencia, aceptan que es necesario ceder expresamente los derechos que les puedan corresponder como inventores, para que la Universidad adelante a su nombre los trámites que corresponden para la solicitud de patente.
12. Ante las anteriores consideraciones, el presente contrato de cesión se registrará por las siguientes

CLÁUSULAS

PRIMERA.- OBJETO. LOS CEDENTES, como titulares originarios del derecho a la patente sobre la tecnología denominada "*Procedimiento para el aislamiento y la purificación de colágeno II a partir de tráquea bovina*", transfieren los derechos patrimoniales derivados de la invención mencionada sin limitación alguna a favor de la Universidad Nacional de Colombia acatando la normatividad interna (artículo 26 del Acuerdo 035 de 2003 C.A.) y la legislación nacional vigente.

SEGUNDA.- COMPROMISOS DE LA UNIVERSIDAD. LA UNIVERSIDAD se compromete a:

- a) Efectuar los trámites internos necesarios y a presentar la documentación requerida ante la Superintendencia de Industria y Comercio para solicitar una patente de invención sobre la tecnología "*Procedimiento para el aislamiento y la purificación de colágeno II a partir de tráquea bovina*".
- b) Realizar los contactos y evoluciones necesarias a su alcance para lograr la transferencia o comercialización de la invención, o la cofinanciación de las posteriores etapas de investigación y desarrollo.

TERCERA.- COMPROMISOS DE LOS CEDENTES. LOS CEDENTES se comprometen a:



Universidad
Nacional
de Colombia

CONTRATO DE CESIÓN

CELEBRADO ENTRE "LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA" DENOMINADA LA ENTIDAD CESIONARIA Y "MARTHA RAQUEL FONTANILLA DUQUE, MARÍA ELISA SOTO HERRERA, EDWARD BAUDILIO SUESCA QUINTERO, SERGIO ALEXANDER CASADIEGOS RINCÓN" DENOMINADOS LOS CEDENTES.

- a) Aportar la información necesaria para el diligenciamiento del formulario de solicitud de patente de invención;
- b) A redactar y/o colaborar en la redacción del documento descriptivo de la invención y a apoyar las respuestas o correcciones ante los requerimientos de la Superintendencia de Industria y Comercio durante el proceso de análisis de la solicitud de patente;
- c) A suministrar toda la información necesaria y suficiente para el funcionamiento de la invención, considerando que esa información se requiere para la gestión, implantación y explotación de la invención por parte de **LA UNIVERSIDAD**;
- d) A prestar la asistencia técnica necesaria en el momento de la gestión, implantación y explotación de la invención;
- e) A atender y suministrar cualquier documentación que se requiera para el trámite de la solicitud de la invención o para su posible transferencia;
- f) A respetar las condiciones de la cesión aquí establecida.

CUARTA.- DECLARACIONES DE LOS CEDENTES. LOS CEDENTES declaran a través del presente documento:

- a) Que son todos y únicos inventores de la creación o invención denominada **"Procedimiento para el aislamiento y la purificación de colágeno II a partir de tráquea bovina"**.
- b) Que la creación no afecta derecho alguno de terceros en materia de propiedad intelectual.

Como consecuencia, **LOS CEDENTES** en este sentido responderán por los reclamos que terceros al presente documento pudieren hacer a **LA UNIVERSIDAD**, siendo esta última en dicho caso un tercero de buena fe, por lo cual exonerarán a **LA UNIVERSIDAD** de cualquier responsabilidad al respecto.

QUINTA.- USO DE LA INVENCION CEDIDA. En cumplimiento de los actos autorizados por los artículos 52, 59 y 60 de la Decisión 486 y de lo normado por el artículo 29 del Acuerdo 035 de 2003 CA, **LA UNIVERSIDAD** podrá hacer uso de la invención, explotar, licenciar, ceder o vender la invención objeto de este acuerdo. En aquellos casos en que aplique, si del ejercicio de esas acciones resultaran excedentes, considerados regalías por el uso de la invención, **LOS CEDENTES** recibirán la participación que sobre ellos establecen los artículos 30 y 31 del Acuerdo 035 de 2003 CA, a menos que decidan optar por la renuncia prevista en el parágrafo del artículo 30 de la misma norma.

Parágrafo: En el caso en el cual **LA UNIVERSIDAD** no licencie o comercialice en el término de dos (2) años contados a partir de la presentación de la correspondiente solicitud de patente antes identificada, **LOS CEDENTES** podrán solicitar formalmente ante el Comité de Propiedad Intelectual una licencia de explotación comercial a cambio de reconocer participación económica a **LA UNIVERSIDAD** (artículo 32 del Acuerdo 035 de 2003).

SEXTA.- ÁMBITO DE APLICACIÓN. El presente contrato de cesión se firma en el territorio colombiano, pero su aplicación incluye todos los territorios donde se considere pertinente el solicitar la protección de la invención por haberse determinado un mercado potencial o por considerarse estratégico el establecer la protección de la invención.

SÉPTIMA.- VALOR. La cesión establecida mediante el presente contrato no tiene valor comercial por tratarse de una cesión legal, consecuencia de que la invención fue desarrollada como parte de los compromisos laborales, académicos y/o contractuales de **LOS CEDENTES** para con **LA UNIVERSIDAD**.

OCTAVA.- SOLUCIÓN DE CONTROVERSIAS. Las partes manifiestan que llevarán a cabo de buena fe todas las acciones derivadas del presente contrato, por lo que pondrán todo su empeño para su debido cumplimiento. En caso de desacuerdo, controversia o reclamación, las partes se comprometen a resolver directa y voluntariamente las diferencias que puedan originarse.

CONTRATO DE CESIÓN

CELEBRADO ENTRE "LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA" DENOMINADA LA ENTIDAD CESIONARIA Y "MARTHA RAQUEL FONTANILLA DUQUE, MARÍA ELISA SOTO HERRERA, EDWARD BAUDILIO SUESCA QUINTERO, SERGIO ALEXANDER CASADIEGOS RINCÓN" DENOMINADOS LOS CEDENTES.

Parágrafo: En el caso de no llegar a un acuerdo directo entre las partes, se optará por mecanismos alternativos para la solución de controversias como la conciliación, transacción o amigable composición. No obstante, siempre debe preferirse el arreglo directo o a través de conciliación prejudicial.

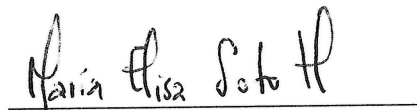
NOVENA.- PERFECCIONAMIENTO. El presente contrato se entenderá perfeccionado al momento de ser firmado por las partes.

El presente acuerdo se firma por las partes, en la ciudad de Bogotá a los **31 JUL 2017**

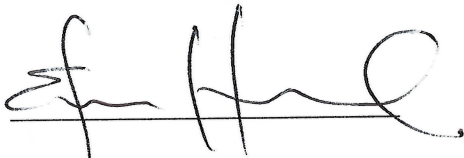
LOS CEDENTES:



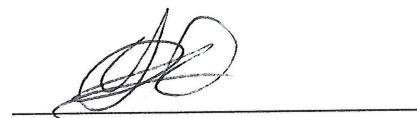
MARTHA RAQUEL FONTANILLA DUQUE
Profesora Titular Departamento de Farmacia
C.C 41.659.245
Investigadora Principal



MARÍA ELISA SOTO HERRERA
Estudiante Maestría en Ingeniería Química
C.C 1.115.068.974
Estudiante asistente de investigación

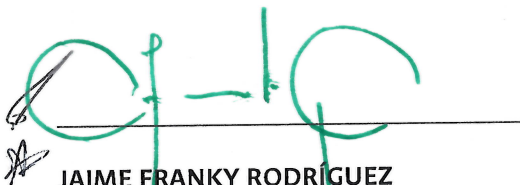


EDWARD BAUDILIO SUESCA QUINTERO
C.C 79.996.280
Estudiante asistente de investigación



SERGIO ALEXANDER CASADIEGOS RINCÓN
C.C 80.037.160
Estudiante asistente de investigación

LA UNIVERSIDAD



JAIME FRANKY RODRÍGUEZ
Vicerrector de Sede
C.C. 19.343.653 de Bogotá
Cesionario