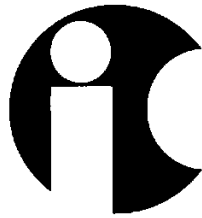




No. 11-053413-00000-0000

Fecha: 2011-05-02 15:14:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYI Eje: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 35

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. **EXPEDIENTE No.** _____

54. **TÍTULO** "PROCEDIMIENTO PARA LA
OBTENCION DE CELULAS MADRE MESENGUIMALES
A PARTIR DE LA FRACCION MONONUCLEAR DE LA
MEDULA OSEA HUMANA"

51. **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL** _____71. **SOLICITANTE** BANC DE SANG I TEIXITS**DOMICILIO** BARCELONA, ESPAÑA74. **APODERADO** HUMBERTO TUBIO CAHACHO
COD 413422. **BOGOTÁ, D.C.,** _____



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-053413-00000-0000

Fecha: 2011-05-02 15:14:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 35

PETITO

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

☒ **Patente de Invención**

☐ **Patente de Modelo de Utilidad**

☒ **Capítulo I**

☐ **Capítulo II**

SOLICITANTE Nombre y **BANC DE SANG I TEIXITS**
(71) Dirección: **Passeig Taulat, 116**
08005 Barcelona, España
Lugar de
Constitución: **Barcelona, España**

REPRESENTANTE Nombre: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO** IDENTIFICACIÓN
O APODERADO Dirección: **Carrera 7 No. 74 - 64, Of. 506** C.C. **17'192.062**
(74) Teléfono: **3132408** Fax: **3131647** T.P. **50.007 CSJ**

INVENTOR(ES) Nombre y
(72) Dirección: **VER ANEXO**

PCT (86)

Solicitud Internacional No. **PCT/ES2009/000547** Fecha **25 DE NOVIEMBRE DE 2009**
Publicación Internacional No. **WO 2010/076349** Fecha **8 DE JULIO DE 2010**

TÍTULO (54) **"PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES A PARTIR DE LA FRACCIÓN MONONUCLEAR DE LA MÉDULA ÓSEA HUMANA"**

Clasificación Internacional (51)

Prioridad	(33) País de origen	(32) Fecha	(31) Número de solicitud
SI ☒ NO	ESPAÑA	02/01/2009	P200900005

Comprobantes de pago Nos. **11-0032316** Fecha: **7 DE ABRIL DE 2011**
11-0032317 **7 DE ABRIL DE 2011**

Bap

ANEXO INVENTORES

- 1) **Joan GARCIA LOPEZ**
C/Londres 12, 8º - 2º B,
08029 Barcelona, España
- 2) **Luciano RODRIGUEZ GOMEZ**
Pg. Tramontana nº 126, 2º1ª,
08860 Castelldefels, (Barcelona), España
- 3) **Jordi Joan CAIRO BADILLO**
c/Bosch i Cardellach nº 92, 1º-2º,
08202 Sabadell, (Barcelona), España
- 4) **Pablo Arnau PLA CALVET**
c/Salvador Espriu no 25,
08173 Sant Cugat del Valles, (Barcelona), España
- 5) **Francesc GODIA CASABLANCAS**
C/Pare Sallares Nº 98,
08201 Sabadell, (Barcelona), España

**EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION
DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL**

(21) No. SOLICITUD: (51) INT. CL.:
(22) FECHA DE PRESENTACIÓN: (71) SOLICITANTE: **BANC DE SANG I TEIXITS**
(30) PRIORIDAD: **ESPAÑOLA**
(31) No. DE SOLICITUD: **P200900005** (72) INVENTORES: **Joan GARCIA LOPEZ
Luciano RODRIGUEZ GOMEZ
Jordi Joan CAIRO BADILLO
Pablo Arnau PLA CALVET
Francesc GODIA CASABLANCAS**
(32) FECHA DE PRESENTACIÓN: **2 DE ENERO DE 2009**
(33) PAÍS: (74) APODERADO: **Humberto RUBIO CAMACHO**

**Solicitud Internacional No. PCT/ES2009/000547
Publicación Internacional No. WO 2010/076349**

**Fecha 25 DE NOVIEMBRE DE 2009
Fecha 8 DE JULIO DE 2010**

FECHA ENTRADA EN FASE NACIONAL:

(54) TITULO: "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES A PARTIR DE LA FRACCIÓN MONONUCLEAR DE LA MÉDULA ÓSEA HUMANA"

RESUMEN:

Procedimiento para la obtención de células madre mesenquimales a partir de la fracción mononuclear de médula ósea humana obtenida mediante centrifugación en gradiente de densidad, caracterizado porque comprende las etapas de:

a) Recuperación y pre expansión de las células madre mesenquimales, mediante un cultivo primario, en el que las células mononucleares de médula ósea se siembran en medio de cultivo DMEM suplementado con suero AB humano (10%) siguiendo el siguiente esquema de cultivo:

i. las células mononucleares del cultivo se lavan en el día 5 con solución salina y se añade medio de cultivo suplementado con suero humano AB (10%).

ii. se recambia el medio de cultivo a los 9 días por el mismo medio anteriormente mencionado

iii. se realiza una tripsinización del cultivo primario a los 12 días. Estas células generan el cultivo de expansión (c).

b) Cultivo secundario: resiembra de las células mononucleares lavadas en (a) en medio de cultivo suplementado con suero AB humano (10%) siguiendo el siguiente esquema de cultivo:

iv. el cultivo se lava en el día 5 con solución salina y se añade medio de cultivo suplementado con suero humano AB (10%).

v. se recambia el medio de cultivo por el mismo medio anteriormente mencionado el día 9.

vi. se realiza una tripsinización del cultivo primario a los 12 días. Se recuperan las células madre mesenquimales que son congeladas y almacenada en depósitos de nitrógeno.

c) Cultivo de expansión: expansión de las células mesenquimales asiladas en (a) a los 12 días. Se resiembran y expanden estas células en medio de cultivo suplementado con suero AB humano (10%) siguiendo el siguiente esquema de cultivo:

vii. se recambia el medio de cultivo a los 3 y 6 días por el mismo medio anteriormente mencionado.

viii. se realiza una tripsinización del cultivo primario a los 12 días. Estas células se acondicionan para su traslado a quirófano.

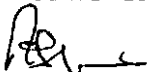
ANEXOS

- X Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- X Comprobante de pago de la tasa por excedente de Reivindicaciones
- X Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica *Adjuntamos copia autentica*
- X Poderes, si fuere el caso. *Adjuntamos copia autentica*
- X Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- Declaraciones
- X Copia de la publicación PCT
- X Copia informe búsqueda internacional. *y Opinion escrita*
- X Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- Y Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- Copia de las modificaciones efectuadas de acuerdo con el Artículo 36.2.b PCT en Fase Nacional.
- De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- Arte final 12 x 12
- De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- X Otros. *Notificación registro de cambio de dirección de solicitante (Form PCT/18/306)*

(11) Figura característica:

(12)

HUMBERTO RUBIO CAMACHO

FIRMA 

C.C. 17'192.062 de Bogotá

T.P. 50.007 Consejo Superior de la Judicatura

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0032316

Bogotá D.C., Abril 07 de 2011 - 12:59:51

RECIBIDO DE : HUMBERTO RUBIO

NI 830.000.228

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	431626160	07/04/2011	2.794.600.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	571.000.00	571.000.00
				\$571.000.00

SON: **QUINIENTOS SETENTA Y UN MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-053413-00000-0000

Fecha: 2011-05-02 15:14:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTE(IYI) Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Follos: 35

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mai: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Abril 7 de 2011 - 12:59:51

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 11 - 0032317

Bogotá D.C., Abril 07 de 2011 - 12:59:51

RECIBIDO DE : HUMBERTO RUBIO

NI 830.000.228

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	431626160	07/04/2011	2.794.600.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INICIALES	27.000.00	27.000.00
				\$27.000.00

SON: **VEINTISIETE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 11-053413- -00000-0000

Fecha: 2011-05-02 15:14:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Follos: 35

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Abril 7 de 2011 - 12:59:51

N10465



HUMBERTO RUBIO & CIA LTDA.
ABOGADOS

PODER

El abajo firmado, en nombre y representación de

POWER OF ATTORNEY

The undersigned, in the name and on behalf of

BANC DE SANG I TEIXITS

Domiciliado en:

with domicile at:

PASSEIG TAULAT, 116, 08005 BARCELONA, España

por el presente conferimos poder amplio y suficiente a HUMBERTO RUBIO CAMACHO y/o TINEKE STOL TERZANI y/o HUMBERTO RUBIO STOL y/o ALVARO DIAZ LOZANO y/o MARCELA GOMEZ RUBIO domiciliados en Bogotá, Colombia, para solicitar de las oficinas y autoridades correspondientes la obtención de registros, renovaciones, trasposos y en general todo lo relacionado con el mantenimiento, obtención y protección de sus marcas de fábrica, marcas colectivas, marcas de certificación, denominaciones comerciales, marcas de comercio y patentes, diseños industriales, modelos de utilidad, nombres de dominio, licencias sanitarias, limitaciones en los registros a cuyo efecto le faculta para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios en cumplimiento del objeto indicado; elevar solicitudes, descripciones, protestas, declaraciones, apelaciones y reclamos; abonar todos los impuestos y cuotas de cualquier otros pagos determinados por la Ley; recibir todos los documentos presentados, solicitar testimonios, desistir y enmendar solicitudes, cobrar y percibir para oponerse y protestar contra cualquier solicitud, que a juicio del apoderado, pudieran prestarse a confusión o infringir o de cualquier modo perjudicar las marcas, denominaciones o patentes del Mandante; renuncia parcial o total los derechos otorgados mediante el registro de marcas, patentes y demas modalidades de la Propiedad Industrial. A los mandatarios se les otorga autorización amplia y bastante para contestar todos los reclamos y las demandas presentadas ante autoridades administrativas y judiciales, desistir de procedimientos, transar conflictos, pudiendo así mismo sustituir este Poder en todo o en parte y revocar dichas sustituciones.

hereby grant full and sufficient Power of Attorney to a HUMBERTO RUBIO CAMACHO y/o TINEKE STOL TERZANI y/o HUMBERTO RUBIO STOL y/o ALVARO DIAZ LOZANO y/o MARCELA GOMEZ RUBIO from Bogotá, Colombia, to apply to the proper officers and authorities for the issue of registrations, renewals, assignments, proofs of renewals and in general all that is related to the maintenance, obtention and protection of its trademarks, trade names, collective marks, certification marks, commercial marks, patents, industrial designs, utility models, domain names, and sanitary licenses, limitation on registrations; to which end it empowers them to take all steps necessary before said authorities for the object stated; to file petitions, prepare descriptions; make protests, declarations, appeals and objections; pay taxes and other charges required by law; apply for certifications, receive documents and take testimony abandon and amend applications and collect refunds; to oppose, ask for the cancellation of and protest any application or registration which in their judgment could lend to confusion or could be considered an infringement or could in any form prejudice the undersigned's trademarks, trade names, patents and commercial marks; resigns partial or total the rights granted by means of the registry of marks, patents and all matters related to the Industrial Property To the said mandatory sufficient Power to answer hereby to answer in the matter of all claims and demands that maybe presented, before administrative or judicial officers of any kind, likewise Power to abandon proceeding, settle conflicts, substitute these present in whole or in part and revoke such substitutions.

Dado y firmado hoy 28 MARZO 2011
En BARCELONA

Given and signed this 28th MARCH 2011
in BARCELONA

Firma(s)/ Signature(s)

Nombre de cada firmante/ Name of signatory
Cargo de cada firmante / Position

RAMON PAU PLA ILLA

DIRECTOR GERENTE BANC DE SANG I TEIXITS

NOTARIA TREINTA Y TRES
BOGOTÁ D.C.
Desistiendo Notario 33 (E)
de Bogotá, de la constancia que este documento coincide con original que ha sido presentado.
Bogotá D.C. 02 MAYO 2011



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)
Hoy 14 de Abril de 2011
compareció(eron) personalmente
RAMON-PABLO PLA ILLA DNI 78045989-C

NOTARIAL CERTIFICATE (Corporation)
On this day of
personally appeared

a quien(es) conozco como la(s) persona(s) que
firma(n) este documento en representación de la
sociedad/compañía denominada
BANC DE SANG I TELXITS

whom I know to be the person(s) who signed this
document as representative(s) of the
corporation/company named

Certifico:
a) Que BANC DE SANG I TELXITS

I Certify:
a) That

es una sociedad/compañía legalmente constituida y
existente de acuerdo con las Leyes de
b) Que el domicilio de dicha sociedad/compañía es
PASSEIG TAULAT, 116,
08005 BARCELONA, España

is a corporation/company legally constituted and in
existence accordance with the law of
b) That the domicile of said corporation/company is

c) Que el objeto u objetos para los cuales se otorga el
presente poder están comprendidos dentro del objeto
social de la mencionada sociedad/compañía.
d) Que

c) That the purpose or purposes for which the present
Power of Attorney is granted are compromised
within the object set forth in the charter of the
mentioned corporation/company.
d) That Mr(s).

está autorizado para otorgar el presente poder. Lo
anterior está probado por medio de los documentos,
que certifico he visto.

is authorized to grant the present Power of Attorney.
The aforementioned is duly proven through the
documents and I duly verify having seen them.
State

Ciudad Barcelona hoy de 14 de Abril
de 2011.

This day of
El suscrito Notario 33 (E)
de Bogotá, deja constan-
cia que este documento
coincide con original que
ha sido presentado
Bogotá D.C. 02 MAYO 2011



Dili.

9X8419354

09/2010



GENCIA. Yo, JAIME AGUSTIN JUSTRIBÓ, Notario del Ilustre Colegio de Notarios de Catalunya, con residencia en la Ciudad de Barcelona, DOY FÉ: Que la precedente firma corresponde a DON RAMON-PABLO PLA ILLA que la ha puesto libre y voluntariamente a mi presencia, en su calidad de Director-Gerente de la Entidad "BANC DE SANG I TEIXITS" y ha manifestado conocer y consentir el contenido del anterior documento y que quiere surta los efectos que le sean propios a la legislación que al mismo y a su contenido, sea aplicable. -----

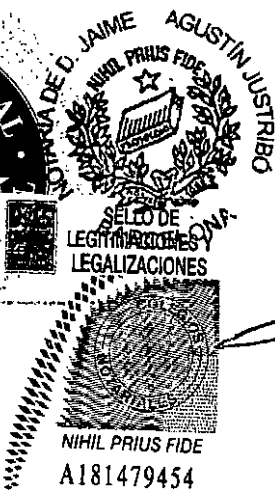
Yo, el Notario, doy fé del conocimiento del firmante, y que en su virtud legitimo la firma que antecede como propia de DON RAMON-PABLO PLA ILLA con D.N.I. número 78045989. -----

De que todo lo anterior está conforme con la acta número 779 de esta misma fecha de mi Protocolo General de Instrumentos Públicos y de que signo, firmo, rubrico y sello esta diligencia de legitimación de firma, que queda extendida en esta sola hoja de papel timbrado del Estado, de uso exclusivo para documentos notariales, en Barcelona a 14 de abril de 2010.

Asiento número 454 de mi Libro Indicador, Sección 33 (E).

2°.

NOTARIA TREINTA Y TRES BOGOTA D.C.
El suscrito Notario, Sección 33 (E) de Bogotá, deja constancia que este documento coincide con original que ha sido presentado. Bogotá D.C. 02 MAYO 2010



Dili.

A15290219

10/2010



A P O S T I L L E

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País **ESPAÑA**-----
- El presente documento público -----
2. ha sido firmado por **DON JAIME AGUSTIN JUSTRIBO** -----
3. quien actúa en calidad de Notario, en legitimación de firma de don Ramón-Pablo Pla Illa, en documento de poder, en representación de **BANC DE SANG I TEIXITS**, conforme Acta, número 779/2011, de fecha 14 de abril de 2011, cuya firma ha sido extendida en el folio número 9X8419354 de papel exclusivo para documentos notariales. -----
4. y está revestido del sello/timbre de su Notaría de **BARCELONA**-----

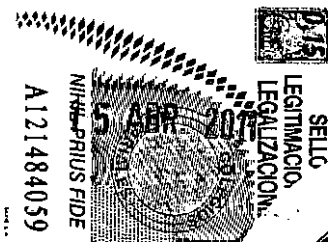
CERTIFICADO

5. en **BARCELONA**-----
6. el día 15 de abril de 2011-----
7. por **DON JOAN CARLES OLLÉ FAVARÓ**, Decano de la **Justicia Directiva** del Ilustre Colegio Notarial de Cataluña. -----
8. bajo el número: -20925/2011-----
9. Sello/timbre: -----
10. Firma: -----

NOTARIA TREINTA Y TRES
BOGOTÁ D.C.

El suscrito Notario 33 (E) de Bogotá, deja constancia que este documento coincide con original que ha sido presentado. Bogotá D.C.

02 MAYO 2011



Joan Carles Ollé Favaró
Decano

N10465



CESION

El abajo firmado(s)

- 1.- GARCIA LOPEZ, Joan
- 2.- RODRIGUEZ GOMEZ, Luciano
- 3.- CAIRO BADILLO, Jordi Joan
- 4.- PLA CALVET, Arnau
- 5.- GODIA CASABLANCAS, Francesc

Domiciliado(s) en:

- 1.- c/ Londres 12, 8º-2º B,
08029 BARCELONA, España
- 2.- Pg. Tramontana nº 126, 2ª1ª
08860 CASTELLDEFELS (BARCELONA), España
- 3.- c/ Bosch i Cardellach nº 92, 1º-2º
08202 SABADELL (BARCELONA), España
- 4.- c/ Salvador Espriu nº 25
08173 SANT CUGAT DEL VALLES (BARCELONA), España
- 5.- c/ Pare Sallares nº 98
08201 SABADELL (BARCELONA), España

Declaro bajo juramento ser único(s) y verdadero(s) inventor(es) de la solicitud de patente PCT nº
PCT/ES2009/000547

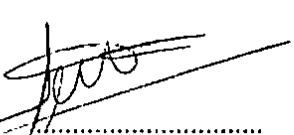
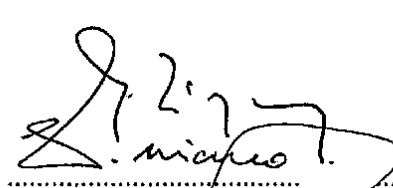
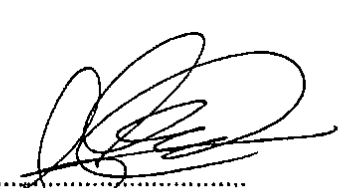
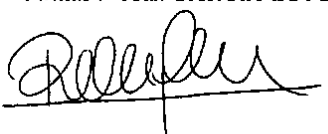
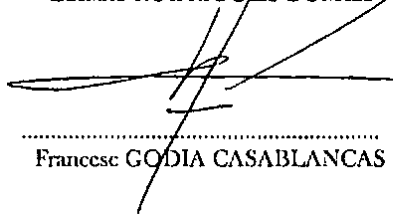
"PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE CELULAS MADRE MESENQUIMALES A PARTIR DE LA
FRACCION MONONUCLEAR DE LA MEDULA OSEA HUMANA"

Declaro asimismo que cede y transfiere, sin limitación, a favor de la sociedad :
BANC DE SANG I TEIXITS

Domiciliada en : PASSEIG TAULAT, 116, 08005 BARCELONA, España

Todos los derechos inherentes a dicha invención y que la citada sociedad queda facultada para
solicitar en su nombre la patente correspondiente en la República de

COLOMBIA

 Firmas : Joan GARCIA LOPEZ	 Luciano RODRIGUEZ GOMEZ	 Jordi Joan CAIRO BADILLO
 Arnau PLA CALVET	 Francesc GODIA CASABLANCAS	

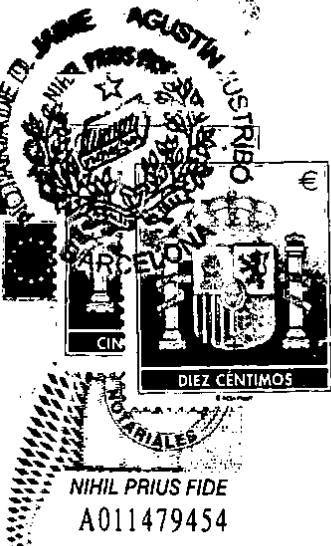
LEGITIMACIÓN DE FIRMAS.-

Yo, **JAIME AGUSTÍN JUSTRIBÓ**, Notario del Ilustre Colegio de Notarios de Cataluña, con residencia en la ciudad de Barcelona, DOY FE.

Que juzgo como pertenecientes a **DON JOAN GARCIA LOPEZ** con DNI nº 37656437D, **DON LUCIANO RODRIGUEZ GOMEZ** con DNI nº 46727372C, **DON JORDI JOAN CAIRO BADILLO** con DNI nº 33870321S, **DON ARNAU PLA CALVET** con DNI nº 52593676J y a **DON FRANCESC GODIA CASABLANCAS** con DNI nº 39043282T, las firmas que anteceden por conocerlas personalmente.

Barcelona, a catorce de abril de dos mil once.

Asiento nº 452/2011 de mi Libro Indicador, Sección 2ª.



[Handwritten signature]



EL SÍGNO, FIRMAY NOTIFICÓ EL NOTARIO QUE OSRA EN ESTE SOLIO, HABIENDO SIDO AL SEÑALADO EN EL LIBRO REGISTRO DEL COLEGIO NOTARIAL DE CATALUÑA, EL NÚMERO 452/2011, EN EL NÚMERO 452/2011.

A15290218

10/2010



A P O S T I L L E

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País **ESPAÑA**-----
 El presente documento público -----
 2. ha sido firmado por DON JAIME AGUSTIN JUSTRIBO -----
 3. quien actúa en calidad de Notario, en legitimación de firmas de
 don Joan García López, don Luciano Rodríguez Gómez, don Jordi -
 Joan Cairo Badillo, don Arnau Pla Calvet y don Francesc Godia -
 Casablanas, en documento de cesión, anotado en el libro -----
 indicador con el número 452, de fecha 14 de abril de 2011. ----
 4. y está revestido del sello/timbre de su Notaría de -----
 BARCELONA-----

CERTIFICADO

5. en BARCELONA----- 6. el día 15 de abril de 2011-----
 7. por DON JOAN CARLES OLLÉ FAVARÓ, Decano de la Junta Directiva -
 del Ilustre Colegio Notarial de Cataluña. -----
 8. bajo el número: -20922/2011-----
 9. Sello/timbre: 10. Firma:



Joan Carles Ollé Favaró
Decano

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
8 de julio de 2010 (08.07.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/076349 A2

- (51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin clasificar
- (21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES2009/000547
- (22) Fecha de presentación internacional: 25 de noviembre de 2009 (25.11.2009)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad: P200900005 2 de enero de 2009 (02.01.2009) ES
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): BANC DE SANG I TEIXITS [ES/ES]; Passeig De La Vall D'hebron, 119-129, E-08035 Barcelona (ES).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): GARCIA LOPEZ, Joan [ES/ES]; C/Londres 12, 8º-2º B, 08029 Barcelona (ES). RODRIGUEZ GOMEZ, Luciano [ES/ES]; Pg. Tramontana nº126, 2º1ª, 08860 Castelldefels (Barcelona) (ES). CAIRO BADILLO, Jordi, Joan [ES/ES]; c/Bosch i Cardellach nº92, 1º-2º, 08202 Sabadell (Barcelona) (ES). PLA CALVET, Arnau [ES/ES]; c/Salvador Espriu nº25, 08173 Sant Cugat del Valles (Barcelona) (ES). GODIA CASABLANCAS, Francesc [ES/ES]; C/Parc Sallares Nº98, 08201 Sabadell (Barcelona) (ES).
- (74) Mandatario: DURAN-MOYA, Carlos; c/o Duran-Corretjer, Corsega 329, 08037 Barcelona (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

- sobre la identidad del inventor (Regla 4.17(i))
- sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv))

Publicada:

- sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING CONNECTIVE STEM CELLS FROM THE MONONUCLEAR FRACTION OF HUMAN BONE MARROW

(54) Título : PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES A PARTIR DE LA FRACCIÓN MONONUCLEAR DE LA MÉDULA ÓSEA HUMANA

(57) Abstract: The present invention relates to a method for obtaining connective stem cells from the mononuclear fraction of human bone marrow cells using type AB human serum as a supplement. Said method includes the steps of obtaining said mononuclear fraction of bone marrow, the step of recovering and pre-expanding the connective stem cells, and the step of expanding the connective stem cells until obtaining the clinical dose required for the therapeutic use thereof.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de células madre mesenquimales a partir de la fracción mononuclear de células de médula ósea humana que utiliza como suplemento suero humano del tipo AB. Dicho procedimiento comprende las etapas de obtención de dicha fracción mononuclear de médula ósea, la etapa de recuperación y pre-expansión de las células madre mesenquimales, y la etapa de expansión de las células madres mesenquimales hasta la obtención de la dosis clínica necesaria para su uso terapéutico.

WO 2010/076349 A2

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
8 de julio de 2010 (08.07.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/076349 A2

- | | |
|---|---|
| <p>(51) Clasificación Internacional de Patentes: Sin clasificar</p> <p>(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2009/000547</p> <p>(22) Fecha de presentación internacional:
25 de noviembre de 2009 (25.11.2009)</p> <p>(25) Idioma de presentación: español</p> <p>(26) Idioma de publicación: español</p> <p>(30) Datos relativos a la prioridad:
P200900005 2 de enero de 2009 (02.01.2009) ES</p> <p>(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo los países de la región de la OAPI)</p> | <p>(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.</p> <p>(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible):</p> |
|---|---|

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES
PCT

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(Artículo 18 y Reglas 43 y 44 del PCT)

Referencia del expediente del solicitante o del mandatario	PARA CONTINUAR LA TRAMITACIÓN	ver Formulario PCT/ISA/220 y, en su caso, el punto 5 de esta hoja.
Solicitud internacional N° PCT/ ES 2009/000547	Fecha de presentación internacional (día/mes/año) 25 Noviembre 2009 (25.11.2009)	Fecha de prioridad (la más antigua) (día/mes/año) 02 Enero 2009 (02.01.2009)
Solicitante BANC DE SNAG I TEIXITS, GARCIA LÓPEZ, Joan y OTROS.		

El presente informe de búsqueda internacional, elaborado por esta Administración encargada de la búsqueda internacional, se transmite al solicitante, conforme al Artículo 18. Se remite una copia del mismo a la Oficina Internacional.

Este informe de búsqueda internacional comprende un total de 4 hojas.

☒ Se adjunta una copia de cada uno de los documentos del estado de la técnica citados en el informe.

1. Base del informe

a. En lo que se refiere al idioma, la búsqueda internacional se ha realizado sobre la base de:

☒ la solicitud en el idioma en el que se presentó

☐ una traducción de la solicitud al _____, que es el idioma de la traducción proporcionada a los fines de la búsqueda internacional (Reglas 12.3.a) y 23.1.b))

b. ☐ Este informe de búsqueda internacional se ha realizado teniendo en cuenta la rectificación de un error evidente autorizado por o notificado a esta Administración según la Regla 91 (Regla 43.6bis. a)).

c. ☐ En lo que se refiere a las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos divulgadas en la solicitud internacional, véase Recuadro I.

2. ☐ Se estima que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (ver Recuadro II).

3. ☐ Falta unidad de invención (ver Recuadro III).

4. Con respecto al título,

☒ el texto se aprueba según fue remitido por el solicitante.

☐ el texto ha sido establecido por esta Administración con la siguiente redacción:

5. Con respecto al resumen,

☒ el texto se aprueba según fue remitido por el solicitante.

☐ el texto (reproducido en el Recuadro IV) ha sido establecido por esta Administración de conformidad con la Regla 38.2).

El solicitante puede presentar observaciones a esta Administración en el plazo de un mes a contar desde la fecha de expedición del presente informe de búsqueda internacional.

6. Con respecto a los dibujos,

a. la figura de los dibujos a publicar junto con el resumen es la Figura N° _____

☐ propuesta por el solicitante.

☐ propuesta por esta Administración, por no haber propuesto el solicitante ninguna figura.

☐ propuesta por esta Administración, por caracterizar mejor, esta figura, la invención.

b. ☒ no debe publicarse ninguna figura.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional Nº

PCT/ ES 2009/000547

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 5/0775 (2010.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones Nº
A	LE BLANC, K., <i>et al.</i> Generation of immunosuppressive mesenchymal stem cells in allogeneic human serum. Transplantation. 27-10-2007. Vol. 84, nº 8, páginas 1055-1059. Ver todo el documento, especialmente resumen, página 1055 y figura 1.	1-11
A	PHADNIS, S.M., <i>et al.</i> Human umbilical cord serum promotes growth, proliferation, as well as differentiation of human bones marrow-derived progenitor cells. In vitro Cell. Dev. Biol.-Animal. Noviembre-2006. Vol. 42, páginas 283-286. Ver todo el documento, especialmente resumen y página 285.	1-11

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.		
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.		
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"Q" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

02 Marzo 2010 (02.03.2010)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

04- MARZO- 2010 (04/03/2010)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

Funcionario autorizado

B. Pérez Esteban

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Nº de teléfono +34 91 349 84 84

Formulario PCT/ISA/210 (segunda hoja) (Julio 2009)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/000547

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
A	WO 2007085210 A2 (UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE, USTAV HEMATOLOGIE A KREVNI TRANSFUZE, USTAV MAKROMOLEKULARNI CHEMIE AV CR) 02.08.2007. Ver resumen; página 8, línea 10 - página 9, línea 23; página 14, línea 27 - página 19, línea 35; ejemplos 1, 2 y 5; tabla 7; reivindicaciones 1, 3, 4, 5 y 6; figura 4.	1-11
A	KOCAOEMER, A., <i>et al.</i> Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. Stem Cells. 2007. Vol. 25, n° 5, páginas 1270-1278. Publicado on line el 25 de enero de 2007. Ver todo el documento, especialmente resumen, introducción, materiales y métodos y discusión.	1-11
A	WO 2007037682 A1 (GLYCOSTEM B.V.) 05.04.2007, Ver página 3, línea 9 - página 6, línea 23; página 8, líneas 8-12; página 9, línea 21 - página 12, línea 24; reivindicaciones 1, 4, 5 y 8.	1-11
A	CN 101298606 A ((FIRM-N) CONSULTANT FIRM) 05.11.2008, (resumen) WPI/Thomson [en línea], Londres (Reino Unido) [recuperado el 18- 06- 2009], recuperado de EPOQUENET, EPO, DW200910, n° de acceso 2009-B37080.	1-11

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/000547

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO 2007085210 A	02.08.2007	CZ 301148 B CZ 20060049 A EP 20070702321 US 2009305406 A	18.11.2009 01.08.2007 23.01.2007 10.12.2009 10.12.2009
WO 2007037682 A	05.04.2007	EP 1941027 A EP 20060799473 US 2009017539 A	09.07.2008 28.09.2006 15.01.2009
CN 101298606 A	05.11.2008	NINGUNO	-----

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

Remitente: LA ADMINISTRACIÓN ENCARGADA
DE LA BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Destinatario:

DURÁN MOYA, Carlos
c/o DURÁN CORRETJER
C/ CÒRSEGA, nº 329
C. P. 08037 -BARCELONA
- ESPAÑA -

PCT

OPINIÓN ESCRITA DE LA ADMINISTRACIÓN
ENCARGADA DE LA BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(Regla 43bis.1 del PCT)

Fecha de expedición (día/mes/año)		04- MARZO- 2010 (04/03/2010)
Referencia del expediente del solicitante o del mandatario		PARA CONTINUAR LA TRAMITACIÓN Véase el punto 2
Solicitud internacional Nº	Fecha de presentación internacional (día/mes/año)	Fecha de prioridad (día/mes/año)
PCT/ES2009/000547	25 NOVIEMBRE 2009 (25.11.2009)	02 ENERO 2009 (02.01.2009)
Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o a la vez clasificación nacional e CIP C12N 5/0775 (2010.01)		
Solicitante BANC DE SNAG I TEIXITS, GARCIA LÓPEZ, Joan y OTROS.		

1. La presente opinión contiene indicaciones relativas a los puntos siguientes:

- ☒ Recuadro I Base de la opinión
- ☐ Recuadro II Prioridad
- ☐ Recuadro III No formulación de opinión sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial
- ☐ Recuadro IV Falta de unidad de invención
- ☒ Recuadro V Declaración motivada según la Regla 43bis.1.a)i) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración
- ☐ Recuadro VI Ciertos documentos citados
- ☐ Recuadro VII Defectos en la solicitud internacional
- ☐ Recuadro VIII Observaciones relativas a la solicitud internacional

2. CONTINUACIÓN DE LA TRAMITACIÓN

Si se hace una petición de examen preliminar internacional, esta opinión se considerará como una opinión escrita de la Administración encargada del examen preliminar internacional ("IPEA") salvo en aquellos casos en los que el solicitante elija una Administración distinta a ésta y, la IPEA elegida haya notificado a la Oficina Internacional según lo previsto en la Regla 66.1bis(b) que las opiniones escritas de esta Administración encargada de la búsqueda internacional no serán consideradas como tales.

Si esta opinión es, como se indica más arriba, considerada como una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a que presente ante la IPEA una respuesta por escrito junto con modificaciones, en su caso, antes de la expiración del plazo de 3 meses a contar desde la fecha de envío del formulario PCT/ISA/220 o antes de la expiración del plazo de 22 meses a contar desde la fecha de prioridad, aplicándose el plazo que expire más tarde.

Para otras opciones, consultar el formulario PCT/ISA/220.

3. Para más detalles, ver las notas del formulario PCT/ISA/220.

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España) Nº de fax: 91 349 53 04	Fecha en que se ha concluido efectivamente esta opinión 02 marzo 2010 (02.03.2010)	Funcionario autorizado Pérez Esteban, Beatriz Nº de teléfono: 91 349 84 84
--	--	---

Formulario PCT/ISA/237 (Primera página)(Julio 2009)

OPINIÓN ESCRITA DE LA ADMINISTRACIÓN
ENCARGADA DE LA BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ES2009/000547

Recuadro 1. Base de la opinión

1. Por lo que respecta al idioma esta opinión se ha establecido sobre la base de:

- ☒ la solicitud internacional en el idioma en el cual se depositó
- ☐ una traducción de la solicitud original al _____, que es el idioma de una traducción proporcionada a los fines de la búsqueda internacional (según las Reglas 12.3.a) y 23.1.b)).

2. ☐ Esta opinión se ha establecido teniendo en cuenta la **rectificación de un error evidente** autorizado por o notificado a esta Administración según la Regla 91 (Regla 43bis.1 a)).

3. En lo que se refiere a las **secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos** divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido sobre la base de una lista de secuencias presentada o entregada:

a. Medios

- ☐ en papel
- ☐ en formato electrónico

b. Cuando

- ☐ en la solicitud internacional tal y como se presentó
- ☐ presentado junto con la solicitud internacional en formato electrónico
- ☐ presentado posteriormente a esta Administración a los fines de la búsqueda

4. ☐ Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias y/o tabla relacionada con ella, se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.

5. Comentarios adicionales:

**OPINIÓN ESCRITA DE LA ADMINISTRACIÓN
ENCARGADA DE LA BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud internacional N°

PCT/ES2009/000547

Recuadro V. Declaración motivada según la Regla 43bis.1.a)i) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

1. Declaración

Novedad	Reivindicaciones	1-11	SÍ
	Reivindicaciones	_____	NO
Actividad inventiva	Reivindicaciones	1-11	SÍ
	Reivindicaciones	_____	NO
Aplicación industrial	Reivindicaciones	1-11	SÍ
	Reivindicaciones	_____	NO

2. Citas y explicaciones

Documentos tenidos en consideración.

Doc.	Número Publicación o Identificación	Fecha Pub.
D01	LE BLANC, K., <i>et al.</i>	27-10-2007
D02	PHADNIS, S.M., <i>et al.</i>	11-2006
D03	WO 2007085210 A2	02-08-2007
D04	KOCAOEMER, A., <i>et al.</i>	25-01-2007
D05	WO 2007037682 A1	05-04-2007
D06	CN 101298606 A	05-11-2008

La presente solicitud internacional describe y reivindica un procedimiento de obtención de células madre mesenquimales. En el proceso, las células se aíslan de la fracción mononuclear de la médula ósea, y el medio de cultivo se suplementa con suero humano del tipo AB.

Aunque se han encontrado numerosos documentos en el estado de la técnica que divulgan procesos de obtención de células madre mesenquimales con fines terapéuticos, empleando medios de cultivo suplementados con suero AB humano, ninguno de los procedimientos coincide con el presentado en la solicitud. Entre otros detalles, difieren en el origen de las células madre mesenquimales, los medios de cultivo utilizados, los inóculos y los tiempos de cultivo, los lavados de las células, el rendimiento de los cultivos, la forma de conservación de las células obtenidas, o en que no se genera una copia de seguridad por congelación de un cultivo secundario. Por todo ello, la solicitud se considera nueva y con actividad inventiva según los artículos 33(2) y 33(3) del PCT.

Se han seleccionado algunos documentos del estado de la técnica especialmente relacionados con la solicitud, y que, en ningún caso anularían la novedad ni la actividad inventiva de la solicitud internacional.

Continúa en página siguiente...

Continuación Recuadro V. Declaración motivada según la Regla 43bis.1.a)ii) sobre la novedad, la actividad inventiva y la aplicación industrial; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración
Continuación 2.

En el documento D01 se divulga un método de cultivo de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea. El medio de cultivo empleado es el mismo que el de la solicitud (DMEM), pero en D01 se emplea un medio bajo en glucosa. Como se puede observar en la primera página del documento y en la figura 1, la adición al medio de suero AB al 10% favorece la proliferación de las células frente al uso de suero fetal bovino a la misma concentración. Las etapas del protocolo divulgado son diferentes a las de la solicitud, y en ningún paso del procedimiento se contempla la generación de un cultivo secundario que sirva de copia de seguridad.

En D02 también se emplea DMEM como medio de cultivo para la proliferación de las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, y se estudia el efecto de la adición de distintos suplementos al medio de cultivo. Además de suero fetal bovino y suero humano AB, se mide la proliferación celular en presencia de suero de sangre de cordón umbilical, y se demuestra que este último es el más eficaz a efectos de crecimiento, mantenimiento y diferenciación celular.

El documento D03 divulga otro método de cultivo de células madre mesenquimales derivadas de la fracción mononuclear de la médula ósea, pero en este caso el medio de cultivo utilizado no es DMEM, sino un medio certificado para uso clínico, que se suplementa, entre otras cosas, con suero humano al 10%, preferentemente con suero AB Rh negativo. La concentración de células empleadas para el inóculo del cultivo, los suplementos empleados y los tiempos de cultivo son diferentes a los de la solicitud internacional; además, en el procedimiento de D03 no se realizan cambios de medio de cultivo, y se descartan las células no adheridas, en lugar de emplearlas en un cultivo secundario que sirviera como copia de seguridad. Al igual que en la solicitud, en D03 se realiza un cultivo de expansión, pero en este caso el medio es alfa-MEM suplementado con suero fetal bovino, y no con suero humano AB.

En los documentos D04, D05 y D06 las células madre mesenquimales que se cultivan proceden de órganos o tejidos diferentes de la médula ósea. En todos los casos se emplea suero humano AB como suplemento del cultivo (aunque no sea el único suplemento utilizado), pero el procedimiento de cultivo celular no coincide en ningún caso con el de la solicitud. Tan solo en el documento D06 se contempla el cultivo de células madre de segunda y tercera generación y la conservación de tales células para su posterior uso en clínica.

La presente solicitud internacional cumple el requisito de aplicabilidad industrial según el artículo 33(4) del PCT en el campo técnico de desarrollo de medios de cultivo de células madre mesenquimales y en la obtención de cultivos de estas células en cantidad suficiente para su uso en clínica.

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

To:

DURAN-MOYA, Carlos
c/o Duran-Corretjer
Corsega 329
08037 Barcelona
ESPAGNE

Date of mailing (day/month/year) 31 January 2011 (31.01.2011)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference 9983	
International application No. PCT/ES2009/000547	International filing date (day/month/year) 25 November 2009 (25.11.2009)

1. The following indications appeared on record concerning:		
☒ the applicant	☐ the inventor	☐ the agent
☐ the common representative		
Name and Address BANC DE SANG I TEIXITS Passeig De La Vall D'hebron, 119-129 E-08035 Barcelona Spain	State of Nationality ES	State of Residence ES
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:		
☐ the person	☐ the name	☒ the address
☐ the nationality		
☐ the residence		
Name and Address BANC DE SANG I TEIXITS Passeig Taulat, 116 08005 Barcelona Spain	State of Nationality ES	State of Residence ES
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	E-mail address ☐ Notifications by e-mail authorized	

3. Further observations, if necessary:
--

4. A copy of this notification has been sent to:	
☐ the receiving Office	☐ the International Preliminary Examining Authority
☐ the International Searching Authority	☒ the designated Offices concerned
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search	☐ the elected Offices concerned
	☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Perez Reina Luis e-mail pt09.pct@wipo.int Telephone No. +41 22 338 74 09
---	--

Facsimile No. +41 22 338 71 30

Form PCT/LB/306 (January 2009)

1/EQZG4BXL0

PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS
MADRE MESENQUIMALES A PARTIR DE LA FRACCIÓN
MONONUCLEAR DE LA MÉDULA ÓSEA HUMANA

5

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de células madre mesenquimales. Más específicamente, la presente invención se refiere a un
10 procedimiento de obtención de células madre mesenquimales a partir de la fracción mononuclear de células de médula ósea humana. Dicho procedimiento comprende las etapas de obtención de dicha fracción mononuclear de médula ósea, la etapa de recuperación y pre-expansión de las células madre
15 mesenquimales, y la etapa de expansión de las células madres mesenquimales hasta la obtención de la dosis clínica necesaria para su posible uso terapéutico.

Las células madre mesenquimales (CMM) son células multipotentes, que han mostrado su eficacia en el
20 tratamiento de lesiones musculoesqueléticas y en el mejoramiento de la función cardíaca en enfermedades cardiovasculares (Le Blanc K., Pittenger M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. Cytotherapy 2005;7:36-45). Las CMM pueden ser aisladas de varios tejidos de
25 adultos, entre los que se encuentran la médula ósea, tejido adiposo y sangre del cordón umbilical. Además, dichas células pueden ser expandidas ex vivo.

La fracción de mononuclear médula ósea (CMN) se obtiene mediante una operación de separación basada en la
30 centrifugación de sangre proveniente de la médula ósea. La CMN es un conjunto heterogéneo de células, entre las que se pueden encontrar, además de las células madre mesenquimales, las células hematopoyéticas progenitoras. Estas dos poblaciones se encuentran en una concentración
35 muy baja respecto a las células hematopoyéticas maduras, también presentes en las CMN.

Fridenshtein y otros (Fridenshtein A. J.,

Deriglazova U. F., Kulagina N. N. et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. Exp. Hematol. 1974 Vol. 2. P. 83-92) obtuvieron por primera vez
5 células madre mesenquimales a partir de médula ósea, basándose en la capacidad de las células madre mesenquimales para adherirse a superficies plásticas, propiedad que no poseen la mayoría de las células hematopoyéticas. La desventaja de este método es el bajo
10 rendimiento obtenido en la recuperación de células mesenquimales atribuible a la baja prevalencia de este tipo celular en la médula ósea, que se estima entre el 0,001 al 0,01% (Alhadlag A and Mao J. Mesenchymal Stem Cells: Isolation and Therapeutics. Stem Cells and Development.
15 2004. 13: 436-448 (3). Sin embargo, la adhesión a plásticos se ha establecido como punto de partida para seguir mejorando los métodos de obtención de células madre mesenquimales.

Heynesworth y otros han logrado obtener células
20 madre mesenquimales con una alta capacidad de adherencia, elevada tasa de proliferación y el mantenimiento de la multipotencialidad durante un período de tiempo largo (Heynesworth S. E., Goshima J., Goldberg V. M., Calplan A. I. Characterization of cells with osteogenic potential from
25 the human bone marrow//Bone. 1995. Vol. 13. P. 81-85.) utilizando suero fetal bovino como suplemento del medio de cultivo. La desventaja de este método consiste en que el hecho de que la búsqueda de un lote adecuado para el cultivo de las células y el análisis correspondiente del
30 suero fetal bovino conlleva mucho tiempo y es muy trabajoso. Además, debido a la gran variación lote a lote que presenta el suero fetal bovino, no es posible garantizar la reproducibilidad de los resultados.

Otra desventaja de este método es que para obtener
35 las cantidades suficientes de células madres mesenquimales para su uso clínico, las células deben ser cultivadas entre 4 y 6 semanas, e incluso en algunas circunstancias, tales

como en pacientes con enfermedades del metabolismo óseo, el tiempo de cultivo puede ser superior. La razón por la que se necesitan estos tiempos tan elevados de cultivo, como se ha mencionado anteriormente, es la poca cantidad de células mesenquimales que es posible obtener de la médula ósea.

Un periodo largo de cultivo celular puede aumentar el riesgo de contaminación y aumenta considerablemente los costes de mantenimiento del cultivo. Además, a medida que aumenta el número de duplicaciones se corre el riesgo de que las células pierdan multipotencialidad o entren en senescencia, lo que compromete su capacidad terapéutica.

La metodología utilizada habitualmente para buscar una disminución de los tiempos de cultivo de células mesenquimales centra su atención en factores tales como los suplementos del medio de cultivo, el tipo de superficie plástica, la dosis de siembra y los medios de cultivo empleados (Sotiropoulou PA, Pérez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. Stem Cells 2006; 24: 462-471).

Un objetivo de la presente invención es dar a conocer un procedimiento de cultivo ex vivo de células madre mesenquimales a partir de médula ósea humana en el que se reduce el tiempo y el número de duplicaciones necesarias para la obtención de la dosis clínica de células madres mesenquimales, cuando se compara con los métodos tradicionales. Este procedimiento se basa en el efecto sinérgico a partir de combinar unas condiciones muy específicas de aislamiento de células mesenquimales a partir de la fracción mononuclear de médula ósea, con la utilización de suero humano del grupo sanguíneo AB como suplemento del medio de cultivo. Este se usa en sustitución de costoso y poco reproducible suero fetal bovino. Además, el suero AB humano presenta las ventajas de ser más económico y tener mayor reproducibilidad que el suero fetal bovino. A su vez, las condiciones de aislamiento propuestas

facilitan la recuperación de un mayor número de células mesenquimales de la fracción mononuclear con respecto a las condiciones utilizadas en las estrategias convencionales. Este hecho es de especial relevancia si se tiene en cuenta
5 que cuando más elevado sea el número inicial de células mesenquimales aisladas disponibles menor es el tiempo y recursos necesarios para la obtención de la dosis clínica requerida.

Dichas condiciones de aislamiento se han obtenido
10 mediante el estudio sistemático de la influencia sobre la recuperación de células mesenquimales a partir del inóculo y el tiempo de lavado de las células mononucleares de médula ósea en medios de cultivo suplementados con suero humano AB.

15 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento que permita disponer de una copia idéntica de seguridad de las células madres mesenquimales, que poseen las mismas características de las células madre mesenquimales iniciales en cuanto a capacidad
20 de proliferación y diferenciación.

El procedimiento de la presente invención puede ser aplicado para la obtención de células mesenquimales provenientes de otras fuentes, tales como tejido adiposo, páncreas, hígado, músculo esquelético, dermis, membrana
25 sinovial, hueso trabecular, sangre de cordón umbilical, tejido pulmonar, pulpa dental y ligamento periodontal. En el caso que la fuente de células mesenquimales sea diferente a la médula ósea, el tratamiento inicial de la muestra será diferente, adecuándose para cada tipo celular
30 que se utilice como fuente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En consecuencia, un objetivo de la presente invención es dar a conocer un procedimiento para la obtención de células madre mesenquimales a partir de la
35 fracción mononuclear de médula ósea humana, obtenida mediante centrifugación en gradiente de densidad, caracterizado porque comprende las etapas de:

a) Recuperación y pre expansión de las células madre mesenquimales, mediante un cultivo primario, en el que las células mononucleares de médula ósea se siembran en medio de cultivo DMEM suplementado con suero AB humano (10%)

5 siguiendo el siguiente esquema de cultivo:

- las células mononucleares del cultivo se lavan en el día 5 con solución salina y se añade medio de cultivo suplementado con suero humano AB (10%).

10 - se recambia el medio de cultivo a los 9 días por el mismo medio anteriormente mencionado

- se realiza una tripsinización del cultivo primario a los 12 días. Estas células generan el cultivo de expansión (c).

b) Cultivo secundario: resiembra de las células
15 mononucleares lavadas en (a) en medio de cultivo suplementado con suero AB humano (10%) siguiendo el siguiente esquema de cultivo:

20 - el cultivo se lava en el día 5 con solución salina y se añade medio de cultivo suplementado con suero humano AB (10%).

- se recambia el medio de cultivo por el mismo medio anteriormente mencionado el día 9.

25 - se realiza una tripsinización del cultivo primario a los 12 días. Se recuperan las células madre mesenquimales que son congeladas y almacenada en depósitos de nitrógeno.

c) Cultivo de expansión: expansión de las células mesenquimales asiladas en (a) a los 12 días. Se resiembran y expanden estas células en medio de cultivo suplementado
30 con suero AB humano (10%) siguiendo el siguiente esquema de cultivo:

- se recambia el medio de cultivo a los 3 y 6 días por el mismo medio anteriormente mencionado.

35 - se realiza una tripsinización del cultivo primario a los 12 días. Estas células se acondicionan para su traslado a quirófano.

En una realización preferente en el cultivo primario se siembran entre 200 000 y 400 000 células por centímetro cuadrado de superficie. Además, preferentemente el medio de cultivo utilizado, tanto en el cultivo primario como en el
5 secundario (etapa b), es Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) con un suplemento de suero AB humano al 10% (v/v).

El procedimiento de la presente invención es ventajoso en cuanto a que se logra obtener un elevado número de células madre mesenquimales, entre $40 \cdot 10^6$ y
10 $50 \cdot 10^6$, con un número reducido de duplicaciones, entre 6 y 8, y un intervalo de tiempo (alrededor de 20 días) menor que en los procesos tradicionales.

Además, una ventaja adicional es que se logra, mediante la congelación de las células madre mesenquimales
15 obtenidas en el cultivo secundario (etapa (b)), generar la dosis requerida de células en caso de pérdida del proceso por causas accidentales o de poseer una copia idéntica de seguridad células madre mesenquimales.

El procedimiento de la presente invención también
20 posee las ventajas adicionales de una manipulación sencilla y costes reducidos, al no necesitarse un cultivo extensivo, ni utilizarse suero fetal bovino.

La presente invención es descrita en lo adelante en más detalle en referencia a un ejemplo. Este ejemplo, sin
25 embargo, no está destinado a limitar el alcance técnico de la presente invención.

EJEMPLO 1

Se inocularon 300 000 células mononucleares de médula ósea por centímetro cuadrado, obtenidas mediante
30 gradiente de centrifugación de una extracción de sangre de médula ósea, en un frasco de cultivo comercial de 636 cm², que contenía medio DMEM suplementado con suero AB humano (10%). A los 5 días se lavó el cultivo y el sobrenadante se resembró en un segundo frasco de cultivo comercial de 636
35 cm², que contenía medio DMEM suplementado con suero AB humano (10%). Al cultivo primario se le añadió medio de cultivo (DMEM suplementado con suero AB humano (10%)) con

una relación área de cultivo/volumen de medio (3/1). A los 9 días se cambió el medio de cultivo y se añadió medio de cultivo (DMEM suplementado con suero AB humano (10%)) con una relación área de cultivo/volumen de medio (3/1). A los 5 12 días se realizó una tripsinización del cultivo y se obtuvieron entre $15 \cdot 10^6$ y $20 \cdot 10^6$ células madre mesenquimales con una pureza de alrededor de 80%. Estas células se sembraron en dos frascos de cultivo comercial de 636 cm^2 , que contenían medio DMEM suplementado con suero AB humano 10 (10%), con una densidad de $4000 \text{ células/cm}^2$. Se cultivaron las células durante 8 días, en los que se realizó dos recambios de medio (días 3 y 6), empleando medio DMEM suplementado con suero AB humano (10%) con una relación área de cultivo/volumen de medio (3/1).

15 Las células no adheridas en el cultivo primario, que fueron sembradas en un cultivo secundario (etapa (b)), fueron lavadas a los 5 días desde el inicio del cultivo secundario (etapa (b)) y el lavado fue desechado. El día 9 se cambió el medio de cultivo y se añadió medio de cultivo 20 (DMEM suplementado con suero AB humano (10%)) con una relación área de cultivo/volumen de medio (3/1). A los 12 días se realizó una tripsinización del cultivo y se obtuvieron entre $3 \cdot 10^6$ y $6 \cdot 10^6$ células madre mesenquimales con una pureza de alrededor de 65%. Las células obtenidas 25 fueron congeladas en tanques de nitrógeno.

Las células obtenidas en el cultivo primario mostraron un perfil inmunofenotípico con co-expresión de los marcadores 105, 90, 73 y falta de expresión de los marcadores CD45, CD31, HLA-DR, asociados habitualmente a 30 las células madre mesenquimales provenientes de médula ósea. Además, las células obtenidas mostraron capacidad de diferenciación hacia el linaje óseo, hecho que pone de manifiesto el mantenimiento de la capacidad multipotencial. Por otro lado, las células obtenidas en el cultivo 35 secundario (etapa (b)) mostraron un perfil inmunofenotípico con co-expresión de los marcadores 105, 90, 73 y falta de expresión de los marcadores CD45, CD31, HLA-DR, asociados

habitualmente a las células madre mesenquimales
provenientes de médula ósea. Además, las células obtenidas
mostraron capacidad de diferenciación hacia el linaje óseo
y adiposo, manteniendo, por lo tanto, su capacidad
5 multipotencial.

Si bien la invención se ha descrito con respecto a
ejemplos de realizaciones preferentes, éstos no se deben
considerar limitativos de la invención, que se definirá por
la interpretación más amplia de las siguientes
10 reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento para la obtención de células madre mesenquimales a partir de la fracción mononuclear de médula ósea humana obtenida mediante centrifugación en gradiente de densidad, caracterizado porque comprende las etapas de:

a) Recuperación y pre expansión de las células madre mesenquimales, mediante un cultivo primario, en el que las células mononucleares de médula ósea se siembran en medio de cultivo DMEM suplementado con suero AB humano (10%) siguiendo el siguiente esquema de cultivo:

i. las células mononucleares del cultivo se lavan en el día 5 con solución salina y se añade medio de cultivo suplementado con suero humano AB (10%).

15 ii. se recambia el medio de cultivo a los 9 días por el mismo medio anteriormente mencionado

iii. se realiza una tripsinización del cultivo primario a los 12 días. Estas células generan el cultivo de expansión (c).

20 b) Cultivo secundario: resiembra de las células mononucleares lavadas en (a) en medio de cultivo suplementado con suero AB humano (10%) siguiendo el siguiente esquema de cultivo:

iv. el cultivo se lava en el día 5 con solución salina y se añade medio de cultivo suplementado con suero humano AB (10%).

v. se recambia el medio de cultivo por el mismo medio anteriormente mencionado el día 9.

30 vi. se realiza una tripsinización del cultivo primario a los 12 días. Se recuperan las células madre mesenquimales que son congeladas y almacenada en depósitos de nitrógeno.

c) Cultivo de expansión: expansión de las células mesenquimales asiladas en (a) a los 12 días. Se resiembran y expanden estas células en medio de cultivo suplementado con suero AB humano (10%) siguiendo el siguiente esquema de cultivo:

vii. se recambia el medio de cultivo a los 3 y 6 días

por el mismo medio anteriormente mencionado.

viii. se realiza una tripsinización del cultivo primario a los 12 días. Estas células se acondicionan para su traslado a quirófano.

5 2.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cantidad de células mononucleares de médula ósea inoculadas en la etapa (a) es de entre 200 000 y 400 000 células por centímetro cuadrado de superficie.

10 3.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la cantidad de células madre mesenquimales inoculadas en la etapa (b) es de entre 3 000 y 5 000 células por centímetro cuadrado de superficie.

15 4.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que en el cultivo primario de la etapa (a) se obtienen entre $15 \cdot 10^6$ y $20 \cdot 10^6$ células madre mesenquimales.

20 5.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que en el cultivo secundario (etapa (b)) se obtienen entre $3 \cdot 10^6$ y $6 \cdot 10^6$ células madre mesenquimales.

25 6.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la pureza de las células madre mesenquimales obtenidas en el cultivo primario de la etapa (a) es de 80%.

30 7.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la pureza de las células madre mesenquimales obtenidas en el cultivo secundario (etapa (b)) es de 65%.

 8.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que en la etapa (c) se obtienen entre $40 \cdot 10^6$ y $50 \cdot 10^6$ de células madre mesenquimales.

35 9.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el número de duplicaciones celulares se encuentra entre 6 y 8.

10.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el tiempo total de obtención de las células madre mesenquimales no sobrepasa los 21 días.

5 11.- Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el cultivo secundario (etapa (b)) se congela y se mantiene como copia de seguridad.

10

Resumen

Procedimiento para la obtención de células madre mesenquimales a partir de la fracción mononuclear de la
5 médula ósea humana.

La presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de células madre mesenquimales a partir de la fracción mononuclear de células de médula ósea humana que
10 utiliza como suplemento suero humano del tipo AB. Dicho procedimiento comprende las etapas de obtención de dicha fracción mononuclear de médula ósea, la etapa de recuperación y pre-expansión de las células madre mesenquimales, y la etapa de expansión de las células
15 madres mesenquimales hasta la obtención de la dosis clínica necesaria para su uso terapéutico.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO			
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES			
TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS			
PATENTE DE INVENCION ____		PCT ☒	MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____
(21) N° de solicitud:		(22) Fecha de solicitud:	
(51) Clasificación Internacional :			
(71) Solicitante(s) BANC DE SANG I TEIXITS			
(72) Inventor(es) Joan GARCIA LOPEZ; Luciano RODRIGUEZ GOMEZ; Jordi Joan CAIRO BADILLO; Pablo Arnau PLA CALVET y Francesc GODIA CASABLANCAS			
(74) Agente: HUMBERTO RUBIO CAMACHO			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) Pais
ESPAÑOLA	P200900005	02/01/2009	ESPAÑA
(85) Fecha inicio fase nacional:		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 08/07/2010	
Fecha de presentación de la solicitud: 25/11/2009		N° publicación: WO 2010/076349	
No. de solicitud: PCT/ES2009/000547			
(54) Título: PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES A PARTIR DE LA FRACCIÓN MONONUCLEAR DE LA MÉDULA ÓSEA HUMANA			

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

PATENTE DE INVENCION PCT X MODELO DE UTILIDAD DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud:		
(71) Clasificación Internacional :		
(71) Solicitante(s) BANC DE SANG I TEIXITS		
(72) Inventor(es) Joan GARCIA LOPEZ; Luciano RODRIGUEZ GOMEZ; Jordi Joan CAIRO BADILLO; Pablo Arnau PLA CALVET y Francesc GODIA CASABLANCAS		
(74) Agente: HUMBERTO RUBIO CAMACHO		
(30) Prioridad (31) No. Prioridad 32) Fecha (33) Pais ESPAÑOLA P200900005 02/01/2009 ESPAÑA		
(85) Fecha inicio fase nacional:		(87) Publicación internacional: Fecha: 08/07/2010 No. Publicación: WO 2010/076349
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT Fecha de presentación de la solicitud: 25/11/2009 No. de solicitud: PCT/ES2009/000547		

(54) Titulo: **PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES A PARTIR DE LA FRACCIÓN MONONUCLEAR DE LA MÉDULA ÓSEA HUMANA**

(57) Resumen:

Procedimiento para la obtención de células madre mesenquimales a partir de la fracción mononuclear de médula ósea humana obtenida mediante centrifugación en gradiente de densidad, caracterizado porque comprende las etapas de:

a) Recuperación y pre expansión de las células madre mesenquimales, mediante un cultivo primario, en el que las células mononucleares de médula ósea se siembran en medio de cultivo DMEM suplementado con suero AB humano (10%) siguiendo el siguiente esquema de cultivo:

i. las células mononucleares del cultivo se lavan en el día 5 con solución salina y se añade medio de cultivo suplementado con suero humano AB (10%).

ii. se recambia el medio de cultivo a los 9 días por el mismo medio anteriormente mencionado

iii. se realiza una tripsinización del cultivo primario a los 12 días. Estas células generan el cultivo de expansión (c).

b) Cultivo secundario: resiembra de las células mononucleares lavadas en (a) en medio de cultivo suplementado con suero AB humano (10%) siguiendo el siguiente esquema de cultivo:

iv. el cultivo se lava en el día 5 con solución salina y se añade medio de cultivo suplementado con suero humano AB (10%).

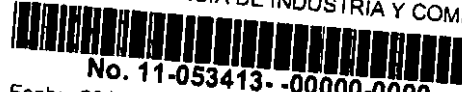
v. se recambia el medio de cultivo por el mismo medio anteriormente mencionado el día 9.

vi. se realiza una tripsinización del cultivo primario a los 12 días. Se recuperan las células madre mesenquimales que son congeladas y almacenada en depósitos de nitrógeno.

c) Cultivo de expansión: expansión de las células mesenquimales aisladas en (a) a los 12 días. Se resiembran y expanden estas células en medio de cultivo suplementado con suero AB humano (10%) siguiendo el siguiente esquema de cultivo:

vii. se recambia el medio de cultivo a los 3 y 6 días por el mismo medio anteriormente mencionado.

viii. se realiza una tripsinización del cultivo primario a los 12 días. Estas células se acondicionan para su traslado a quirófano.



No. 11-053413- -00000-0000

Fecha: 2011-05-02 15:14:32 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 35

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DI

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐