

DOCTORA:

EDNA MARCELA RAMÍREZ OROZCO

DIRECTORA NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

REF. EXPEDIENTE No.: NC2021/0008329.
SOLICITUD PATENTE: FORMULACIÓN PARA RELLENO ÓSEO QUE PRESENTA ENCAPSULACIÓN ÓSEA DESMINERALIZADA (DBM) EN UNA MEZCLA DE POLÍMEROS BIOCOMPATIBLES.
SOLICITANTES: - FUNDACION BANCO DE TEJIDOS HUMANOS TISSUE BANK.
- UNIVERSIDAD CES.
- Universidad EIA

RESPUESTA A REQUERIMIENTO OFICIAL **OFICIO NO. 21278** NOTIFICADO EL 29 DICIEMBRE DE 2023.

CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, mayor de edad, domiciliada en Bogotá D.C., identificada con cedula No 40.017.374, en mi condición de apoderada de **FUNDACION BANCO DE TEJIDOS HUMANOS TISSUE BANK, UNIVERSIDAD CES y Universidad EIA**, por el presente escrito y estando dentro del término legal para hacerlo, doy respuesta al oficio arriba referenciado, de acuerdo con lo siguiente:

En respuesta al oficio No. 21278, a continuación, encuentran:

- i. Respuesta a los puntos del requerimiento
 - Respuesta punto por punto a los requerimientos de del examinador.
- ii. Adjunto a este memorial se presentan los siguientes documentos
 - Nuevo capítulo reivindicatorio.
 - Nuevo capítulo descriptivo.
 - Comprobante de pago correspondiente a las modificaciones al capítulo reivindicatorio.
 - Comprobante de pago correspondiente a las modificaciones al capítulo descriptivo.

1. De la solicitud de patente.

Reivindicaciones

- Manifiesta el examinador que la reivindicación 1 no es clara porque incluye los siguientes extractos que, en criterio del examinador se refieren a condiciones de proceso y por tanto no deberían hacer parte de las reivindicaciones de producto:

- *se activa químicamente con la inclusión del...*
- *el cual se prepara de una mezcla de...*
- *dichas soluciones poliméricas se mezclan...*

El solicitante ha incluido la nueva reivindicación 2 la cual incluye las condiciones del proceso que hacían parte de la antigua reivindicación 1. Entiende el solicitante que la objeción ha sido subsanada.

- El examinador se sugiere corregir la palabra "polyvinil" por "polivinil" en la reivindicación 1.

El solicitante ha realizado la corrección solicitada.

Descripción.

Manifiesta el examinador que en la página 8 de la presente descripción se menciona "(...) °C que era cambiada cada 3 días para mantener la concentración iónica, los resultados de esta prueba se pueden observar en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia. Figura 1.**" Solicita el examinador corregir dicho error.

El solicitante ha realizado la corrección solicitada en el capítulo descriptivo que se adjunta a esta respuesta.

2. Determinación de Estado de la técnica:

Como resultado del examen de patentabilidad el examinador encontró los siguientes documentos relevantes:

Ítem	Documento	Título	Fecha de publicación
D1	CN110339395	<i>"PMMA (Polymethylmethacrylate)-based hydration bone cement and preparation method and application thereof"</i>	18 de octubre de 2019.
D2	US2017024501	<i>"METHOD FOR 3-D PRINTING A CUSTOM BONE GRAFT"</i>	26 de enero de 2017.

3. Examen de patentabilidad

Nivel inventivo

Inicia el examinador el análisis de nivel inventivo comparando las características técnicas de la invención reivindicada en la reivindicación 1 con las características técnicas de D1 y D2. Manifiesta el examinador que D1 es considerado con el estado de la técnica más cercano a la invención reivindicada en la reivindicación 1, cita el examinador el ejemplo 7, párrafo 0018, ejemplo 6 y el párrafo 0024 de D1.

Manifiesta el examinador que la diferencia entre la invención definida entre la reivindicación 1 y la formulación para relleno óseo divulgada en D1, consiste en que en la presente invención se especifica que la matriz ósea es alogénica desmineralizada y liofilizada y que la sal de sodio es tetraborato de sodio.

Manifiesta el examinador que "No hay evidencia de que especificar que la matriz ósea es alogénica desmineralizada y liofilizada y que la sal de sodio es tetraborato de sodio proporcione una formulación con algún efecto técnico diferente al que ya

proporcionaba el objeto de D1, puesto que un cemento óseo hidratado a base de PMMA que tenga una alta resistencia de unión entre partículas y, por tanto, que tenga una alta resistencia a la compresión ya había sido previsto en dicho documento (Párrafo 0002, D1)”

Plantea entonces el examinador que el problema técnico objetivo se puede plantear como ¿Cómo modificar la formulación para relleno óseo conocida en D1 con el fin de proporcionar otra formulación para relleno óseo alternativa?

Manifiesta el examinador que el especificar que la matriz ósea es alogénica desmineralizada y liofilizada para proporcionar una formulación para relleno óseo alternativa, ya está divulgado en D2. Cita el examinador los párrafos [0017], [0122], [0086] y reivindicaciones 1 y 3 de D2.

Manifiesta el examinador que la persona normalmente versada en la materia estaría motivada a especificar que la matriz ósea es alogénica desmineralizada y liofilizada como en el D2 en la formulación de relleno óseo de D1, para así llegar al objeto de la reivindicación 1. Por lo cual se considera obvia.

Los solicitantes quisieran manifestar su desacuerdo con el análisis del examinador, relativa al análisis de nivel inventivo de reivindicación 1 y el D1. El solicitante quisiera manifestar que la reivindicación 1 presenta las siguientes diferencias adicionales a las nombradas por el examinador, a continuación, para su mejor referencia:

- Al usar el tetraborato de sodio se disminuye apreciablemente el tiempo de fraguado dado que este acelera el entrecruzamiento, este compuesto no se menciona en ninguno de los documentos citados y el mismo otorga un efecto técnico sorprendente que no se revela, sugiere o menciona ni en D1 ni en los otros documentos citados por el examinador.

- El hecho de que se use matriz ósea desmineralizada implica que en este sistema se tengan muchos más componentes que sus homólogos sintéticos, por lo cual se debe asegurar mediante el uso de todos los componentes de esta formulación que se obtenga un sistema estable. Es importante mencionar que los fosfatos de calcio sintéticos tienen menos capacidades biológicas que su contraparte de matriz ósea desmineralizada, en los materiales sintéticos no hay presencia de lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos ni proteínas.
- Además, la formulación propuesta es un sistema tipo hidrogel lo que es muy diferente a las formulaciones descritas en los documentos D1 a D2.
- El uso del tetraborato de sodio permite que el sistema pueda ser preparado *in situ*, es decir en quirófano, disminuyendo los tiempos de preparación que son mucho menores que en D1 y los demás mencionados por el examinador, esto es claro y se menciona en varios apartados de la descripción (final primer párrafo pagina 1, y resumen del documento tal y como se modificó el 20 de marzo de 2024).

Es importante aclarar que luego de mezclar una matriz ósea alogénica desmineralizada y liofilizada con polimetilmetacrilato (PMMA) activado con el monómero metil metacrilato (MMA) y polivinil alcohol (PVA) entrecruzado con tetraborato de sodio produce una formulación para uso como relleno óseo, que por sus componentes, cantidad de componentes, relación en la cantidad de los componentes y procedimiento para mezclar los componentes era algo desconocido, esto se logró a través de amplia experimentación en el laboratorio y no por una mera mezcla aleatoria de compuestos, por lo tanto, es claro que la presente invención no resulta obvia, tiene nivel inventivo y cumple a cabalidad los requisitos establecidos para ser considerada como un patente.

Adicionalmente, el solicitante quisiera mostrar las características esenciales de la presente invención y a continuación las diferencias con los documentos citados D1 y D2.

Características de la presente invención (NC2021/0008329)

- Resumen: La presente invención se refiere a un relleno óseo tipo masilla que presenta una encapsulación de una matriz ósea desmineralizada (DBM) en una mezcla de polímeros. La formulación comprende una mezcla de polimetilmetacrilato (PMMA) el cual se activa químicamente con la inclusión del monómero metil metacrilato (MMA), una matriz ósea alogénica desmineralizada y liofilizada (DBM) un hidrogel estable y biocompatible compuesto de polyvinil alcohol el cual se prepara en una mezcla de agua y etanol (50/ 50). El relleno óseo tiene un bajo tiempo de fraguado el cual permite su aplicación *in situ*. (Resumen).
- **Tipo de Biomaterial:** Hydrogel- masilla.
- **Preparación in situ:** si (alrededor de 7 a 13 minutos).
- Base de la preparación- componentes: DBM - PMMA -hidrogel de PVA - MMA - tetraborato de sodio.
- Contiene DBM: Si
- Atmosfera de preparación: estéril
- Tiempo de preparación total: Mucho menor que D1 y D2
- Temperaturas de preparación: menor a las de D1 y D2
- **Moldeable:** si
- Propiedad oseocunductiva: si
- Propiedad oseoinductiva: si
- Usa preforma: no
- Necesita información del defecto óseo: no necesita una imagen inicial de defecto óseo obtenida por RX u otra técnica de imagenología.
- Necesita molde para obtener la pieza deseada: no
- Necesita antibiótico: no, por ser preparado en un ambiente estéril.

- La cantidad de PMMA se reduce al mínimo dado los efectos negativos atribuidos a este material.
- Las proporciones usadas son en rango específicos muy diferentes de los D1.
- Técnica de preparación: menos compleja que la de D1 y D2

D1 - CN110339395

- Resumen: El cemento óseo de hidratación a base de PMMA se prepara mezclando una o más de PMMA, P(MMA-HEMA) o emulsión de P(MMAHEMA-PVA) con una mezcla de sal de tiofosfato sólido, en donde la hidratación ósea a base de PMMA en el cemento es similar al del PMMA y tiene una compatibilidad favorable con los tejidos óseos. La invención descrita en D1 revela de forma adicional el método de preparación del cemento óseo de hidratación a base de PMMA. El PMMA en la emulsión se usa ingeniosamente para reemplazar el polvo de PMMA en el cemento óseo de uso frecuente, de modo que los efectos del calor en el proceso de solidificación del cemento óseo y el contenido de monómeros residuales se reducen considerablemente.

Características D1.

- Tipo de Biomaterial: Cemento para hueso.
- Preparación *in situ* (en quirófano): no.
- Base de la preparación: **PMMA**, o/y P(MMA-HEMA-PVA), ácido fósfórico, α TCP, entre otros.
- Contiene DBM: No
- Método de preparación: polimerización por emulsión.
- Atmosfera de preparación: inerte
- Moldeable: no
- Propiedad oseoconductiva: Si
- Propiedad oseoinductiva: No.

- Tiempo total de preparación: mucho mayor que la de nuestra patente nuestra.
- Temperaturas de preparación: 70 ~ 90 C
- Propiedades mecánicas: alta resistencia
- Usa emulsificador: si Neoplex o lauril sulfato de sodio (tensoactivo aniónico).
- Necesita varios iniciadores.
- Técnica de preparación: más compleja que la de la presentada en la solicitud nuestra.

El hecho de que la formulación contenga matriz ósea desmineralizada y liofilizada le otorga propiedades biológicas que permiten la osteointegración del cemento óseo en el huésped y las propiedades mecánicas también son muy diferentes. Ninguno de los componentes en D1 proporcionan las características de oseoinducción que proporciona la formulación que estamos presentando, esto solo lo confiere la DBM. El material propuesto en D1 no se puede preparar *In situ* y requiere condiciones de laboratorio especiales además de no estar preparado en un ambiente estéril. En esta invención se desarrolló un hidrogel moldeable que es diferente a lo propuesto en D1.

D2 - US2017024501

- Resumen: Se emplea un método para producir injertos óseos mediante impresión 3D utilizando una imagen 3D de la ubicación del injerto para producir un modelo 3D del injerto. Esto se imprime utilizando una impresora 3D y un medio de impresión que produce un material poroso, biocompatible y biodegradable que favorece la osteoinducción. Por ejemplo, el medio de impresión puede ser PCL, PLLA, PGLA u otro polímero biocompatible aprobado. Además, dicho método puede ser útil para cirugías cosméticas, cirugías reconstructivas y diversas técnicas requeridas por dichos procedimientos. Una vez colocado el injerto, el hueso natural reemplaza gradualmente al injerto.

Características D2.

- Tipo de Biomaterial: Cemento para hueso.
- Preparación *in situ* (en quirófano): no.
- Base de la preparación: PMMA y DBM, celulosa, acetato de celulosa, tintas para impresión, PCL, PLLA, PGLA y otros.
- Contiene DBM: Si
- Método de preparación: impresión 3D.
- Atmosfera de preparación: inerte
- Moldeable: no
- Propiedad oseoconductiva: Si
- Propiedad oseoinductiva: Si.
- Tiempo de preparación: mucho mayor a la de la solicitada en nuestra patente.
- Temperaturas de preparación: no específica
- Propiedades mecánicas: alta resistencia
- Necesita: una imagen inicial de defecto óseo
- Usa impresión 3D: si
- Usa moldes: si
- Usa preforma: si
- Técnica de preparación: compleja que la de la presentada en la solicitud nuestra

Dadas las condiciones de preparación de D2 y los componentes usados se identifican que para lograr las propiedades que indican requieren de mayor número de materiales y procesos más complejos para lograr la formulación que presentan. **Con ello no logran obtener un material de preparación *in situ* ni moldeable como el que se propone en la presente invención (NC2021/0008329).**

Finalmente, son los componentes (en menor cantidad que los de D1 y D2) las cantidades de cada componente y procesos de fabricación usados en nuestra

formulación los que la dotan de características que, si bien pueden ser algunas similares a las de D1 y D2, ellas no tienen las características de preparación que presentamos. Por tal motivo, para el solicitante es claro que la formulación descrita en la presente invención no es obvia.

Por todo lo dicho, solicitamos que la Superintendencia de Industria y Comercio admita las modificaciones y argumentos que se han facilitado, las cuales no amplían materia y subsanan las objeciones realizadas por el examinador referentes a la novedad y el nivel inventivo. Asimismo, solicitamos que continúe el trámite con normalidad y se proceda con la concesión del Derecho sobre la Patente de la referencia.

Para efectos de notificaciones, recibiré estas vía internet al correo electrónico claudia.caro@ponsip.com, en la secretaría de esa Dirección y/o en la de la Delegatura de Propiedad Intelectual o en mi oficina de abogados de la Calle 94 A No 11A-32 Oficina 306 de la ciudad de Bogotá.

Agradezco su atención.



CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ

CC No 40.017.374 de Tunja

T.P. No 36.448 del C.S de la J.

Adjunto lo anunciado.

REIVINDICACIONES

1. Formulaci3n para relleno 3seo caracterizado porque comprende una mezcla de dos soluciones polim3ricas y una matriz 3sea:
 - polimetilmetacrilato (PMMA) activado qu3micamente con la inclusi3n del mon3mero metil metacrilato (MMA), dicho pol3mero posterior a la activaci3n compone el 17 y 18% p/p de la mezcla;
 - una matriz 3sea alog3nica desmineralizada y liofilizada (DBM) que tiene entre un 7% a un 9% de calcio residual el cual tiene un tama1o de part3cula de entre 300 μm a 500 μm y compone entre un 20 y 22% p/p de la mezcla;
 - un hidrogel estable y biocompatible compuesto de polivinil alcohol (PVA) con peso molecular que se encuentra entre 130.000 g/mol - 150.000 g/mol y presenta un 99% grado de hidrolisis, el cual corresponde al 51% y 52% p/p de la mezcla;
 - entre 8% y 9% p/p del entrecruzante tetraborato de sodio.
2. Proceso para elaborar el relleno 3seo de acuerdo con la reivindicaci3n 1 caracterizado porque comprende los pasos de:
 - a. activar qu3micamente el polimetilmetacrilato (PMMA) con la inclusi3n del mon3mero metil metacrilato (MMA)
 - b. preparar en una mezcla de agua y etanol (50/ 50) el polivinil alcohol (PVA) con peso molecular que se encuentra entre 130.000 g/mol - 150.000 g/mol y presenta un 99% grado de hidrolisis;
 - c. mezclar las soluciones obtenida en las etapas a y b con una matriz 3sea alog3nica desmineralizada y liofilizada (DBM) que tiene entre un 7% a un 9% de calcio residual el cual tiene un tama1o de part3cula de entre 300 μm a 500 μm adicionando tetraborato de sodio como entrecruzante.

FORMULACIÓN PARA RELLENO ÓSEO QUE PRESENTA ENCAPSULACIÓN
ÓSEA DESMINERALIZADA (DBM) EN UNA MEZCLA DE POLÍMEROS
BIOCOMPATIBLES.

CAMPO TÉCNICO

La presente invención hace referencia a un relleno óseo tipo masilla que presenta una encapsulación de una matriz ósea desmineralizada (DBM) en una mezcla de polímeros. La presente invención divulga una formulación de una masilla para la reparación de defectos óseos, generando una estructura estable para la formación de nuevo hueso, migración e invasión celular y, por lo tanto, remodelación ósea más efectiva. La formulación descrita es porosa, no citotóxica, osteoinductiva, osteoconductiva, bioactiva, moldeable, de preparación *in situ* y presenta poco tiempo de fraguado lo cual permite la adaptación al defecto óseo y facilita el manejo por los especialistas.

ESTADO DE LA TÉCNICA

En casos de traumas óseos causados por patologías, intervenciones quirúrgicas, deportes de alto rendimiento, accidentes de tránsito u otras situaciones donde la regeneración ósea es deficiente o nula, es necesario intervenir con un sustituto óseo el cual provea una barrera que impida el crecimiento de las células del tejido conjuntivo y estimule la proliferación de las células óseas. La matriz ósea desmineralizada (DBM) es ampliamente usada como implante para corregir defectos óseos debido a sus excelentes propiedades biológicas. Sin embargo, dicha DBM no tiene un aprovechamiento total puesto que los fluidos corporales y el proceso de implantación provocan pérdidas del material. Por esta razón, el problema técnico que se presenta corresponde a la necesidad de formular un sistema de encapsulación tipo masilla o gel para evitar la pérdida de DBM, mantener las propiedades del hueso como la osteoinducción y osteoconducción y que permita ser moldeada en la configuración adecuada para adaptarse al sitio del defecto.

Así las cosas, en el estado de la técnica existe una pluralidad de divulgaciones referentes a rellenos óseos que contienen DBM, por ejemplo, en la patente US

5.073.373 proporciona una composición de polvo óseo desmineralizado fluido para reparaciones óseas quirúrgicas, la presentación líquida se compone de polvo óseo unido a un material orgánico sintético biocompatible derivado del glicerol (monoacetina) que puede aplicarse en una lesión ósea generando nuevo crecimiento óseo en menor tiempo. La patente US 5.507.813 proporciona un material conformado, una masa coherente, a partir de una combinación de partículas óseas (10- 100 mm) alargadas desmineralizadas enredadas mecánicamente y uno o más aditivos (tensoactivos, aglutinantes y agentes de unión biocompatibles); la presentación final es una lámina rígida que al entrar en contacto con fluidos corporales pasa a ser flexible permitiendo la osteogénesis, osteoconducción y osteoinducción. Ninguna de estas presentaciones permite la aplicación de cargas mecánicas donde se ha utilizado el relleno óseo.

De otro lado y desarrollando un injerto óseo tipo masilla esta la patente US 5.314.476, este documento revela una formulación compuesta por 60% (p/p) de hueso particulado desmineralizado con tamaños de partícula medianas (2- 400 mm) combinado con una cantidad apropiada de un fluido transportador biocompatible como los polihidroxilados: monoésteres y diésteres líquidos y sólidos de glicerol; en este trabajo se usó monolaurato de glicerol, capaz de mantener cohesión y resistir la erosión después de ser puesto en el defecto óseo. Aunque esta patente revela algunos de los elementos de la presente invención no revela, específicamente, la formulación tal y como se describirá más adelante en la descripción de la presente invención.

Revelando una formulación similar se encuentra el documento EP1850797, este trabajo divulga un cemento óseo que comprende polimetilmetacrilato (PMMA) el cual se activa químicamente con monómero de metil metacrilato (MMA) una vez se mezclan dichos componentes se produce una mezcla que alcanza una alta viscosidad durante un período inicial, la viscosidad de la mezcla permanece relativamente estable durante un tiempo de trabajo de al menos 5 minutos. Después del período de fraguado inicial, y la mezcla es adecuada para uso *in vivo*. Como una divulgación adicional, este documento menciona que la mezcla contiene hueso procesado y/o hueso sintético el cual se mezcla con los componentes mencionados anteriormente. Puntualmente este documento no revela algunos elementos fundamentales de la

formulación que se busca proteger como lo son el uso del PVA y las concentraciones que se definen.

Finalmente se encuentra el documento WO2012135205A1, en el cual se describe una matriz de hueso esponjoso desmineralizado rígida. Este trabajo también describe implantes que comprenden al menos una matriz de hueso esponjoso desmineralizado y se describen métodos para tratar hueso que tiene un vacío o defecto en un paciente. Este documento describe, de forma adicional, métodos para fabricar una matriz de hueso esponjoso desmineralizada. En uno de los apartados del documento se describe que la matriz de hueso esponjoso desmineralizado comprende una matriz de hueso esponjoso que ha sido desmineralizado para contener aproximadamente de 5% (p/p) a 20% (p/p) en peso de calcio residual. Aunque esta divulgación revela algunos elementos de la presente invención, este documento falla en revelar varios de los elementos de la formulación como las soluciones poliméricas y las concentraciones específicas de las mismas.

A partir de lo definido en los párrafos anteriores, se puede ver claramente que existe una pluralidad de divulgaciones que definen algunos rellenos óseos que pueden ser utilizados *in situ*, que pueden contener DBM y algunos otros componentes que otorgan ciertas características mecánicas deseables. Sin embargo, los documentos que componen el estado de la técnica no revelan una formulación para relleno óseo que comprende la mezcla de dos soluciones poliméricas, PMMA activado, PVA y una matriz ósea DBM.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una formulación para relleno óseo que comprende la mezcla de dos soluciones poliméricas y una matriz ósea donde la primera matriz polimérica comprende polimetilmetacrilato (PMMA) el cual se activa químicamente con la inclusión del monómero metil metacrilato (MMA), dicho polímero posterior a la activación se mezcla con una segunda solución polimérica compuesta de polyvinil alcohol (PVA) que presenta un 99% grado de hidrolisis el cual se prepara en una mezcla de agua y etanol (50/50). Dichos polímeros se mezclan a su vez con una matriz ósea alogénica desmineralizada y liofilizada (DBM). Luego de tener la mezcla

homogénea de las soluciones poliméricas se les adiciona tetraborato de sodio como entrecruzante y de esta forma obtener el hidrogel de PVA.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativas de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La presente invención se entiende de una forma más clara a partir de las siguientes figuras donde se evidencian las ventaja y características técnicas novedosas con respecto al estado del arte de la formulación para relleno óseo que presenta, en donde, las figuras no pretenden limitar el alcance de la invención, el cual está únicamente determinado por las reivindicaciones adjuntas, en donde:

La **Figura 1**. Muestra los resultados de la prueba de hinchamiento del relleno óseo de la presente invención, en un período de 4 semanas.

La **Figura 2**. Muestra los resultados de la prueba de bioactividad de la presente invención, de izquierda a derecha se pueden observar las imágenes SEM de la masilla de referencia antes de la prueba de bioactividad, seguido de la masilla después de 3 semanas de inmersión en fluido simulado y finalmente se muestra un acercamiento de los cúmulos de apatita formados sobre la superficie de la masilla.

La **Figura 3A**. Muestra los resultados de la prueba de citotoxicidad, tanto el control positivo, sustituto óseo y control negativo. Se aprecia entonces que las células CHO en contacto con el sustituto óseo tienen alta viabilidad celular. El sustituto óseo no fue citotóxico, por lo que este material no interfiere con el crecimiento de las células.

La **Figura 3B**. Muestra los resultados de la prueba de citotoxicidad, tanto los resultados del control, DBM y el sustituto óseo (BONEgel) que se describe en la

presente invención. Se aprecia entonces que las células osteoblastos en contacto con el sustituto óseo tienen alta viabilidad celular. El sustituto óseo no fue citotóxico, por lo que este material no interfiere con el crecimiento de las células.

La **Figura 4**. Muestra los resultados de la prueba de degradación, la masilla de referencia luego de 4 semanas presentó un porcentaje de degradación inferior al 1%, por lo que se evidencia que el material es estable.

La **Figura 5**. Muestra los resultados de la prueba de confinamiento, indicando que no hay diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la pérdida de partículas de la masilla.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una formulación para relleno óseo que comprende una mezcla específica de soluciones poliméricas con matriz ósea alogénica desmineralizada y liofilizada (DBM), la formulación ósea presenta un comportamiento aceptable de hinchamiento el cual no desestabiliza el material luego de cuatro semanas de estar en contacto con fluidos simulados, adicionalmente la formulación ósea generará una buena osteointegración debido a la formación continua de cúmulos de apatita y a su baja citotoxicidad. En términos generales se puede decir que el relleno óseo presenta cualidades deseables para su aplicación en procedimientos donde se quiera corregir algún defecto óseo.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una formulación para relleno óseo que comprende la mezcla de dos soluciones poliméricas y una matriz ósea donde la primera matriz polimérica comprende polimetilmetacrilato (PMMA) el cual se activa químicamente con la inclusión de monómero de metil metacrilato (MMA), dicho polímero posterior a la activación compone entre un 17% a un 18% p/p de la mezcla; una segunda solución polimérica que comprende polyvinil alcohol (PVA) con peso molecular que se encuentra entre 130.000 - 150.000 g/mol y presenta un 99% grado de hidrolisis el cual se prepara en una mezcla de agua y etanol (50/50) el cual corresponde entre un 50% a un 52% de la mezcla y una matriz ósea alogénica desmineralizada y liofilizada (DBM) que tiene entre un 7% a un 9% de calcio

residual el cual tiene un tamaño de partícula de entre 300 μm a 500 μm y compone entre un 20% a un 22% p/p de la mezcla; donde dichas soluciones poliméricas se mezclan y se les adiciona entre un 8% a un 9% (p/p) de tetraborato de sodio como agente entrecruzante.

Con el fin de mostrar una de las realizaciones de la invención a continuación se muestra el proceso de obtención del relleno óseo que se ha descrito a lo largo de este documento.

EJEMPLOS

Ejemplo 1:

Elaboración del relleno óseo.

A continuación, se mostrará un ejemplo de preparación de la formulación para relleno óseo.

En primer lugar, y en un recipiente individual, se preparó en una mezcla de agua destilada y etanol (50/ 50) la solución polimérica que contiene el polivinil alcohol (PVA) de M_w 130.000- 150.000 g/mol con 99% grado de hidrolisis. Para estos ensayos la concentración de la solución polimérica se definió en los siguientes rangos:

Ensayo 1: 51% p/p de la mezcla final

Ensayo 2: 52 % p/p de la mezcla final

Continuando con la preparación de la segunda solución polimérica, en un recipiente separado se activó el polimetilmetacrilato de (PMMA), adquirido comercialmente, por la inclusión del monómero metil metacrilato (monómero MMA). Para los siguientes ensayos la concentración de la solución polimérica se definió en los siguientes rangos:

Ensayo 1: 17% p/p de la mezcla final

Ensayo 2: 18 % p/p de la mezcla final

Se prepara la matriz ósea, la cual es previamente liofilizada y desmineralizada que presenta tamaños de partícula entre 300 - 500 μm para poder ser utilizada en la formulación de relleno óseo, esta matriz ósea desmineralizada presenta entre un 7% a un 9% de calcio residual.

Una vez el (PMMA) está activado, se adición una cantidad variable entre 20% y 22% g de matriz ósea desmineralizada y liofilizada (DBM) con tamaño de partícula entre 300 - 500 μm esta integración se realiza de forma mecánica y se homogeniza con la adición de la solución de polyvinil alcohol (PVA) agitando vigorosamente; por último, se adiciona la solución de tetraborato de sodio y se continua con la agitación hasta obtener una masilla moldeable capaz rellenar cualquier tipo de defecto óseo. La masilla obtenida es moldeable y presenta un tiempo de fraguado entre 7 y 13 minutos.

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Prueba de hinchamiento del sustituto óseo

Con el fin de replicar un mayor número de variables de los sustitutos óseos se evalúa su capacidad de estar en presencia de fluidos simulados y se determina el grado de hinchamiento o absorción de líquidos hasta la estabilidad, ya que en la aplicación final el material estará en contacto con líquidos como sangre y otros fluidos corporales.

La capacidad de hinchamiento de las muestras se determinó por técnica gravimétrica con el peso de las mismas en intervalos de tiempo, donde se registra el peso húmedo y seco. Se utilizó una solución tampón fosfato (PBS) (KCl , KH_2PO_4 , NaCl , NaHPO_4) a 37 °C que era cambiada cada 3 días para mantener la concentración iónica, los resultados de esta prueba se pueden observar en la Figura 1.

Los resultados mostraron que la absorción total de agua fue del 107,80%, donde la mayor cantidad de absorción ocurrió en las primeras cuatro semanas presentando un efecto gatillo, el cual describe un aumento acelerado de absorción de líquidos y luego una desaceleración controlada en dicha absorción. Las masillas

específicamente tienen este tipo de efecto, pero luego son muy estables en el sitio de intervención.

Prueba de bioactividad del sustituto óseo

Con el fin de verificar si el relleno óseo puede ser utilizado como un sustituto óseo es necesario llevar a cabo una prueba de bioactividad de dicho sustituto, la producción de precursores de fosfato de calcio comienza con la formación de una membrana mesénquima vascularizada en donde las células mesenquimales se diferencian a osteoblastos que comienzan a sintetizar matriz ósea y así forman espículas óseas que se fusionan entre sí para formar trabéculas óseas. Luego de unos días se da la deposición de fosfatos de calcio y otros minerales endureciendo la matriz ósea, calcificándola y formando un tejido óseo organizado, fuerte y laminar.

Con la prueba de bioactividad se simula dicho entorno fisiológico (plasma sanguíneo) demostrando de manera *in vitro* la formación de una superficie bioactiva donde es posible observar cúmulos de apatita lo cual permite concluir que se dará la osteointegración por la precipitación de iones de calcio y fosfatos derivados del material y el hueso.

El análisis de la bioactividad se evaluó *in vitro* utilizando un fluido simulado (SBF), que comprende: Na_2SO_4 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, NaHCO_3 , CaCl_2 , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, NaCl y KCl . Estas sales fueron diluidas en agua destilada y se ajustó hasta un pH de 7,4 usando Buffer Tris y ácido clorhídrico, la concentración resultante simula el plasma sanguíneo humano. Dicha solución fue cambiada cada 3 días con el fin de mantener la carga iónica.

Las muestras se sumergieron en 3 mL de SBF y se incubaron a 37°C, en momentos específicos (cada semana) las muestras se secaron en un desecador. La evaluación de la bioactividad se llevó a cabo utilizando microscopia electrónica de barrido (SEM) y dispersión de electrones, EDS, para identificar los cambios morfológicos y la composición de la superficie. Las imágenes resultado de este análisis se pueden verificar en la Figura 2.

La prueba permitió observar la aparición continua de cúmulos de apatita, lo que permite concluir que el material en presencia del fluido simulado genera cubrimiento total de la superficie con fosfatos de calcio y por ende una mejor oseointegración en el lugar. Durante el tiempo de la prueba pueden aparecer varios tipos de fosfatos de calcio entre ellos el ortofosfato de calcio, según su relación molar calcio/fósforo que se puede establecer entre 0,5 y 2, los cuales confirman que finalmente con el paso del tiempo se convertirán en una unión sólida entre el injerto el hueso existente.

Prueba de citotoxicidad.

Se evaluó la citotoxicidad del relleno óseo mediante el ensayo colorimétrico MTT, que exhibe específicamente la función mitocondrial de la célula, y por lo tanto se puede asociar directamente con la toxicidad del material a través de la viabilidad celular en comparación con los respectivos controles (control negativo se refiere a células totalmente sanas tratadas solo con medio de cultivo y control positivo se refiere a células tratadas con etanol al 5% que ocasiona muerte celular). La citotoxicidad puede clasificarse como grave si es inferior al 30%, moderada si está entre 30 y 60%, toxicidad leve si está entre 60 y 90% y más del 90% se considera no citotóxica.

Se utilizaron las líneas celulares CHO-K1 (fibroblastos de ovario de hámster chino) y la línea celular Saos-2 (ATCC® HTB-85™) osteoblastos humanos de osteosarcoma. Se realizó un cultivo de aproximadamente 100.000 células por pozo y se trató con medio en contacto durante 24 horas con el material. El día de la medición se retiró el medio y fue reemplazado por la mezcla de MTT al 10% en solución tampón fosfato (PBS); se incubó durante 4 horas a 37°C y protegido de la luz, posteriormente se disuelven los cristales de formazan con DMSO. La reducción de MTT se cuantificó midiendo la absorbancia de luz con un espectrofotómetro a una longitud de onda 570 nm durante 10 segundos con movimiento orbital.

Este análisis reveló que las células en contacto con el material óseo tienen alta viabilidad celular. El sustituto óseo no fue citotóxico, por lo que se puede concluir que este material no interfiere con el crecimiento de las células, estos resultados se observan con mayor claridad en las Figuras 3 A y 3B.

Prueba de degradación

La evaluación de la degradación de un material es esencial para garantizar la seguridad biológica del mismo, las características químicas, los mecanismos de degradación del material y el entorno local demuestran estabilidad, toxicidad y reacciones químicas con el paso del tiempo.

A la masilla obtenida se le determinó su capacidad de degradación *in vitro* cuantificando la pérdida de masa de la misma. La prueba que se basó en utilizar una solución tampón fosfato (PBS) de pH= 7,40 a 37 °C, durante 4 semanas; la solución tampón fue sustituida cada semana con el fin de mantener la actividad iónica y evitar contaminaciones. Las muestras se sumergieron en tubos que contenían 3 mL de PBS. Las muestras fueron pesadas cada 72 horas, luego de ser secadas o sumergidas en el tampón según el caso, la Figura 4 exhibe dichos resultados.

La degradación promedio de las muestras no fue significativa entre la primera y la tercera semana. La masilla en la semana tres, no tuvo un cambio significativo, el porcentaje de degradación pasó de 0,25% a 1% aproximadamente en la semana cinco. Este cambio podría explicarse porque en ese momento específico la masilla se había hinchado aproximadamente un 106%, lo que podría contribuir al comienzo de la degradación. Cabe resaltar que el 1% de degradación de la masilla luego de 4 semanas es muy bajo, el material es muy estable en el sitio de la lesión lo cual es beneficioso para evitar la migración de material a lugares no deseados evitando la formación de trombos o coágulos.

Prueba de confinamiento.

La prueba de confinamiento permite determinar la capacidad del material (masilla) de permanecer en el lugar del defecto óseo después de la implantación en presencia de los fluidos biológicos. Para la presente invención es necesario cuantificar la capacidad de cohesión de la masilla ya que así se tendrá un tiempo estimado de endurecimiento del material en presencia de un medio acuoso sin que haya pérdida de partículas a sitios no deseados.

Se determinó la capacidad de cohesión del material simulando un defecto óseo real, generado en fragmentos de tibia por medio de una prueba de confinamiento. Fue posible cuantificar la pérdida de material y conocer su viscosidad implementando un montaje que simuló las principales variables de la aplicación final; una jeringa conectada en un extremo a una bomba de eyección que controló el caudal requerido y al otro extremo a una cánula cargada de un fluido simulado que imito la presencia de sangre por los fragmentos de tibia donde los defectos óseos fueron llenados con el material.

En la Figura 5 se puede observar el valor de masa del grupo de control y el grupo al que fue sometido a paso e inmersión en el fluido. El grupo de control tiene una media de 0,137 g y el tratamiento una media de 0,179 g. Comparando estos datos, se obtuvo un valor de $p = 0,359$ mediante ANOVA. Este valor refleja que las muestras luego de estar en contacto con fluidos y luego remover la humedad adquirida no presentan diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control. Este resultado demuestra la capacidad del material de estar en un ambiente similar a la aplicación final, es decir, un ambiente húmedo y confinado sin presentar pérdida de partículas, sin moverse y sin desintegrarse.



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2024/0003481
Recibo: 24-20844
Fecha: 20/03/2024

CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ
CC: 40.017.374
Pago PSE No: 944717
CUS: 525777628

NC Modificación a las reivindicaciones
Request on Patente de Invención Nacional NC2021/0008329

Detalle del pago

Id.	Rentístico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-03	Modificaciones / Correcciones al registro Patente PCT (DESCUENTO INTERNET)	1	\$ 215,000	\$ 215,000
TOTAL					\$ 215,000



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT: 800.176.089-2

COMPROBANTE DE RECAUDO SISTEMA SIPI

Radicado: NC2024/0003492
Recibo: 24-20886
Fecha: 20/03/2024

CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ
CC: 40.017.374
Pago PSE No: 944769
CUS: 525878779

NC Modificación a las reivindicaciones
Request on Patente de Invención Nacional NC2021/0008329

Detalle del pago

Id.	Rentístico	Concepto y Servicio	Cant.	Val. Unit.	Subtotal
1	50005-01-03	Modificaciones / Correcciones al registro Patente PCT (DESCUENTO INTERNET)	1	\$ 215,000	\$ 215,000
TOTAL					\$ 215,000