

**MÉTODO PARA AISLAR CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES A PARTIR DE
MEMBRANA AMNIÓTICA DE CORDÓN UMBILICAL UTILIZANDO UN MEDIO
DE CULTIVO CELULAR**

5 **Campo de la Invención**

La presente invención se refiere a un método para aislar células madre mesenquimales (o una población de células madre de membrana amniótica de cordón umbilical), así como una población de células madre mesenquimales
10 aisladas de la membrana amniótica del cordón umbilical. La invención también se refiere a un medio de cultivo celular para aislar células madre mesenquimales de la membrana amniótica del cordón umbilical. La invención también se refiere a una composición farmacéutica y usos de la
15 población aislada de células madre mesenquimales. La invención también se refiere a métodos para tratar una enfermedad o trastorno que comprenden administrar una población de células madre mesenquimales o una composición farmacéutica que contiene una población de células madre
20 mesenquimales de la invención a un sujeto en necesidad de la misma.

Antecedentes de la Invención

Se han reportado células madre mesenquimales

aisladas de la membrana amniótica del cordón umbilical primero en la solicitud de patente de Estados Unidos 2006/0078993 (que conduce a las patentes otorgadas de Estados Unidos 9,085,755 y 9,737,568) y la solicitud de
5 patente Internacional WO2006/019357 correspondiente. Desde entonces, el tejido de cordón umbilical ha obtenido atención como una fuente de células multipotentes; debido a su disponibilidad generalizada, el cordón umbilical y en particular las células madre aisladas de la membrana
10 amniótica del cordón umbilical (también conocidas como "células madre de revestimiento de cordón") se han considerado como una excelente fuente alternativa de células para medicina regenerativa. Ver, Jeschke et al. Umbilical Cord Lining Membrane y Wharton's Jelly-Derived
15 Mesenchymal Stem Cells: the Similarities and Differences; The Open Tissue Engineering and Regenerative Medicine Journal, 2011, 4, 21-27.

Un estudio posterior comparó el fenotipo, tasa de proliferación, migración, inmunogenicidad, y capacidades
20 inmunomoduladoras de las células madre mesenquimales humanas (MSC) derivadas de la membrana amniótica del cordón umbilical (revestimiento de cordón umbilical (CL-MSC), sangre de cordón umbilical (CB-MSC), placenta (P-MSC), y

gelatina de Wharton (WJ-MSJ)) (Stubbendorf et al, Immunological Properties of Extraembryonic Human Mesenchymal Stromal Cells Derived from Gestational Tissue, STEM CELLS AND DEVELOPMENT Volumen 22, número 19, 2013, 2619-2629). Stubbendorf et. al. concluyeron que las poblaciones de MSC derivadas de tejido gestacional extraembriónico muestran un potencial variado para evadir respuestas inmunitarias así como ejercer efectos inmunomoduladores. Los autores también encontraron que CL-
MSC mostraron el potencial más prometedor para una terapia a base de células, y las células mostraron baja inmunogenicidad, pero también mostraron potencial migratorio y proliferativo mejorado tal que la futura investigación se deberá concentrar en los mejores modelos de enfermedad en los cuales se pueden administrar las CL-
MSC.

En tanto que las células madre mesenquimales de la membrana amniótica se pueden obtener fácilmente utilizando el protocolo como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos 2006/0078993 y la solicitud de patente Internacional WO2006/019357, sería de ventaja para las pruebas clínicas con estas MSC de revestimiento de cordón tener a la mano un método que permita aislar una población

de estas MSC de revestimiento de cordón que sea altamente homogéneo y, por consiguiente, se pueda utilizar para pruebas clínicas.

Por consiguiente, es un objeto de la invención proporcionar un método para aislar una población de células madre mesenquimales de la membrana amniótica de cordón umbilical que cumpla con esta necesidad. Por consiguiente, es un objeto de la invención proporcionar una población altamente homogénea de células madre mesenquimales aisladas de la membrana amniótica del cordón umbilical.

Breve Descripción de la Invención

Este objeto se logra por los métodos, la población de células mesenquimales, la respectiva composición farmacéutica y el medio de cultivo celular que tienen las características de las reivindicaciones independientes.

En un primer aspecto, la invención proporciona un método para aislar una población de células madre mesenquimales de la membrana amniótica del cordón umbilical, el método que comprende cultivar el tejido de cordón umbilical en un medio de cultivo que comprende DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco), F12 (Medio F12 de Ham), M171 (Medio 171) y FBS (Suero Bovino Fetal).

En un segundo aspecto, la invención proporciona una

población de células madre mesenquimales aisladas de la membrana amniótica del cordón umbilical, en donde al menos aproximadamente 90% o más células de la población de células madre expresan cada uno de los siguientes marcadores: CD73, CD90 y CD105. Preferentemente, la población de células madre mesenquimales aisladas carece de expresión de los siguientes marcadores: CD34, CD45 y HLA-DR. En las modalidades de este segundo aspecto, al menos aproximadamente 91% o más, aproximadamente 92% o más, aproximadamente 92 o más, aproximadamente 93% o más, aproximadamente 94% o más, aproximadamente 95% o más, aproximadamente 96% o más, aproximadamente 97% o más, aproximadamente 98% o más, aproximadamente 99% o más células de la población de células madre mesenquimales aisladas expresan cada uno de CD73, CD90 y CD105. Además, en estas modalidades del segundo aspecto, al menos aproximadamente 91% o más, aproximadamente 92% o más, aproximadamente 92 o más, aproximadamente 93% o más, aproximadamente 94% o más, aproximadamente 95% o más, aproximadamente 96% o más, aproximadamente 97% o más, aproximadamente 98% o más, aproximadamente 99% o más células de la población de células madre mesenquimales aisladas preferentemente carecen de expresión de los

marcadores CD34, CD45 y HLA-DR. La población de células madre mesenquimales se puede obtener por un método para aislar una población de células madre mesenquimales del primer aspecto.

- 5 En un tercer aspecto, la invención proporciona una composición farmacéutica que contiene una célula mamífera de (el segundo aspecto de) la invención.

 En un cuarto aspecto, la invención proporciona un método para producir un medio de cultivo para aislar el
10 método que comprende la mezcla para obtener un volumen final de 500 ml de medio de cultivo:

- i. 250 ml de DMEM
- ii. 118 ml de M171
- iii. 118 ml de DMEM/F12
- 15 iv. 12.5 ml de Suero Bovino Fetal (FBS) para obtener una concentración final de 2.5% (v/v).

 En un quinto aspecto, la invención proporciona un medio de cultivo celular obtenible por el método del cuarto aspecto.

- 20 En un sexto aspecto, la invención proporciona un método para aislar células madre mesenquimales de la membrana amniótica del cordón umbilical, que comprende cultivar el tejido de membrana amniótica en el medio de

cultivo preparado por el método del cuarto aspecto.

En un séptimo aspecto, la invención proporciona un medio de cultivo celular que comprende:

- DMEM en la concentración final de aproximadamente
5 55 a 65% (v/v),
- F12 en una concentración final de aproximadamente
5 a 15% (v/v),
- M171 en una concentración final de
aproximadamente 15 a 30% (v/v), y
- 10 - FBS en una concentración final de aproximadamente
1 a 8% (v/v).

En un octavo aspecto, la invención proporciona el uso de un medio de cultivo celular del séptimo aspecto para el aislamiento de células madre mesenquimales de la
15 membrana amniótica de cordón umbilical.

En un noveno aspecto, la invención proporciona el uso de un medio de cultivo celular del séptimo aspecto para el cultivo de células madre mesenquimales de la membrana amniótica de cordón umbilical.

20 **Breve Descripción de las Figuras**

La invención se entenderá mejor con referencia a la descripción detallada cuando se considere en conjunto con los ejemplos no limitantes y las figuras, en las cuales:

La figura 1 muestra la hoja de información técnica de Lonza para el medio Eagle modificado de Dulbecco, que incluye el número de catálogo de DMEM utilizado para la producción del ejemplo ilustrativo de un medio de la invención (PTT-6) en la Sección Experimental;

La figura 2 muestra la hoja de información técnica de Lonza para el medio F12 de Ham;

La figura 3 muestra la hoja de información técnica de Lonza para el medio DMEM:F12 (1:1), que incluye el número de catálogo del medio DMEM:F12 (1:1) utilizado para la producción del ejemplo ilustrativo de un medio de la invención (PTT-6) en la Sección Experimental;

La figura 4 muestra la hoja de información técnica de Life Technologies Corporation para el medio M171, que incluye el catálogo del medio M171 utilizado para la producción del ejemplo ilustrativo de un medio de la invención (PTT-6) en la Sección Experimental;

La figura 5 muestra la lista de ingredientes, que incluye su proveedor comercial y el número de catálogo que se han utilizado en la Sección Experimental para la producción del medio PTT-6.

La figura 6 muestra los resultados de los experimentos de citometría de flujo en los cuales se han

analizado células madre mesenquimales aisladas del cordón umbilical para la expresión de los marcadores de células madre mesenquimales CD73, CD90 y CD105. Para estos experimentos, se aislaron células madre mesenquimales del

5 tejido de cordón umbilical por el cultivo del tejido de cordón umbilical en tres diferentes medios de cultivo, seguido por el subcultivo de las células madre mesenquimales en el respectivo medio. Los siguientes tres medios de cultivo se utilizaron en estos experimentos: a)

10 90% (v/v) de DMEM complementado con 10% de FBS (v/v), b) el medio PTT-4 de cultivo descrito en la solicitud de patente de Estados Unidos 2006/0078993 y la solicitud de patente Internacional correspondiente WO2006/019357 que consta de 90% (v/v) de CMRL1066, y 10% (v/v) de FBS (ver párrafo

15 [0183] de WO2006/019357) y c) el medio de cultivo de la presente invención, PPT-6, la composición del cual se describe en la presente. En este análisis de citometría de flujo, se analizaron dos muestras diferentes de la población de células madre mesenquimales de revestimiento

20 de cordón (CLMC) para cada uno de los tres medios de cultivo utilizados. Los resultados se muestran en la figura 6a a la figura 6c. En más detalle, la figura 6a muestra el porcentaje de las células madre mesenquimales aisladas de

revestimiento de cordón que expresan los marcadores de células madre CD73, CD90 y CD105 después del aislamiento del tejido de cordón umbilical y el cultivo en DMEM/10% de FBS, la figura 6b muestra el porcentaje de células madre mesenquimales aisladas de revestimiento de cordón que expresan marcadores de células madre CD73, CD90 y CD105 después del aislamiento del tejido de cordón umbilical y el cultivo en PTT-4 y la figura 6c muestra el porcentaje de células madre mesenquimales aisladas de revestimiento de cordón que expresan marcadores de células madre CD73, C90 y CD105 después del aislamiento del tejido de cordón umbilical y el cultivo en PTT-6.

La figura 7 muestra los resultados de los experimentos de citometría de flujo en los cuales las células madre mesenquimales aisladas del cordón umbilical se han analizado para su expresión de marcadores de células madre (CD73, CD90 y CD105, CD34, CE45 y HLA-DR (antígeno de leucocitos humanos-antígeno D relacionado)) que se utilizan para definir la conveniencia de células madre mesenquimales humanas multipotentes para terapia celular y en comparación a la expresión de estos marcadores por células madre mesenquimales de médula ósea. Para este experimento, las células madre mesenquimales de la membrana amniótica del

cordón umbilical se aislaron del tejido de cordón umbilical por el cultivo del tejido de cordón umbilical en el medio de cultivo de la presente invención PPT-6 en tanto que las células madre mesenquimales de médula ósea se aislaron de la médula ósea humana utilizando un protocolo estándar. La figura 7a muestra el porcentaje de células madre mesenquimales aisladas de revestimiento de cordón que expresan los marcadores de células madre CD73, CD90 y CD105 y carecen de expresión de CD34, CD45 y HLA-DR después del aislamiento del tejido de cordón umbilical y el cultivo en el medio PTT-6 en tanto que la figura 7b muestra el porcentaje de células madre mesenquimales aisladas de médula ósea que expresan CD73, CD90 y CD105 y carecen de expresión de CD34, CD45 y HLA-DR.

Descripción Detallada de la Invención

Como se explica anteriormente, en un primer aspecto, la invención se refiere a un método para aislar una población de células madre mesenquimales de la membrana amniótica del cordón umbilical, el método que comprende cultivar el tejido de cordón umbilical en un medio de cultivo que comprende DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco), F12 (Medio F12 de Ham), M171 (Medio 171) y FBS (Suero Bovino Fetal). Se ha encontrado de manera

sorprendente en la presente solicitud que el uso de este medio contempla el aislamiento de una población de células madre mesenquimales de la membrana amniótica del cordón umbilical de la cual más de 90%, o aún 99% o más de las

5 células son positivas para los tres marcadores de células madre mesenquimales CD73, CD90 y en tanto que al mismo tiempo estas células madre carecen de expresión de CD34, CD45 y HLA-DR (ver la Sección Experimental), lo que significa que 99% o aún más células de esta población

10 expresan los marcadores de células madre CD73, CD90 y CD105 en tanto que no expresan los marcadores CD34, CD45 y HLA-DR. Esta población de células bien definidas y extremadamente homogénea es el candidato ideal para las pruebas clínicas y terapias a base de células puesto que,

15 por ejemplo, cumplen completamente con los criterios aceptados en general para células madre mesenquimales humanas que se van a utilizar para terapia celular como se define, por ejemplo, por Dominici et al., "Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The

20 International Society for Cellular Therapy position statement", Cytotherapy (2006) Vol. 8, No. 4, 315-317, Sensebe et al., "Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a,

review", Stem Cell Research & Therapy 2013, 4:66), Vonk et al., Stem Cell Research & Therapy (2015) 6:94, o Kundrotas Acta Medica Lituanica. 2012. Vol. 19. No. 2. P. 75-79. Además, utilizando un biorreactor tal como un Sistema de

5 Expansión de Células Cuánticas, es posible obtener altos números de células madre mesenquimales tal como 300 a 700 millones de células madre mesenquimales por corrida (ver también la Sección Experimental). Por consiguiente, la presente invención permite proporcionar las cantidades de

10 células madre que son necesarias para aplicaciones terapéuticas tal como cicatrización de heridas de una manera rentable. Además, todos los componentes utilizados para marcar el medio de cultivo de la presente invención están comercialmente disponibles en calidad de GMP. Por

15 consiguiente, la presente invención abre la ruta a la producción de GMP de esta población de células madre mesenquimales altamente homogénea de la membrana amniótica del cordón umbilical.

En este contexto, se observa que el medio de

20 cultivo de la presente invención permite el aislamiento de una población de células madre mesenquimales (también conocida en la presente como "células madre mesenquimales") de la membrana amniótica bajo condiciones que permiten la

proliferación celular de las células progenitoras/madre mesenquimales sin diferenciación de las células progenitoras/madre mesenquimales. Por consiguiente, después del asolamiento de las células madre mesenquimales de la

5 membrana amniótica como se describe en la presente, la población de células progenitoras/madre mesenquimales aisladas tiene la capacidad de diferenciar en múltiples tipos de células como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos 2006/0078993, patente de Estados

10 Unidos 9,085,755, solicitud de patente Internacional WO2006/019357, patente de Estados Unidos 8,287,854 o WO2007/046775, a manera de ejemplo. Como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos 2006/0078993, por ejemplo, las células madre mesenquimales de la membrana

15 amniótica del cordón umbilical tienen una forma de huso, expresan los siguientes genes: PIU5f1, Bmi-1, factor inhibitorio de leucemia (LIF), y secretan Activina A y Foliestatina. Las células madre mesenquimales aisladas en la presente invención, por ejemplo, se pueden diferenciar

20 en cualquier tipo de célula mesenquimal tal como, pero no limitado a adipocito, fibroblastos de piel, condrocitos, osteoblastos, tenocitos, fibroblastos de ligamento, cardiomiocitos, células de músculo liso, células de músculo

esquelético, adipocitos, células productoras de mucina, células derivadas de glándulas endócrinas tal como células productoras de insulina (por ejemplo, células de islotes β) o células neuroectodérmicas. Las células madre aisladas en

5 la presente invención se pueden diferenciar *in vitro* a fin de utilizar posteriormente la célula diferenciada con propósitos médicos. Un ejemplo ilustrativo de este enfoque es la diferenciación de las células madre mesenquimales en células de islotes β productoras de insulina que entonces

10 se pueden administrar, por ejemplo por implante, a un paciente que padece de una deficiencia de insulina tal como diabetes mellitus (cf., también WO2007/046775 con respecto a esto). De manera alternativa, las células madre mesenquimales de la invención se pueden utilizar en su

15 estado indiferenciado para terapia a base de células, por ejemplo, con propósitos de cicatrización de heridas tal como tratamiento de quemaduras o heridas diabéticas crónicas. En estas aplicaciones terapéuticas, las células madre mesenquimales de la invención pueden servir ya sea

20 para promover la cicatrización de heridas al interactuar con el tejido enfermo circundante o también pueden diferenciar en una respectiva célula de piel (cf., por ejemplo, nuevamente WO2007/046775).

En este contexto, se observa que la población de células madre mesenquimales descrita en la presente se puede aislar y cultivar (es decir, se derivan) de cualquier tejido de cordón umbilical siempre que el tejido de cordón umbilical contenga la membrana amniótica (que también se conoce como "revestimiento de cordón"). Por consiguiente, la población de células madre mesenquimales se puede aislar de (piezas de) todo el cordón umbilical como se describe en la Sección Experimental de la presente solicitud. Este tejido de cordón umbilical por consiguiente, puede contener, además de la membrana amniótica, cualquier otro tejido/componente del cordón umbilical. Como se muestra, por ejemplo, en la figura 16 de la solicitud de patente de Estados Unidos 2006/0078993 o la solicitud de patente Internacional WO2006/019357, la membrana amniótica del cordón umbilical es la parte más externa del cordón umbilical, cubriendo el cordón. Además, el cordón umbilical contiene una vena (que lleva sangre rica en nutrientes y oxigenada al feto) y dos arterias (que llevan sangre agotada en nutrientes y desoxigenada lejos del feto). Para protección y soporte médico, estos tres vasos sanguíneos se incorporan en la gelatina de Wharton, una sustancia gelatinosa hecha en gran medida de mucopolisacáridos. Por

consiguiente, el tejido de cordón umbilical utilizado en la presente invención también puede comprender esta vena, las dos arterias y la gelatina de Wharton. El uso de una sección completa (intacta) del cordón umbilical tiene la

5 ventaja de que la membrana amniótica no necesita separarse de los otros componentes del cordón umbilical. Esto reduce los pasos de aislamiento y por consiguiente, hace al método de la presente invención, más simple, más rápido, menos propenso a errores y más económico, todos los cuales son

10 aspectos importantes para la producción de GMP que es necesaria para la aplicación terapéutica de las células madre mesenquimales. El aislamiento de las células madre mesenquimales, por consiguiente, puede iniciar por el explante de tejido, el cual puede ser seguido por el

15 subcultivo posterior (cultivo) de las células madre mesenquimales aisladas si se desean mayores cantidades de las células madre mesenquimales, por ejemplo, para uso en pruebas clínicas. De manera alternativa, también es posible separar primero la membrana amniótica de los otros

20 componentes del cordón umbilical y aislar las células madre mesenquimales de revestimiento de cordón de la membrana amniótica por el cultivo de la membrana amniótica en un medio de cultivo de la presente invención. Este cultivo

también se puede llevar a cabo por explante de tejido, seguido opcionalmente por el subcultivo de las células madre mesenquimales aisladas. En este contexto, el término "explante de tejido" o "método de explante de tejido" se utiliza en su significado regular en la técnica para referirse a un método en el cual un tejido, una vez que se recolecta, o una pieza del tejido se está colocando en una placa de cultivo celular que contiene el medio de cultivo (crecimiento) y por el cual, con el paso del tiempo, las células madre migran fuera del tejido hacia la superficie de la placa. Estas células madre primarias entonces se pueden expandir adicionalmente y se pueden transferir a placas frescas a través de micropropagación (subcultivo) también como se describe en la presente. En este contexto, se observa que en términos de producción de las células con propósitos terapéuticos, en el primer paso del aislamiento de las células madre mesenquimales de membrana amniótica del cordón umbilical, un Banco Celular Maestro se obtiene de las células madre mesenquimales aisladas, en tanto que se puede obtener el subcultivo posterior de un Banco de Células de Trabajo. Si una población de células madre mesenquimales de la invención (en particular una población de las células madre mesenquimales de las cuales al menos

aproximadamente 98% o 99% o expresan cada uno de los marcadores CD73, CD90 y CD105 y carecen de expresión de cada uno de los marcadores: CD34, CD45 y HLA-DR) se utiliza para pruebas clínicas o como un producto terapéutico

5 aprobado, se utilizará habitualmente con este propósito una población de células del Banco de Células de Trabajo. Tanto la población de células madre del paso de aislamiento (que pueden hacer el Banco Celular Maestro) como la población de células madre del paso de subcultivo (que pueden hacer el

10 Banco de Células de Trabajo), por ejemplo, se pueden almacenar en forma criopreservada.

Como se menciona anteriormente, el presente método para aislar las células madre mesenquimales de la membrana amniótica de cordón umbilical tiene la ventaja de que todos

15 los componentes utilizados en el medio de cultivo de la invención están disponibles en calidad de GMP y, por consiguiente, proporcionan la posibilidad de aislar las células madre mesenquimales bajo condiciones de GMP para administración terapéutica posterior.

20 Por "DMEM" se entiende medio Eagle modificado de Dulbecco que se desarrolló en 1969 y es una modificación del medio basal Eagle (BME) (cf., figura 1 que muestra la hoja de datos de DMEM disponible de Lonza). La fórmula de

DMEM original contiene 1000 mg/L de glucosa y primero se reportó para cultivar células embriónicas de ratón. DMEM desde entonces ha llegado a ser un medio estándar para el cultivo celular que está comercialmente disponible de
5 varias fuentes tal como ThermoFisher Scientific (número de catálogo 11965-084), Sigma Aldrich (número de catálogo D5546) o Lonza, a solo unos pocos proveedores nuevos. Por consiguiente, cualquier DMEM comercialmente disponible se puede utilizar en la presente invención. En modalidades
10 preferidas, el DMEM utilizado en la presente es el medio DMEM disponible de Lonza bajo el número de catálogo 12-604F. Este medio es DMEM complementado con 4.5 g/L de glucosa y L-glutamina. En otra modalidad preferida, el DMEM utilizado en la presente es el medio DMEM de Sigma Aldrich
15 número de catálogo D5546 que contiene 100 mg/L de glucosa, y bicarbonato de sodio pero está sin L-glutamina.

Por medio "F12" se entiende medio F12 de Ham. Este medio también es un medio de cultivo celular estándar y es una mezcla de nutrientes inicialmente diseñada para
20 cultivar una amplia variedad de células mamíferas y de hibridoma cuando se utiliza con suero en combinación con hormonas y transferrina (cf., la figura 2 que muestra la hoja de datos del medio F12 de Ham de Lonza). Se puede

utilizar en la presente invención cualquier medio F12 de Ham comercialmente disponible (por ejemplo, de ThermoFisher Scientific (número de catálogo 11765-054), Sigma Aldrich (número de catálogo N4888) o Lonza, a solo unos pocos
5 proveedores nuevos). En modalidades preferidas, se utiliza el medio F12 de Ham de Lonza.

Por "DMEM/F12" o "DMEM:F12" se entiende una mezcla 1:1 de DMEM con el medio de cultivo F12 de Ham (cf. la figura 3 que muestra la hoja de datos para el medio
10 DMEM:F12 (1:1) de Lonza). También el medio DMEM/F12 (1:1) es un medio basal ampliamente utilizado para soportar el crecimiento de muchas células mamíferas diferentes y está comercialmente disponible de varios proveedores tal como ThermoFisher Scientific (número de catálogo 11330057),
15 Sigma Aldrich (número de catálogo D6421) o Lonza. Cualquier medio DMEM:F12 comercialmente disponible se puede utilizar en la presente invención. En modalidades preferidas, el medio DMEM:F12 utilizado en la presente es el medio DMEM/F12 (1:1) disponible de Lonza bajo el número de
20 catálogo 12-719F (que es DMEM:F12 con L-glutamina, HEPES 15 mM, y 3.151 g/L de glucosa).

Por "M171" se entiende el medio de cultivo 171, que se ha desarrollado como medio basal para el cultivo o para

el crecimiento de células epiteliales mamíferas humanas normales (cf. la figura 4 que muestra la hoja de datos para el medio M171 de Life Technologies Corporation). También este medio basal se utiliza ampliamente y está
5 comercialmente disponible de proveedores tal como ThermoFisher Scientific o Life Technologies Corporation (número de catálogo M171500), a manera de ejemplo. Cualquier medio M171 comercialmente disponible se puede utilizar en la presente invención. En modalidades
10 preferidas, el medio M171 utilizado en la presente es el medio M171 disponible de Life Technologies Corporation bajo el número de catálogo M171500.

Por "FBS" se entiende suero bovino fetal (que también se conoce como "suero de ternero fetal"), es decir,
15 la fracción de sangre que permanece después de la coagulación natural de sangre, seguido por centrifugación para remover cualquier célula de sangre roja restante. El suero bovino fetal es el complemento de suero más ampliamente utilizado para cultivo celular *in vitro* de
20 células eucariotas debido a que tiene un muy bajo nivel de anticuerpos y contiene más factores de crecimiento, comprendiendo versatilidad en muchas aplicaciones de cultivo celular diferentes. El FBS se obtiene

preferentemente de un miembro de la Asociación Internacional de Industria de Suero (ISIA) cuyo enfoque primario es la seguridad y el uso seguro de suero y productos derivados de animales a través de trazabilidad de
5 origen apropiada, veracidad en etiquetado, y estandarización apropiada y supervisión. Los proveedores de FBS que son miembros de ISIA incluyen Abattoir Basics Company, Animal Technologies Inc., Biomin Biotechnologia LTDA, GE Healthcare, Gibco de Thermo Fisher Scientific y
10 Life Science Production, por mencionar solo unos pocos. En modalidades actualmente preferidas, el FBS se obtiene de GE Healthcare bajo el número de catálogo A15-151.

Volviendo ahora al medio de cultivo de la presente invención, el medio de cultivo puede comprender, para el
15 aislamiento o cultivo de las células madre mesenquimales de revestimiento de cordón, DMEM en una concentración final de aproximadamente 55 a 65% (v/v), F12 en una concentración final de aproximadamente 5 a 15% (v/v), M171 en una concentración final de aproximadamente 15 a 30% (v/v) y FBS
20 en una concentración final de aproximadamente 1 a 8% (v/v). El valor de "% (v/v)", como se utiliza en la presente, se refiere al volumen del componente individual con relación al volumen final del medio de cultivo. Esto significa, si

DMEM, por ejemplo, está presente en el medio de cultivo en una concentración final de aproximadamente 55 a 65% (v/v), 1 litro de medio de cultivo contiene aproximadamente 550 a 650 ml de DMEM.

5 En otras modalidades, el medio de cultivo puede comprender DMEM en una concentración final de aproximadamente 57.5 a 62.5% (v/v), F12 en una concentración final de aproximadamente 7.5 a 12.5% (v/v), M171 en una concentración final de aproximadamente 17.5 a
10 25.0% (v/v) y FBS en una concentración final de aproximadamente 1.75 a 3.5% (v/v). En modalidades adicionales, el medio de cultivo puede comprender DMEM en una concentración final de aproximadamente 61.8% (v/v), F12 en una concentración final de aproximadamente 11.8 % (v/v),
15 M171 en una concentración final de aproximadamente 23.6% (v/v), y FBS en una concentración final de aproximadamente 2.5% (v/v).

 Además de los componentes mencionados anteriormente, el medio de cultivo puede comprender
20 complementos que son ventajas para el cultivo de las células madre mesenquimales de revestimiento de cordón. El medio de cultivo de la presente invención puede, por ejemplo, comprender el Factor de Crecimiento Epidérmico

(EGF). Si está presente, el EGF puede estar presente en el medio de cultivo en una concentración final de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 20 ng/ml. En algunas de estas modalidades, el medio de cultivo puede
5 comprender EGF en una concentración final de aproximadamente 10 ng/ml.

El medio de cultivo de la presente invención también puede comprender insulina. Si está presente, la insulina puede estar presente en una concentración final de
10 aproximadamente 1 µg/ml a 10 µg/ml. En algunas de estas modalidades, el medio de cultivo puede comprender insulina en una concentración final de aproximadamente 5 µg/ml.

El medio de cultivo puede comprender además al menos uno de los siguientes complementos: adenina,
15 hidrocortisona, y sal de sodio de 3,3',5-Triiodo-L-tironina (T3). En estas modalidades, el medio de cultivo puede comprender los tres de adenina, hidrocortisona, y sal de sodio de 3,3',5-Triiodo-L-tironina (T3). En estas modalidades, el medio de cultivo puede comprender adenina
20 en una concentración final de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 0.1 µg/ml de adenina, hidrocortisona en una concentración final de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 µg/ml de hidrocortisona y/o sal de sodio de 3,3',5-

Triiodo-L-tironina (T3) en una concentración final de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 5 ng/ml.

En el método de la invención, el tejido de cordón umbilical se puede cultivar hasta que un número adecuado de células madre mesenquimales (primarias) de revestimiento de cordón hayan crecido del tejido. En modalidades habituales, el tejido de cordón umbilical se cultiva hasta que el crecimiento celular de las células madre mesenquimales de la membrana amniótica alcance aproximadamente 70 a aproximadamente 80% de confluencia. Se observa aquí que el término "confluencia" o "confluencia" se utiliza en su significado regular en la técnica de cultivo celular y se entiende como una estimación/un indicador del número de células adherentes en una placa de cultivo o un matraz, con referencia a la proporción de la superficie que se cubre por células. Por ejemplo, 50 por ciento de confluencia significa que aproximadamente la mitad de la superficie se cubre y aún hay espacio para que las células crezcan. 100 por ciento de confluencia significa que la superficie se cubre completamente por las células, y no queda más espacio para que las células crezcan como una monocapa.

Una vez que se ha obtenido un número adecuado de células primarias (células madre mesenquimales de

revestimiento de cordón) del tejido de revestimiento de cordón por explante de tejido, las células madre mesenquimales se remueven del recipiente de cultivo utilizado para el cultivo. Al hacer eso, se puede obtener

5 un Banco Celular Maestro que contiene las células madre mesenquimales aisladas (primarias) de la membrana amniótica. Habitualmente, puesto que las células madre mesenquimales son células adherentes, se lleva a cabo la remoción utilizando tratamiento enzimático estándar. Por

10 ejemplo, el tratamiento enzimático puede comprender tripsinización como se describe en la solicitud de patente internacional de Estados Unidos 2006/0078993, la solicitud de patente Internacional WO2006/019357 o la solicitud de patente Internacional WO2007/046775, lo que significa que

15 las células en crecimiento se pueden recolectar por tripsinización (tripsina al 0.125%/EDTA al 0.05%) para expansión adicional. Si se utilizan las células madre mesenquimales recolectadas, por ejemplo, para generar un Banco Celular Maestro, las células también se pueden

20 criopreservar y almacenar para uso adicional como se explica más adelante en la presente.

Una vez que se recolectan, las células madre mesenquimales se pueden transferir a un recipiente de

cultivo para subcultivo. El subcultivo también se puede iniciar a partir de células primarias congeladas, es decir, del Banco Celular Maestro. Para el subcultivo de cualquier cantidad adecuada de células, se pueden sembrar en un
5 recipiente de cultivo tal como una placa de cultivo celular. Las células mesenquimales, con este propósito, se pueden suspender en un medio adecuado (más convenientemente, el medio de cultivo de la presente invención) para subcultivar a una concentración de, por
10 ejemplo, aproximadamente 0.5×10^6 células/ml a aproximadamente 5.0×10^6 células/ml. En una modalidad, las células se suspenden para subcultivo a una concentración de aproximadamente 1.0×10^6 células/ml. El subcultivo se puede llevar a cabo por cultivo ya sea en matraces de
15 cultivo simples pero también, por ejemplo, en un sistema de múltiples capas tal como CellStacks (Coming, Coming, NY, EUA) o Cellfactory (Nunc, parte de Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) que se pueden apilar en incubadoras. De manera alternativa, el subcultivo también
20 se puede llevar a cabo en un sistema autocontenido cerrado tal como un biorreactor. Se conocen diferentes diseños de biorreactores por la persona experta en la técnica, por ejemplo, biorreactores de placa paralela, de fibra hueca, o

de microfluidos. Ver, por ejemplo, Sensebe et al. "Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review", supra. Un ejemplo ilustrativo de un biorreactor de fibra hueca comercialmente
5 es el Sistema de Expansión Celular Quantum^{MR} (Terumo BCT, Inc)., que, por ejemplo, se ha utilizado para la expansión de células madre mesenquimales de médula ósea para pruebas clínicas (cf., Hanley et al, Efficient Manufacturing of Therapeutic Mesenchymal Stromal Cells Using the Quantum
10 Cell Expansion System, Cytotherapy. 2014 Agosto; 16(8): 1048-1058).

Otro ejemplo de biorreactores comercialmente disponibles que se pueden utilizar para el subcultivo de la población de células madre mesenquimales de la presente
15 invención es el sistema de expansión celular Xuri disponible de GE Healthcare. El cultivo de la población de células madre mesenquimales en un sistema automatizado tal como el Sistema de Expansión Celular Quantum^{MR} es de beneficio particular si un Banco de Células de Trabajo para
20 aplicación terapéutica se va a producir bajo condiciones de GMP y se requiere un alto número de células.

El subcultivo de las células madre mesenquimales de revestimiento de cordón de la invención toma lugar en un

medio de cultivo de la presente invención. Por consiguiente, el medio de cultivo de la presente invención se puede utilizar tanto para el aislamiento de las células madre mesenquimales de la membrana amniótica como para el

5 cultivo posterior de las células primarias aisladas por subcultivo. También para el subcultivo, las células madre mesenquimales se pueden cultivar hasta que ha crecido una cantidad adecuada de células. En modalidades ilustrativas, las células madre mesenquimales se subcultivan hasta que

10 las células madre mesenquimales alcanzan aproximadamente 70 a aproximadamente 80% de confluencia.

El aislamiento/cultivo de la población de células madre mesenquimales de revestimiento de cordón se puede llevar a cabo bajo condiciones estándar para el cultivo de

15 células mamíferas. Habitualmente, el método de la invención de aislamiento de la población de las células madre mesenquimales de revestimiento de cordón habitualmente se lleva a cabo en condiciones (temperatura, atmósfera) que se utilizan normalmente para el cultivo de células de las

20 especies de las cuales se derivan las células. Por ejemplo, el tejido de cordón umbilical humano y las células madre mesenquimales de revestimiento de cordón, respectivamente, se cultivan usualmente a 37°C en atmosfera de aire con CO₂

al 5%. En este contexto, se observa que en la presente invención, las células mesenquimales se pueden derivar de cualquier especie mamífera, tal como ratón, rata, cobayo, conejo, cabra, caballo, perro, gato, oveja, mono o ser humano, con células madre mesenquimales de origen humano que se prefieren en una modalidad.

Una vez que se ha obtenido un número deseado/adecuado de células madre mesenquimales de revestimiento de cordón del subcultivo, las células madre mesenquimales se recolectan al removerlas del recipiente de cultivo utilizado para el subcultivo. La recolección de las células madre mesenquimales habitualmente se lleva a cabo nuevamente por tratamiento enzimático, incluyendo tripsinización de las células. Las células madre mesenquimales aisladas se recolectan posteriormente y ya sea se utilizan directamente o se conservan para el uso adicional. Habitualmente, la conservación se lleva a cabo por crioconservación. El término "crioconservación" se utiliza en la presente en su significado regular para describir un proceso donde las células madre mesenquimales se conservan por enfriamiento a bajas temperaturas bajo cero, tal como (habitualmente) -80°C o -196°C (el punto de ebullición de nitrógeno líquido). La crioconservación se

puede llevar a cabo como se conoce por la persona experta en la técnica y puede incluir el uso de crioprotectores tal como dimetilsulfóxido (DMSO) o glicerol, que ralentizan la formación de cristales de hielo en las células del cordón umbilical.

La población aislada de las células madre mesenquimales de revestimiento de cordón que se obtiene por el método de aislamiento de la presente invención está altamente definida y es homogénea. En modalidades habituales del método, al menos aproximadamente 90 o más, aproximadamente 91 % o más, aproximadamente 92 % o más, aproximadamente 92 % o más, aproximadamente 93 % o más, aproximadamente 94 % o más, aproximadamente 95 % o más, aproximadamente 96 % o más, aproximadamente 97 % o más, aproximadamente 98 % o más, aproximadamente 99 % o más de las células madre mesenquimales aisladas expresan los siguientes marcadores: CD73, CD90 y CD105. Además, en estas modalidades, al menos aproximadamente 90 % o más, aproximadamente 91 % o más, aproximadamente 92 % o más, aproximadamente 92 % o más, aproximadamente 93 % o más, aproximadamente 94 % o más, aproximadamente 95 % o más, aproximadamente 96 % o más, aproximadamente 97 % o más, aproximadamente 98 %, o más aproximadamente 99 % o más de

las células madre mesenquimales aisladas pueden carecer de expresión de los siguientes marcadores: CD34, CD45 y HLA-DR. En modalidades particulares, aproximadamente 97 % o más, aproximadamente 98 % o más, o aproximadamente 99 % o más de la población de células madre mesenquimales aisladas expresan CD73, CD90 y CD105 en tanto que carecen de expresión de CD34, CD45 y HLA-DR.

Por consiguiente, acorde con la descripción anterior, la presente invención también se refiere a una población de células madre mesenquimales aisladas de la membrana amniótica del cordón umbilical, en donde aproximadamente 90% o más células de la población de células madre expresan cada uno de los siguientes marcadores: CD73, CD90 y CD105. En modalidades preferidas al menos aproximadamente 91 % o más, aproximadamente 92 % o más, aproximadamente 92 % o más, aproximadamente 93 % o más, aproximadamente 94 % o más, aproximadamente 95 % o más, aproximadamente 96 % o más, aproximadamente 97 % o más, aproximadamente 98 % o más, aproximadamente 99 % o más de las células de la población de células madre mesenquimales aisladas son CD73+, CD90+ y CD105+, lo que significa que este porcentaje de la población de células aisladas expresa cada uno de CD73, CD90 y CD105 (cf. la

Sección Experimental de la presente solicitud). Además, al menos aproximadamente 90 % o más, aproximadamente 91 % o más, aproximadamente 92 % o más, aproximadamente 92 % o más, aproximadamente 93 % o más, aproximadamente 94 % o más, aproximadamente 95 % o más, aproximadamente 96 % o más, aproximadamente 97 % o más, aproximadamente 98 % o más, aproximadamente 99 % o más de las células madre mesenquimales aisladas pueden carecer de expresión de los siguientes marcadores. En modalidades particulares, aproximadamente 97 % o más, aproximadamente 98 % o más, o aproximadamente 99 % o más de la población de células madre mesenquimales aisladas expresan CD73, CD90 y CD105 en tanto que carecen de expresión de CD34, CD45 y HLA-DR. Esta población altamente homogénea de células madre mesenquimales derivadas de la membrana amniótica del cordón umbilical se ha reportado aquí por primera vez y cumple con los criterios para las células madre mesenquimales que se van a utilizar para terapia celular (también cf. la Sección Experimental, y, por ejemplo, Sensebe et al. "Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review", supra). Se observa en este contexto que esta población de células madre mesenquimales se puede obtener por ya sea el método de

aislamiento de la presente invención pero también por un método diferente tal como clasificación de células, si se desea.

Acorde con lo anterior, la presente invención
5 también se refiere a una composición farmacéutica que comprende una población de células madre mesenquimales aisladas de la membrana amniótica del cordón umbilical, en donde al menos aproximadamente 90% o más células de la población de células madre expresan cada uno de los
10 siguientes marcadores CD73, CD90 y CD105 y opcionalmente, carecen de expresión de CD34, CD45 y HLA-DR. La composición farmacéutica puede comprender cualquier excipiente farmacéuticamente aceptable y se puede formular por cualquier ruta farmacéutica deseada de administración. La
15 composición farmacéutica, por ejemplo, se puede adaptar para aplicación sistémica o tópica.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para producir un medio de cultivo para aislar el método que comprende, la mezcla para obtener un volumen
20 final de 500 ml de medio de cultivo:

- i. 250 ml de DMEM
- ii. 118 ml de M171
- iii. 118 ml de DMEM/F12

iv. 12.5 ml de Suero Bovino Fetal (FBS) para lograr una concentración final de 2.5% (v/v).

Como se explica anteriormente, el medio DMEM/F12 es una mezcla 1:1 de DMEM y el medio F12 de Ham. Por consiguiente, el medio DMEM/F12 de 118 ml contiene 59 ml de DMEM y 59 ml de F12. Por consiguiente, cuando se utiliza este método para producir un medio de cultivo, las concentraciones finales (v/v) con 500 ml de volumen total son como sigue:

DMEM: $250 \text{ ml} + 59 \text{ ml} = 309 \text{ ml}$, corresponde a $309/500 = 61.8 \% \text{ (v/v)}$

M171: 118 ml, corresponde a $118/500 = 23.6 \% \text{ (v/v)}$

F12: 59 ml, corresponde a $59/500 = 11.8 \% \text{ (v/v)}$.

Las modalidades de este método para producir un medio de cultivo comprenden además adicionar

v. 1 ml de solución madre EGF (5 $\mu\text{g/ml}$) para lograr una concentración final de EGF de 10ng/ml, y

vi. 0.175 ml de solución madre de insulina (14.28 mg/ml) para lograr una concentración final de insulina de 5 $\mu\text{g/ml}$.

Se observa aquí que en estas modalidades, los volúmenes mencionados anteriormente de estos componentes i. a vi. cuando dan por resultado un volumen final de 499.675

ml de medio de cultivo. Si no se adicionan componentes adicionales al medio de cultivo, los 0.325 ml restantes (para adicionar hasta un volumen de 500 ml), por ejemplo, pueden ser cualquiera de los componentes i. a vi., eso
5 significa ya sea DMEM, M171, DMEM/F12 o FBS. De manera alternativa, la concentración de la solución madre de EGF o insulina, por supuesto, se puede ajustar tal que el volumen total del medio de cultivo sea 500 ml. Además, también se observa que los componentes i. a vi. no necesariamente se
10 tiene que adicionar en el orden en el cual se listan, pero por supuesto también es posible utilizar cualquier orden para mezclar estos componentes para que lleguen al medio de cultivo de la presente invención. Esto significa que, por ejemplo, M171 y DMEM/F12 se pueden mezclar conjuntamente y
15 entonces se pueden combinar con DMEM y FBS para alcanzar concentraciones finales como se describe en la presente, es decir, una concentración final de DMEM de aproximadamente 55 a 65% (v/v), una concentración final de F12 de aproximadamente 5 a 15% (v/v), una concentración final de
20 M1712 de aproximadamente 15 a 30% (v/v) y una concentración final de FBS de aproximadamente 1 a 8% (v/v).

En otras modalidades, el método comprende además adicionar a DMEM un volumen de 0.325 ml de uno o más de los

siguientes complementos: adenina, hidrocortisona, sal de sodio de 3,3',5-Triiodo-L-tironina (T3), alcanzando de esta manera un volumen total de 500 ml de medio de cultivo. En esta modalidad, la concentración final de estos
5 complementos en DMEM puede ser como sigue:

aproximadamente 0.05 a 0.1 µg/ml de adenina, por ejemplo aproximadamente 0.025 µg/ml de adenina,
aproximadamente 1 a 10 µg/ml de hidrocortisona,
aproximadamente 0.5 a 5 ng/ml de sal de sodio de
10 3,3',5-Triiodo-L-tironina (T3), por ejemplo, 1.36 ng/ml de sal de sodio de 3,3',5-Triiodo-L-tironina (T3).

Acorde con la descripción anterior, la invención también se refiere a un medio de cultivo celular que se puede obtener o que se obtiene por el método para producir
15 el medio como se describe en la presente.

Además, la invención también se refiere a un método para aislar células madre mesenquimales de la membrana amniótica del cordón umbilical, en donde este método comprende cultivar el tejido de membrana amniótica en el
20 medio de cultivo preparado por el método como se describe en la presente.

Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un medio de cultivo celular que comprende:

- DMEM en la concentración final de aproximadamente 55 a 65% (v/v),

- F12 en una concentración final de aproximadamente 5 a 15% (v/v),

5 - M171 en una concentración final de aproximadamente 15 a 30% (v/v) y

- FBS en una concentración final de aproximadamente 1 a 8% (v/v).

En ciertas modalidades del medio de cultivo
10 descrito en la presente, el medio comprende DMEM en la concentración final de aproximadamente 57.5 a 62.5% (v/v), F12 en una concentración final de aproximadamente 7.5 a 12.5% (v/v), M171 en una concentración final de aproximadamente 17.5 a 25.0% (v/v) y FBS en una
15 concentración final de aproximadamente 1.75 a 3.5% (v/v). En otras modalidades, el medio de cultivo puede comprender DMEM en una concentración final de aproximadamente 61.8% (v/v), F12 en una concentración final de aproximadamente 11.8 (v/v), M171 en una concentración final de
20 aproximadamente 23.6% (v/v), y FBS en una concentración final de aproximadamente 2.5% (v/v).

Además, el medio de cultivo puede comprender adicionalmente el Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) en

una concentración final de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 20 ng/ml. En ciertas modalidades, el medio de cultivo comprende EGF en una concentración final de aproximadamente 10 ng/ml. El medio de cultivo descrito en la presente puede comprender además insulina en una concentración final de aproximadamente 1 ng/ml a 10 µg/ml. En estas modalidades el medio de cultivo puede comprender insulina en una concentración final de aproximadamente 5µg/ml.

10 El medio de cultivo celular de la invención puede comprender además al menos uno de los siguientes complementos: adenina, hidrocortisona, y sal de sodio de 3,3',5-Triiodo-L-tironina (T3). En ciertas modalidades, el medio de cultivo comprende los tres de adenina, hidrocortisona, y sal de sodio de 3,3',5-Triiodo-L-tironina (T3). Si está presente, el medio de cultivo puede comprender adenina en una concentración final de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.1 µg/ml de adenina o de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 0.1 µg/ml de adenina, hidrocortisona en una concentración final de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 µg/ml de hidrocortisona o de aproximadamente 1 a aproximadamente 10

µg/ml de hidrocortisona y/o sal de sodio de 3,3',5-Triiodo-L-tironina (T3) en una concentración final de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 5 ng/ml.

5 En modalidades del medio de cultivo celular, 500 ml del medio de cultivo celular de la presente invención comprenden:

- i. 250 ml de DMEM
- ii. 118 ml de M171
- iii. 118 ml de DMEM/F12
- 10 iv. 12.5 ml de Suero Bovino Fetal (FBS) (concentración final de 2.5%).

En modalidades adicionales, el medio de cultivo celular puede comprender además

- v. EGF en una concentración final de 10ng/ml, y
- 15 vi. Insulina en una concentración final de 5µg/ml.

Se pueden adicionar tanto insulina como EGF al medio de cultivo utilizando una solución madre de elección, tal que el volumen total del medio de cultivo no exceda 500 ml.

20 En un ejemplo particular, los componentes i. a vi. del medio de cultivo de la presente invención son los componentes indicados en la figura 5, lo que significa que se obtienen de los respectivos fabricantes utilizando el

número de catálogo indicado en la figura 5. El medio que se obtiene de la mezcla de los componentes i. a vi. como se indica en la figura 5 también se conoce en la presente como "PTT-6". Se observan nuevamente en este contexto que los
5 constituyentes i. a vi. así como cualquier otro ingrediente tal como un antibiótico de cualquier otro proveedor comercial se puede utilizar en la producción del medio de la presente invención.

Además, el medio de cultivo celular de la invención
10 puede comprender adenina en una concentración final de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.1 µg/ml de adenina o de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 0.1 µg/ml de adenina, hidrocortisona en una concentración final de aproximadamente 0.1 a 10 µg/ml, de aproximadamente 0.5 a
15 aproximadamente 10 µg/ml, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 10µg/ml de hidrocortisona, y/o sal de sodio de 3,3',5-Triiodo-L-tironina (T3) en una concentración final de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 5 ng/ml o de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 5 ng/ml.

20 Finalmente, la invención también proporciona un método para tratar un paciente que tiene una enfermedad, el método que comprende administrar al paciente una célula

madre mesenquimal de revestimiento de cordón o una composición farmacéutica que contiene una célula madre como se describe en la presente. La enfermedad puede ser cualquier enfermedad que se describe anteriormente. Para

5 tratar al sujeto, la población de células madre mesenquimales de la invención se puede administrar de cualquier manera adecuada, por ejemplo, incluyendo pero no limitado a, administración tópica, por implante o por inyección. La población de células madre, por ejemplo, se

10 puede colocar directamente en una herida tal como una quemadura o una herida diabética (ver solicitud de patente Internacional WO2007/046775). De manera alternativa, la población de células madre también se puede implantar subcutáneamente, por ejemplo, directamente bajo la piel, en

15 grasa corporal o el peritoneo.

La invención se ilustrará adicionalmente por los siguientes ejemplos experimentales no limitantes.

Ejemplos experimentales

1. Crioconservación de tejido de cordón umbilical antes de

20 aislamiento de células madre mesenquimales

El tejido de cordón umbilical (los cordones umbilicales se donaron con consentimiento informado de la madre) se procesó para el aislamiento posterior de las

células madre mesenquimales de la membrana amniótica del cordón umbilical como sigue.

1.1 Lavado de muestra de tejido de cordón umbilical:

- a. Remover bisturís de la cubierta protectora.
- 5 b. Sostener el cordón umbilical de manera segura utilizando el fórceps y cortar el cordón en una pieza de 10 cm de longitud utilizando un bisturí. Colocar el cordón inutilizable de vuelta en la copa de tejido original.
- c. Transferir la pieza de cordón umbilical de 10 cm
10 de largo hacia una nueva placa de cultivo de 150 mm. La placa de cultivo de 150 mm se puede utilizar en el lugar de las copas.
- d. Utilizar la cubierta de la placa de cultivo de 150 mm como un lugar de descanso para el fórceps y bisturí.
- 15 e. Remover 25 ml de Plasmalyte A (Baxter, Catálogo #2B2543Q) con una jeringa de 30 ml. Sostener la jeringa en un ángulo de 45° utilizando una mano y dispensar el Plasmalyte A directamente en el tejido de cordón umbilical.
- f. Sostener la placa de cultivo en un ángulo
20 ligero, remover el Plasmalyte A con una jeringa de 30 ml y aguja de punta roma.
- g. Recolectar el Plasmalyte A utilizado en una bolsa de transferencia de 300 ml que sirve como un

recipiente de basura y desecharlo en el cubo de peligro biológico.

h. Repetir el procedimiento de lavado, si es necesario, utilizando una nueva placa de cultivo para cada lavado. Asegurarse de que todos los coágulos de sangre en la superficie se han removido. Se puede utilizar más Plasmalyte A si se necesita para limpiar el tejido.

i. Colocar el tejido en una nueva placa etiquetada de cultivo de tejido para continuar cortando el tejido. Colocar 20 ml de Plasmalyte A en la placa tal que el tejido no se seque en tanto que se corta.

j. Cortar los cordones en secciones iguales de aproximadamente 1 cm dando por resultado 10 secciones en total.

k. Cortar adicionalmente cada sección de 1 cm en piezas más pequeñas con aproximadamente 0.3 cm x 0.3 cm a 0.5 cm x 0.5 cm por sección.

l. Remover cualquier Plasmalyte A que esté en la placa.

m. Extraer 25 ml de Plasmalyte A con una jeringa de 30 ml de la bolsa original de Plasmalyte A y dispensar directamente en las piezas de tejido de cordón umbilical.

n. Sostener la placa de cultivo en un ángulo para

recolectar todo el Plasmalyte A utilizado para lavar el tejido en un lado y removerlo con una jeringa y aguja de punta roma.

o. Repetir el lavado una vez más. No debe quedar
5 ningún coágulo.

NOTA: Si el cordón no se congela de inmediato, el tejido de cordón umbilical se mantiene en Plasmalyte A hasta que esté listo para congelarse.

1.2 Crioconservación de tejido de cordón umbilical:

10 a. Preparar solución de crioconservación:

i. Preparar 50 ml de solución de congelación que consta de 60% de Plasmalyte A, 30% de albúmina de suero humano al 5%, y 10% de sulfóxido de dimetilo (DMSO).

ii. Etiquetar una bolsa de transferencia de 150
15 ml con "Solución de congelación de tejido" y unir un equipo de transferencia de plasma al orificio utilizando la técnica aséptica.

iii. Remover 30 ml de Plasmalyte A con una jeringa de 30 ml de la bolsa original de Plasmalyte A y
20 transferirlo a la bolsa de transferencia etiquetada "solución de congelación de tejido" con la fecha y hora en que se hace la solución.

iv. Remover 15 ml de Albúmina de Suero Humano al

5% con una jeringa de 20 ml transferirlos a la bolsa de transferencia etiquetada.

v. Adicionar 5 ml de DMSO a la bolsa de transferencia.

5 vi. Mezclar bien y registrar la mezcla de solución de congelación.

b. Remover el Plasmalyte A del tejido antes de adicionar la solución de congelación.

10 c. Utilizar una jeringa de 60 ml, extraer los 50 ml de la solución de congelación en la jeringa, adicionar aproximadamente 30 ml de solución de congelación a la placa de cultivo celular de 150 mm que contiene el tejido de cordón umbilical. Colocar una aguja de punta roma en la jeringa para mantenerla estéril.

15 d. Agitar la placa de cultivo que contiene el tejido y la solución de congelación cada minuto durante 10 minutos.

20 e. Utilizando el fórceps, seleccionar 8 secciones elegidas aleatoriamente y colarlas en cada uno de los cuatro criofrascos de 4 ml. Seleccionar 4 secciones elegidas aleatoriamente y colocarlas en un criofrasco de 1.8 ml. Estas secciones deben estar libres de coágulos de sangre.

f. Rellenar cada criofrasco que contiene el tejido de cordón umbilical con la solución de congelación restante hasta la línea de llenado de 3.6 ml para los tubos de 4 ml y la línea de 1.8 ml para el vial Nunc de 1.8 ml.

- 5 g. Etiquetar un bote Bactec Lytic/10-Anaerobic/F y un bote Bactec Plus Aerobic/F con ID de tejido.

- h. Remover 20 ml de solución de congelación de la placa de cultivo con una jeringa y una aguja de punta roma, después de limpiar los viales Bactec con un hisopo con alcohol, cambiar la aguja de punta roma por una aguja de 18g e inocular los botes Bactec aerobio y anaerobio con 10 ml cada uno.

i. Iniciar la congelación de tasa controlada.

- j. Después de que se completa la congelación de tasa controlada, colocar las unidades de un congelador de nitrógeno líquido monitorizado de temperatura continua hasta el uso posterior.

2. Aislamiento de células madre mesenquimales de revestimiento de cordón

- 20 2.1. Preparación de medio para procesar MSC de tejido de cordón umbilical:

a. Para producir 500 ml de PTT6 (medios de cultivo/crecimiento) adicionar lo siguiente en el orden

listado:

- i. DMEM, 250 ml
- ii. M171, 118 ml
- iii. DMEM/F12, 118 ml
- 5 iv. FBS, 12.5 ml (concentración final de 2.5%)
- v. EGF, 1 ml (concentración final de 10ng/ml)
- vi. Insulina, 0.175 ml (concentración final de 5µg/ml)

Los volúmenes mencionados anteriormente de los
10 componentes i. a vi. cuando dan por resultado un volumen
final de 499.675 ml de medio de cultivo. Si no se adicionan
componentes adicionales al medio de cultivo, los 0.325 ml
restantes (para adicionar hasta un volumen de 500 ml), por
ejemplo, pueden ser cualquiera de los componentes i. a iv.,
15 eso significa ya sea DMEM, M171, DMEM/F12 o FBS. De manera
alternativa, la concentración de la solución madre de EGF o
insulina, por supuesto, se puede ajustar tal que el volumen
total del medio de cultivo sea 500 ml. De manera
alternativa, una solución madre de un antibiótico tal como
20 penicilina-estreptomicina-anfotericina se puede adicionar
para dar por resultado un volumen final de 500 ml. También
es posible adicionar al medio de cultivo un volumen de
0.325 ml de uno o más de los siguientes complementos:

adenina, hidrocortisona, sal de sodio de 3,3',5-Triiodo-L-tironina (T3), alcanzando de esta manera un volumen total de 500 ml de medio de cultivo.

vii. Etiquetar la botella "PTT6" con la fecha en la que se preparó el medio, la inicial del operador, y la frase "vence el" seguida por la fecha de vencimiento. La fecha de vencimiento en la fecha de vencimiento más temprana de cualquiera del componente o 1 mes de la fecha de preparación, cualquiera que llegue primero.

b. Para producir el medio de enjuague (Solución de Sal Amortiguada de Hank (HBSS) sin calcio o magnesio y con FBS al 5%), adicionar 2.5 ml de FBS a 47.5 ml de HBSS en un tubo de centrífuga de 50 ml. Etiquetar el tubo "medio de enjuague" con las iniciales del operador y la fecha en que se hizo el medio.

c. Todos los medios se probarán para esterilidad utilizando Bactec Lytic/10-Anaerobic/F (Becton Dickinson & Company) y Bactec Pluc+ Aerobic/F (Becton Dickinson & Company). Inyectar 20 ml del medio preparado en cada bote.

2.2 Descongelación de tejido de cordón umbilical para recolección de MSC:

a. Iniciar la descongelación una vez que un operador está preparado para procesar la muestra en el

espacio limpio. No descongelar más de 1 vial a la vez salvo que los viales se originen del mismo donador.

b. Limpiar el baño de agua con desinfectante seguido por isopropanol al 70% y llenarlo con un L de agua
5 estéril. Calentar el baño de agua hasta 36-38°C.

c. Preparar 10 mL del medio de enjuague que consta de 70% a 90% de Plasmalyte A en el espacio limpio bajo un gabinete de bioseguridad. Filtrar de manera estéril la solución con un filtro de jeringa de 0.2µm unido a una
10 jeringa de 10 ml y mantener la solución refrigerada hasta el uso.

d. Colocar una etiqueta de procesamiento en un tubo cónico de 50 ml.

e. Confirmar que la temperatura de baño de está a
15 36-38°C.

f. Tomar los viales de tejido del almacenamiento de nitrógeno líquido y descongelarlos rápidamente en el baño de agua a 37°C lleno con 1L de agua estéril. El soporte de vial para el recipiente de congelación a 1°C Mr. Frosty
20 Nalgene Cryo flota con viales en su lugar y se puede utilizar como un bastidor flotante cuando se descongelan las muestras.

g. Remover el vial del baño de agua y rociarlo con

solución de isopropanol al 70%. Un buen momento para retirar el vial del baño de agua es cuando se puede ver un pequeño hielo flotando en el vial, sugiere que la temperatura interna del vial es menor que 37°C.

- 5 h. Colocar el vial en el paso y alertar al técnico de procesamiento de espacio limpio.

2.3. Preparación para procesamiento de tejido:

- 10 a. El procesamiento de tejido de cordón umbilical se debe realizar en un espacio limpio ambientalmente monitorizado (EM). Al final de cada turno, se realizan la limpieza completa de espacio y campana.

 b. Preparar/limpiar el gabinete de bioseguridad.

 c. Realizar el conteo de partículas viables en tanto que se trabaja en el gabinete de bioseguridad.

- 15 d. Montar todos los suministros necesarios en el gabinete de bioseguridad verificando cada uno por daño de envase y fechas de vencimiento. Cuando se manejan jeringas, pipetas serológicas, fórceps estériles, bisturís, placas de tejido, y agujas, asegurarse de no tocar ninguna superficie
- 20 que entrará en contacto con el producto estéril. Sólo el exterior del cilindro de jeringa, tubería, punta de émbolo y/o tapa de aguja o envoltura se pueden manejar de manera segura. Descartar el suministro si la superficie se ha

tocado o ha tocado una superficie no estéril.

e. Registrar números de lote y fechas de vencimiento (si es aplicable) de todos los reactivos y suministros que se van a utilizar.

5 f. Recibir el vial descongelado al limpiar el vial con el paño libre de pelusa humedecido con alcohol al 70% antes de transferirlo al gabinete de bioseguridad.

g. Utilizar una aguja de aspiración con una jeringa, extraer tanto líquido del vial. Evitar succionar
10 el tejido.

h. Utilizando el fórceps estéril, transferir el tejido a una placa de Petri estéril de 100 mm.

i. Adicionar una alícuota de 5 ml de medio de enjuague a los fragmentos de tejido.

15 j. Agitar los contenidos durante 15-30 segundos, entonces remover el medio de enjuague con una pipeta o jeringa con aguja de aspiración. Repetir este proceso de enjuague dos veces.

k. Adicionar 2 mL de medio de enjuague al tejido
20 para evitar secar el tejido.

2.4. Inicio del crecimiento de MSC a partir de tejido:

a. Etiquetar la parte inferior de una placa de 6 concavidades "Crecimiento 1" con número de lote de MSC o ID

de tejido de cordón umbilical y la fecha en la que se inició el crecimiento. Si se utiliza una placa de cultivo de tejido de 60 mm, dividir la placa en 4 cuadrantes al dibujar una cuadrícula en el fondo de la placa.

5 b. Utilizando el fórceps estéril, desechable, colocar un tejido de 3 x 3 mm a 5 x 5 mm en cada concavidad. Si se utiliza una placa de cultivo de tejido de 60 mm, colocar el tejido en el medio de cada cuadrante para mantener lejos los tejidos (más de 1 cm entre sí).

10 c. Llenar cada concavidad con 3 ml de PTT6

d. Utilizando una aguja de aspiración acoplada a la jeringa de 30 ml, extraer el medio suficiente para apenas cubrir el tejido. No inclinar la placa. No tocar el fondo de la concavidad con la aguja de aspiración.

15 e. Utilizando un microscopio de luz invertida, observar para el crecimiento celular cada día (24 ± 6 hrs). Se puede utilizar el sistema de formación de imágenes de cultivo celular en tiempo real en lugar del microscopio de luz.

20 f. Cambiar el medio cada día. Asegurarse de equilibrar el medio a temperatura ambiente antes del uso.

i. Aspirar el medio,

ii. Adicionar 3 ml de PTT6

iii. Aspirar hasta que el tejido apenas esté sumergido en el medio.

g. Cuando el crecimiento celular se observa del tejido, trasplantar el tejido a una nueva placa de 6
5 concavidades utilizando el mismo procedimiento que 4.a a 4.e anteriores, excepto etiquetar la placa "Crecimiento 2". Mantener el crecimiento celular en la placa de "Crecimiento 1" al adicionar 2 ml de PTT6 a cada concavidad. Observar para confluencia cada día. Reemplazar el medio cada 2-3
10 días (asegurarse de equilibrar el medio a temperatura ambiente antes del uso).

h. Cuando se observa crecimiento celular en la placa de "Crecimiento 2", repetir el paso 4.a al 4.e excepto etiquetar la placa "Crecimiento 3". Mantener el
15 crecimiento celular en la placa de "Crecimiento 2" al adicionar 2 ml de PTT6 a cada concavidad. Observar para confluencia cada día. Reemplazar el medio cada 2-3 días (asegurarse de equilibrar el medio a temperatura ambiente antes del uso).

20 i. Cuando se observa crecimiento en la placa de "Crecimiento 3", descartar el tejido. Si los tejidos son muy pequeños y no parecen interferir con el crecimiento celular, deshacerse del tejido cuando se está

subcultivando.

j. Cuando las células alcanzan 40-50% de confluencia, observar las células cada día para impedir la sobreexpansión.

- 5 k. Cuando las células alcanzan 70-80% de confluencia, subcultivar las células. No permitir que las células se expandan más allá de 80% de confluencia.

Con el tamaño de los explantes de tejido que son de aproximadamente 1-3mm, y el explante de tejido/cultivo celular se realiza en placas cuadradas de cultivo de 175 mm, el número promedio de células madre mesenquimales recolectadas de un explante habitualmente es aproximadamente de 4000 - 6000 células/explante. Por consiguiente, cuando las células madre mesenquimales se cultivan simultáneamente de 48 explantes, se pueden obtener aproximadamente 300000 células en la recolección. Estas 300000 células madre mesenquimales recolectadas de explantes entonces se pueden utilizar para el subcultivo por siembra de un matraz de cultivo celular de 175 cm² con estas 300000 células como se describe en el siguiente Ejemplo 2.5 (esto se puede conocer como Pasaje 1). Las células madre mesenquimales obtenidas de este pasaje 1 entonces se puede utilizar para sembrar nuevamente matraces

de 175cm² (Pasaje 2) y expandir las células como se describe en el siguiente Ejemplo 2.5. Las células obtenidas de tanto el Pasaje 1 como el Pasaje 2 se pueden "almacenar" por criopreservación, con las células madre mesenquimales obtenidas después del Pasaje 2 que se considera que representa el Banco Celular Maestro que estará para expansión posterior de las células madre mesenquimales, por ejemplo, en un biorreactor como se explica más adelante en el Ejemplo 2.7.

10 2.5 Subcultivo de MSC en placas de cultivo celular

a. Realizar el conteo de partículas viables en tanto que se trabaja en el gabinete de bioseguridad. Equilibrar todos los medios a temperatura ambiente antes del uso.

15 b. Cuando el crecimiento celular alcanza aproximadamente 70-80% de confluencia, subcultivar células.

i. Remover PTT6 de la placa de Petri.

ii. Enjuagar con HBSS sin calcio ni magnesio.

20 iii. Adicionar 0.2 ml de TrypLE-EDTA 1X y agitar durante 1-2 minutos.

iv. Inclinar la placa 30-45° para permitir que las células se desplacen hacia abajo por flujo gravitacional. El golpeteo suave en el lado de la placa

expide el desprendimiento.

v. Adicionar 1 ml de PTT6, Pipetear arriba y abajo suavemente, entonces, transferir células a un tubo de centrifuga de 15 ml. Utilizar la punta de pipeta limpia con
5 cada concavidad. Las células de las 6 concavidades se pueden agrupar en un tubo individual de 15ml.

vi. Centrifugar durante 10 minutos a 1200 rpm.

vii. Remover el sobrenadante y volver a suspender células con 5ml de PTT6.

10 c. Subcultivar MSC.

i. Alicuotar 50 μ l de la suspensión celular y ensayar para TNC y viabilidad por Ensayo de Exclusión Azul Tripán.

ii. Contar células utilizando un hemocitómetro.
15 Esperar contar 20-10 células/cuadrado. Si el conteo es mayor que 100, diluir la muestra original 1:5 y repetir el método Azul Tripán utilizando un hemocitómetro.

iii. Calcular las células viables/ml y células viables totales:

20 1. Células viables/ml = conteo de células viables x factor de dilución x 10^4

2. Células viables totales = conteo de células viables x factor de dilución x volumen total x 10^4

iv. Calcular % de viabilidad:

1. % de viabilidad = conteo de células viables $\times$ 100/(conteo de células viables + conteo de células muertas)

5 v. Diluir la suspensión celular a 1.0×10^6 células/ml:

1. Volumen de "X" = Células viables totales/ 10^6 células/ml

10 2. Por ejemplo, si el número de células viables totales es 1.0×10^7 ;

3. "X" = $10^7/10^6$ células/ml o 10 ml, por consiguiente, usted aumentaría su volumen total de células hasta 10 ml al adicionar 5 ml a su suspensión celular (es decir, a 5 ml).

15 vi. Si la suspensión celular es menor que 106/ml, determinar el volumen requerido para sembrar 2×10^6 células para cada placa de Petri de 150 mm o matraz de 175 cm².

20 1. Volumen para 2×10^7 células = $2 \times 10^6 \div$ células viables/ml

2. Por ejemplo, si células viables/ml es 8×10^5 células/ml, $2 \times 10^6 \div 8 \times 10^5$ células/ml o 2.5 ml son necesarios.

vii. Reservar 0.5 ml para EL análisis de marcador de MSC.

viii. Sembrar 2×10^6 células a cada placa de petri de 150 mm o matraz de 175 cm² con 30 ml de PTT6.

5 ix. Observar células para unión, formación de colonias, y confluencia cada tres días. Cuando las células alcanzan 40-50% de confluencia, observar células cada 1-2 días para impedir la sobreexpansión. NO permitir que las células se expandan más allá de 80% de confluencia. Se
10 puede utilizar un sistema de monitorización de cultivo celular en tiempo real en lugar del microscopio de luz.

x. Reemplazar el medio cada 2-3 días.

2.6 Crioconservación de células MSC

a. Realizar el conteo de partículas viables en
15 tanto que se trabaja en el gabinete de bioseguridad.

b. Cuando las células alcanzan 70-80% de confluencia, desprender células utilizando 2 ml de TrypLE-EDTA 1X para cada placa de Petri de 150 mm o frasco de 175 cm².

20 i. Remover PPT6 de la palca de Petri.

ii. Lavar con 5ml de HBSS o PBS sin calcio ni magnesio.

iii. Adicionar 2 ml de TrypLE-EDTA 1X y agitar

durante 1-2 minutos.

iv. Inclinar la placa 30-45° para permitir que las células se desplacen hacia abajo por flujo gravitacional. El golpeteo suave en el lado de la placa de Petri ayuda a expedir el desprendimiento.

v. Adicionar 10 ml de PTT6 para desactivar el TrypLE. Mezclar bien para disociar las aglutinaciones de células.

vi. Transferir células al tubo de centrifuga de 15 ml utilizando una pipeta de Pasteur.

vii. Centrifugar durante 10 minutos a 1200 rpm.

viii. Aspirar el medio y volver a suspender con 10 ml de PTT6.

ix. Tomar alícuotas de 50 μ l y determinar el número de células viables totales y el % de viabilidad como anteriormente. Se necesitará realizar el conteo de células en un periodo de 15 minutos conforme las células se empiecen a aglutinar.

c. Preparar células para crioconservación.

i. Preparar medio de suspensión celular y medio de crioconservación y congelar las células.

2.7. Subcultivo (expansión) de MSC en un biorreactor Quantum (Terumo BTC, Inc.).

También es posible utilizar un biorreactor Quantum para expandir las MSC. El número de células iniciales para la expansión en el biorreactor Quantum debe variar entre 20 a 30 millones de células por corrida. El rendimiento habitual por corrida es 300 a 700 millones de MSC en la recolección. El biorreactor se opera siguiendo el protocolo del fabricante. Las células madre mesenquimales obtenidas de esa manera habitualmente se crioconservan (ver más adelante) y sirven como Banco de Células de Trabajo.

10 Materiales/Reactivos

1. Equipo de expansión Quantum
2. Bolsa de desperdicio Quantum
3. Bolsa de medio Quantum
4. Bolsa de entrada Quantum
- 15 5. PTT6
6. PBS
7. Fibronectina
8. TrypLE
9. Jeringa de 3ml
- 20 10. Tiras de prueba de glucosa
11. Tiras de prueba de lactato
12. Placa de cultivo celular de 60ml o equivalente
13. Mezcla de gas CO₂ al 5% de grado médico

14. Combi-tip de 50ml

Equipo:

1. Gabinete de bioseguridad
2. Medidor de glucosa (Medidor de Glucosa en Sangre
5 Bayer Healthcare/Ascensia Contour)
3. Lactate Plus (Nova Biomedical)
4. Bomba peristáltica con cabezal
5. Centrífuga, Eppendorf 5810
6. Conector de Tubo Estéril
- 10 7. Pipeteador de Repetición M4
8. Sellador RF

Procedimiento:

1. Preparación del biorreactor Quantum

- a) Imprimación del biorreactor Quantum
- 15 b) Recubrimiento del biorreactor:
 - 1) Preparar la solución de fibronectina en el
gabinete de bioseguridad.
 - 1) Permitir que la fibronectina liofilizada
se aclimate a temperatura ambiente (≥ 15 min a temperatura
20 ambiente)
 - 2) Adicionar 5 ml de agua destilada estéril;
no revolver ni agitar
 - 3) Permitir que la fibronectina vaya a la

solución durante 30 minutos.

4) Utilizando una jeringa de 10 ml unida con una aguja de 18g, transferir la solución de fibronectina a una bolsa de entrada Ccell que contiene 95ml de PBS.

5 2) Unir la bolsa a la línea de "reactivo"

3) Verificar las burbujas (las burbujas se pueden remover al utilizar "Remover Aire IC" o "Remover Aire EC" y al utilizar "Lavar" como la fuente de entrada).

4) Abrir o configurar el programa para recubrir
10 el biorreactor (Figura 1. Pasos 3-5)

5) Ejecutar el programa

6) En tanto que el programa se está ejecutando para recubrir el biorreactor, preparar una bolsa de medio con 4L de medio PPT6

15 7) Unir la bolsa de medio a la línea de Medio de IC utilizando un conector de tubo estéril.

8) Cuando se completan los pasos de recubrimiento de biorreactor, desprender la bolsa de entrada de células utilizada para la solución de fibronectina utilizando un
20 sellador RF.

c) Lavar el exceso de fibronectina

d) Acondicionar el biorreactor con el medio

2. Cultivo de las células en el biorreactor Quantum

a) Carga y unión de las células con suspensión uniforme:

b) Alimentación y cultivo de las células.

5 1) Elegir la tasa de flujo de medio para alimentar las células.

2) Muestrear para lactato y glucosa todos los días.

3) Ajustar la tasa de flujos del medio conforme incrementan los niveles de lactato. La concentración tolerable máxima real de lactato se definirá por un cultivo en matraz del cual se originan las células. Determinar si el medio PTT6 adecuado está en la bolsa de medio. Si es necesario, reemplazar la bolsa de medio PTT6 con una bolsa fresca de medio PTT6.

15 4) Cuando la tasa de flujo ha alcanzado el valor deseado, medir el nivel de lactato cada 8-12 horas. Si el nivel de lactato no disminuye o si el nivel de lactato continúa incrementando, recolectar las células.

3. Recolección de las células del biorreactor Quantum

20 a) Cuando la concentración de lactato no disminuye, recolectar las células después del muestreo para lactato y glucosa por última vez.

b) Recolección de las células:

1) Unir la bolsa de entrada de células llena con 100ml de TrypLE a la línea de "Reactivo" utilizando un conector de tubo estéril.

5 2) Confirmar que el suficiente PBS está en la bolsa de PBS. Si no está, unir una nueva bolsa con al menos 1.7 litros de PBS a la línea de "Lavar" utilizando un conector de tubo estéril.

3) Ejecutar el programa de recolección

4. Crioconservación de las células

10 1) Una vez que las células se han recolectado, transferir las células al tubo de centrifuga de 50 ml para sedimentar las células.

2) Volver a suspender utilizando 25 ml de solución de suspensión celular congelada. Contar las
15 células utilizando un contador de Células Sysmex o Biorad. Unir el reporte de conteo de células al respectivo registro de lote de procesamiento Quantum.

3) Ajustar la concentración de células a 2×10^7 /ml

4) Adicionar la solución de crioconservación de
20 volumen igual y mezclar bien (no agitar ni someter a vórtice)

5) Utilizando un pipeteador de repetición, adicionar 1ml de la suspensión celular en crioconservante a

cada vial de 1.8ml. Crioconservar utilizando el programa CRF como se describe en SOP D6.100 CB crioconservación utilizando congeladores de tasa controlada.

5 6) Almacenar los viales en un espacio de almacenamiento de nitrógeno líquido designado.

7) Unir el reporte de ejecución de CRF a la respectiva forma MSC P3-Registro de Lote de Procesamiento Quantum

10 3. Análisis de expresión de marcador de células madre en poblaciones de células madre mesenquimales de revestimiento de cordón aisladas a partir de tejido de cordón umbilical, utilizando diferentes medios de cultivo

15 Se llevaron a cabo experimentos de citometría de flujo para analizar las células madre mesenquimales aisladas del cordón umbilical para la expresión de los marcadores de células madre mesenquimales CD73, CD90 y CD105.

20 Para estos experimentos, las células madre mesenquimales se aislaron del tejido de cordón umbilical por el cultivo del tejido de cordón umbilical en tres diferentes medios de cultivo, seguido por el subcultivo de las células madre mesenquimales en el respectivo medio como se expone en el Ejemplo 2.

Los siguientes tres medios de cultivo se utilizaron en estos experimentos: a) 90% (v/v) DMEM complementado con 10% de FBS (v/v), b) el medio de cultivo PTT-4 descrito en la solicitud de patente de Estados Unidos 2006/0078993 y la
5 solicitud de patente Internacional correspondiente WO2006/019357 que consta de 90% (v/v) de CMRL1066, y 10% (v/v) de FBS (ver párrafo [0183] de WO2006/016357 y c) el medio de cultivo de la presente invención, PTT-6, la composición del cual se describe en la presente. En este
10 análisis de citometría de flujo, se analizaron dos muestras diferentes de la población de células madre mesenquimales de revestimiento de cordón (CLMC) para cada uno de los tres medios de cultivo utilizados.

Se utilizó el siguiente protocolo para el análisis
15 de citometría de flujo.

Materiales y métodos

20	Nombre de instrumentos	Nombre de compañía	Número de serie
	BD FACS CANDO	BD	V07300367
	Microscopio Invertido, CKX41SF	Olympus	4K40846
	Centrífuga, de sobremesa de Microgiro	Biosan	010213-1201-0003

Lista de reactivos	Nombre de compañía	Número de catálogo
Trypsina 10 X	Biowest	X0930-100
PBS 10 X	Lonza	17-517Q

Descripción
PCT/SG2017/050500
Marzo 19, 2019

69

DMEM	Lonza	12-604F
Suero Bovino Fetal	GE healthcare	A11-151

5	Lista de anticuerpos	Nombre de compañía	Número de catálogo
	AD2 purificado con CD73 humano 0.1mg	BD	550256
	5E10 purificado con CD90 humano 1mL	BD	550402
	266 purificado con CD105 humano 0.1mg	BD	555690
	IgG de cabra de flúor 647 anti-ratón Alexa (H+L) *2 mg/mL*	BD	A21235

10

Nombre de reactivos	Composición
PBS 1 X (1L)	100ml de PBS 10 X + 900ml de H2O estéril destilado
PBA 1X (50ml)	49.5ml de PBS 1X + 0.5ml de FBS

15 Procedimiento

a) Aislamiento y cultivo celular de la membrana de revestimiento de cordón umbilical

1. Se incubaron muestras de tejido de explante en una placa de cultivo celular y se sumergieron en el respectivo medio, entonces se mantuvieron en el incubador con CO₂ a 37°C como se explica en el Ejemplo 2.

20

2. El medio se cambió cada 3 días.

3. El crecimiento celular de los explantes de

25

cultivo de tejido se monitorizó bajo el microscopio de luz.

4. En una confluencia de aproximadamente 70%, las células se separaron de la placa por tripsinización (tripsina al 0.0125%/EDTA al 0.05%) y se utilizaron para experimentos de citometría de flujo.

b) Tripsinización de células para experimentos

1. Remover el medio de la placa de cultivo celular.
2. Agitar suavemente con PBS 1X estéril para remover trazas de FBS puesto que el FBS interferirá con la acción enzimática de tripsina.
3. Adicionar tripsina 1X a la placa de cultivo celular e incubar durante 3-5 minutos en 37°C.
4. Observar las células bajo microscopio para asegurarse de que se desalojan. Neutralizar la tripsina al adicional el medio completo que contiene FBS (DMEM con FBS al 10%).
5. Utilizar una pipeta para romper las aglutinaciones de células al pipetear células en el medio contra una pared de la placa. Recolectar y transferir la suspensión celular en tubos de centrifuga de 50 ml.
6. Adicionar PBS 1X estéril a la placa y agitarlo, recolectar la suspensión celular en el mismo tubo

de centrífuga.

7. Centrifugarlo a 1800 rpm durante 10 minutos.

8. Descartar el sobrenadante y volver a suspender el sedimento celular con el medio PBA.

5 c) Conteo de células

1. Garantizar que el hemocitómetro y su tapa de cubierta están limpias y secas, preferentemente al lavarlas con etanol al 70% y dejarlas secar antes de limpiarlas con paños Kim (papel libre de pelusa).

10 2. Toma en alícuotas una cantidad pequeña de células en suspensión en un tubo de microcentrífuga y remover la campana de BSC.

3. Teñir células en suspensión con un volumen igual de Azul Tripán, por ejemplo, a 500µl de suspensión
15 500µl de Azul Tripán (factor de dilución = 2X, dando por resultado la solución de Azul Tripán al 0.2%).

4. Evitar la exposición de células a Azul Tripán durante más de 30 minutos puesto que Azul Tripán es tóxico y conducirá a un incremento en células no viables, dando un
20 falso conteo de células.

5. Adicionar 20µl de la mezcla de suspensión celular a cada cámara de un hemocitómetro y ver bajo un microscopio de luz.

a. Contar el número de células viables (células brillantes; las células no viables adoptan el Azul Tripán fácilmente y por consiguiente son oscuras) en cada cuadrante del hemocitómetro para un total de 8 cuadrantes en la cámara superior e inferior.

El conteo de células total se da como (número promedio de células/cuadrante) $\times 10^4$ células/ml.

d) Tinción de células

i. Preparación antes de tinción de células

• Se toma en alícuotas la suspensión celular en 3 tubos (CD73, CD90, CD105) en duplicados y 2 tubos (control negativo), cada uno que contiene 50000 células.

ii. Tinción con anticuerpo primario (Ab)

• Adicionar 1 μ l [0.5mg/ml de Ab] de anticuerpo primario a 100 μ l de suspensión celular. Incubar a 4°C durante 45 minutos.

• Producir hasta 1 ml con PBA.
• Centrifugar 800 rpm a 4°C durante 5 minutos.

• Remover sobrenadante.
• Adicionar 1ml de PBA y volver a suspender sedimento.

- Centrifugar 8000 rpm a 4°C durante 5 minutos.
 - Remover sobrenadante.
 - Volver a suspender en 100µl de PBA.
- 5 iii. Tinción con Ab secundario, en la oscuridad
- Adicionar 1 µl [0.5mg/ml de Ab] de anticuerpo secundario a 100µl de suspensión celular. Incubar a 4°C durante 30 minutos.
- 10 • Producir hasta 1 ml con PBA.
- Centrifugar 800 rpm a 4°C durante 5 minutos.
 - Remover sobrenadante.
 - Adicionar 1ml de PBA y volver a suspender
- 15 sedimento.
- Centrifugar 8000 rpm a 4°C durante 5 minutos.
 - Remover sobrenadante.
 - Volver a suspender en 200-300µl de PBA
- 20 para análisis de citometría de flujo
- Transferir células a tubo de FACS para lectura en citometría de flujo de BD FACS CANDO.

Los resultados del análisis de citometría de flujo se muestran en la figura 6a a la figura 6c. La figura 6a muestra el porcentaje de las células madre mesenquimales aisladas de revestimiento de cordón que expresan marcadores de células madre CD73, CD90 y CD105 después del aislamiento de tejido de cordón umbilical y cultivo en DMEM/FBS al 10%, la figura 6b muestra el porcentaje de las células madre mesenquimales aisladas de revestimiento de cordón que expresan marcadores de células madre CD73, CD90 y CD105 después del aislamiento del tejido de cordón umbilical y cultivo en PTT-4 y la figura 6c muestra el porcentaje de células madre mesenquimales aisladas de revestimiento de cordón que expresan marcadores de células madre CD73, CD90 y CD105 después del aislamiento de tejido de cordón umbilical y cultivo en PTT-6. Como se puede ver a partir de la figura 6a, la población aislada utilizando DMEM/FBS al 10% como medio de cultivo tiene aproximadamente 75% de células CD73+, 78% de células CD90+ y 80% de células CD105+ (promedio de dos experimentos), en tanto que después del aislamiento/cultivo de tejido de cordón umbilical utilizando el medio de cultivo PTT-4 (ver figura 6b) el número de células madre mesenquimales que son CD73-positivo, CD90-positivo y CD105-positivo son

aproximadamente 85% (células CD73+), 93% (células CD90+) y 86% (células CD105+), promedio de dos experimentos. La pureza de la población de células madre mesenquimales que se obtuvo por medio de cultivo en el medio PTT-6 de la presente invención es al menos 99.0% con respecto a los tres marcadores (CD73, CD90, CD105), lo que significa que la pureza de esta población de células es significativamente más alta que para el cultivo utilizando el medio PTT-4 o DMEM/FBS al 10%. Además y lo que es aún más importante, la población de células madre mesenquimales obtenida por medio de cultivo en PTT-6 es esencialmente una población de células madre definida y 100% pura. Esto hace a la población de células madre de la presente invención el candidato ideal para terapias a base de células madre. Por consiguiente, esta población de células madre mesenquimales de revestimiento de cordón puede llegar a ser el patrón oro para estos enfoques terapéuticos a base de células madre.

Los hallazgos mostrados en la figura 6 se corroboran adicionalmente por los resultados del análisis de citometría de flujo que se muestran en la figura 7a y la figura 7b. La figura 7a muestra el porcentaje de células madre mesenquimales aisladas de revestimiento de cordón (células madre mesenquimales de la membrana amniótica de

cordón umbilical) que expresan los marcadores de células madre CD73, CD90 y CD105 y carecen de expresión de CD34, CD45 y HLA-DR después del aislamiento del tejido de cordón umbilical y cultivo en el medio PTT-6. Como se muestra en la figura 7a, la población de células madre mesenquimales contenía 97.5% de células viables de las cuales el 100% expresó cada uno de CD73, CD90 y CD105 (ver las filas "CD73+CD90+" y "CD73+CD105+") en tanto que el 99.2% de la población de células madre no expresó CD45 y el 100% de la población de células madre no expresó CD34 ni HLA-DR (ver las filas "CD34-CD45-" y "CD34-HLA-DR-"). Por consiguiente, la población de células madre mesenquimales obtenida por el cultivo en el medio PTT-6 es esencialmente una población de células madre 100% pura y definida que cumple con los criterios que las células madre mesenquimales deben cumplir para ser utilizadas para terapia celular (95% o más de la población de células madre expresan CD73, CD90 y CD105, en tanto que 98% o más de la población de células madre carecen de expresión de CD34, CD45 y HLA-DR, ver Sensebe et al. "Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review", supra). Se observa en la presente que las presentes células madre mesenquimales de la membrana amniótica se adhieren al

plástico en condiciones de cultivo normales y se
diferencian *in vitro* en osteoblastos, adipocitos y
condroblastos, ver patentes de Estados Unidos 9,085,755,
patentes de Estados Unidos 8,287,854 o W02007/046775 y por
5 consiguiente cumplen con los criterios aceptados en general
para el uso de células madre mesenquimales en terapia
celular.

La figura 7b muestra el porcentaje de células madre
mesenquimales aisladas de médula ósea que expresan CD73,
10 CD90 y CD105 y carecen de expresión de CD34, CD45 y HLA-DR.
Como se muestra en la figura 7b, la población de células
madre mesenquimales de médula ósea contenía 94.3% de
células viables de las cuales el 100% expresó cada uno de
CD73, CD90 y CD105 (ver las filas "CD73+CD90+" y "CD73+CD
15 105+") en tanto que solo el 62.8% de la población de
células madre de médula ósea careció de expresión de CD45 y
el 99.9% de la población de células madre careció de
expresión de CD34 y HLA-DR (ver las filas "CD34-CD45-" y
"CD34-HLA-DR-"). Por consiguiente, las células madre
20 mesenquimales de médula ósea que se considera que son el
patrón oro de células madre mesenquimales son por mucho
homogéneas/puras en término de marcador de células madre
que la población de células madre mesenquimales (de la

membrana amniótica del cordón umbilical) de la presente solicitud. Este hallazgo también muestra que la población de células madre de la presente invención puede ser el candidato ideal para las terapias a base de células madre y
5 puede llegar a ser el patrón oro para enfoques terapéuticos a base de células madre.

Será fácilmente evidente para una persona experta en la técnica que se pueden realizar diversas sustituciones y modificaciones a la invención descrita en la presente sin
10 desviarse del alcance y espíritu de la invención.

Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la especificación son indicativas de los niveles de aquellos expertos en la técnica a las cuales pertenece la invención. Todas las patentes y publicaciones se incorporan
15 en la presente como referencia al mismo grado como si cada publicación individual se indicara en específico y de manera individual para incorporarse como referencia.

Las invenciones descritas en la presente de manera ilustrativa se pueden practicar de manera adecuada en la
20 ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no descritos específicamente en la presente. Por consiguiente, por ejemplo, los términos "que comprende", "que incluye", "que contiene", etc., se deben

leer de manera expansiva y sin limitación. Adicionalmente, los términos y expresiones empleados en la presente se han utilizado como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención en el uso de estos términos y expresiones de excluir ningún equivalente de las características mostradas y descritas o porciones de las mismas, pero se reconoce que diversas modificaciones son posibles dentro del alcance de la invención reivindicada. Por consiguiente, se debe entender que aunque la presente invención se ha descrito específicamente por modalidades preferidas y características opcionales, se puede recurrir a la modificación y variación de las invenciones incorporadas en las mismas descritas en la presente por aquellos expertos en la técnica, y que se considera que estas modificaciones y variaciones están dentro del alcance de esta invención. La invención se ha descrito ampliamente y de manera genérica en la presente. Cada una de las especies más estrechas y agrupaciones subgenéricas que caen dentro de la descripción genérica también forman parte de la invención. Esto incluye la descripción genérica de la invención con una condición o limitación negativa que remueve cualquier materia del género, independientemente de si o no el material eliminado se cita específicamente en la

presente. Además, donde las características o aspectos de la invención se describen en términos de grupos de Markush, aquellos expertos en la técnica reconocerán que la invención también se describe, por consiguiente, en
5 términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush. Las modalidades adicionales de la invención llegarán a ser evidentes a partir de las siguientes reivindicaciones.

10

15

20

25

REIVINDICACIONES

1. Un método para aislar una población de células madre mesenquimales de la membrana amniótica del cordón umbilical, el método que comprende cultivar el tejido de
5 cordón umbilical en un medio de cultivo que comprende DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco), F12 (Medio F12 de Ham), M171 (Medio 171) y FBS (Suero Bovino Fetal).

2. El método de la reivindicación 1, en donde el medio de cultivo comprende DMEM en una concentración final
10 de aproximadamente 55 a 65% (v/v), F12 en una concentración final de aproximadamente 5 a 15% (v/v), M171 en una concentración final de aproximadamente 15 a 30% (v/v) y FBS en una concentración final de aproximadamente 1 a 8% (v/v).

3. El método de la reivindicación 2, en donde el
15 medio de cultivo comprende DMEM en una concentración final de aproximadamente 57.5 a 62.5% (v/v), F12 en una concentración final de aproximadamente 7.5 a 12.5 % (v/v), M171 en una concentración final de aproximadamente 17.5 a 25.0% (v/v) y FBS en una concentración final de
20 aproximadamente 1.75 a 3.5% (v/v).

4. El método de la reivindicación 3, en donde el medio de cultivo comprende DMEM en una concentración final de aproximadamente 61.8 % (v/v), F12 en una concentración

final de aproximadamente 11.8 % (v/v), M171 en una concentración final de aproximadamente 23.6 % (v/v) y FBS en una concentración final de aproximadamente 2.5 % (v/v).

5 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el medio de cultivo además comprende Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) en una concentración final de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 20 ng/ml.

10 6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el medio de cultivo comprende EGF en una concentración final de aproximadamente 10 ng/ml.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el medio de cultivo comprende insulina en una concentración final de aproximadamente 1 µg/ml a 10 µg/ml.

15 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el medio de cultivo comprende insulina en una concentración final de aproximadamente 5 µg/ml.

20 9. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el medio de cultivo comprende además al menos uno de los siguientes complementos: adenina, hidrocortisona, y sal de sodio de 3,3',5-Triiodo-L-tironina (T3).

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones

anteriores, en donde el medio de cultivo comprende los tres de adenina, hidrocortisona, y sal de sodio de 3,3',5-Triiodo-L-tironina (T3).

5 11. El método de la reivindicación 10, en donde el medio de cultivo comprende adenina en una concentración final de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.1 µg/ml de adenina, hidrocortisona en una concentración final de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 µg/ml de hidrocortisona, y/o sal de sodio de 3,3',5-Triiodo-L-
10 tironina (T3) en una concentración final de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 5 ng/ml.

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende cultivar el tejido de cordón umbilical hasta que el crecimiento celular de las células
15 madre mesenquimales de la membrana amniótica alcance aproximadamente 70-80% de confluencia.

13. El método de la reivindicación 12, que comprende remover las células madre mesenquimales del recipiente de cultivo utilizado para el cultivo.

20 14. El método de la reivindicación 13, en donde la remoción de las células madre mesenquimales del recipiente de cultivo se lleva a cabo por tratamiento enzimático.

15. El método de la reivindicación 14, en donde el

tratamiento enzimático comprende tripsinización.

16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en donde las células madre mesenquimales se transfieren para subcultivo a un recipiente de cultivo para el subcultivo.

17. El método de la reivindicación 16, en donde las células mesenquimales se suspenden para el subcultivo en una concentración de 1.0×10^6 células/ml.

18. El método de la reivindicación 17, en donde las células madre mesenquimales se subcultivan en un medio de cultivo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

19. El método de la reivindicación 18, en donde las células madre mesenquimales se subcultivan hasta que las células madre mesenquimales alcanzan aproximadamente 70-80% de confluencia.

20. El método de cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en donde el subcultivo se lleva a cabo en un biorreactor autocontenido.

21. El método de la reivindicación 20, en donde el biorreactor se selecciona del grupo que consta de un biorreactor de placa paralela, un biorreactor de fibra hueca y un biorreactor de microfluidos.

22. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tejido de cordón umbilical es una pieza de todo el cordón umbilical o la membrana amniótica del cordón umbilical.

5 23. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el cultivo se lleva a cabo en una incubadora de cultivo celular con CO₂ a una temperatura de 37°C.

10 24. El método de la reivindicación 23, que comprende remover las células madre mesenquimales del recipiente de cultivo utilizado para el subcultivo.

25. El método de la reivindicación 24, en donde la remoción de las células madre mesenquimales del recipiente de cultivo se lleva a cabo por tratamiento enzimático.

15 26. El método de la reivindicación 25, en donde el tratamiento enzimático comprende tripsinización.

27. El método de la reivindicación 26, que comprende además recolectar las células madre mesenquimales aisladas.

20 28. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde al menos aproximadamente 90% o más, aproximadamente 91% o más, aproximadamente 92% o más, aproximadamente 92% o más, aproximadamente 93% o más,

aproximadamente 94% o más, aproximadamente 95% o más,
aproximadamente 96% o más, aproximadamente 97% o más,
aproximadamente 98% o más, aproximadamente 99% o más de las
células madre mesenquimales aisladas expresan los
5 siguientes marcadores: CD73, CD90 y CD105.

29. El método de cualquiera de las reivindicaciones
anteriores, en donde al menos aproximadamente 90% o más,
aproximadamente 91% o más, aproximadamente 92% o más,
aproximadamente 92% o más, aproximadamente 93% o más,
10 aproximadamente 94% o más, aproximadamente 95% o más,
aproximadamente 96% o más, aproximadamente 97% o más,
aproximadamente 98% o más, aproximadamente 99% o más de las
células madre mesenquimales aisladas carecen de expresión
de los siguientes marcadores: CD34, CD45 y HLA-DR (Antígeno
15 de Leucocitos Humanos - Antígeno D Relacionado).

30. El método de cualquiera de las reivindicaciones
28 o 29, en donde aproximadamente 97% o más,
aproximadamente 98% o más, aproximadamente 99% o más de las
células madre mesenquimales aisladas expresan CD73, CD90 y
20 CD105 y carecen de expresión de CD34, CD45 y HLA-DR.

31. El método de cualquiera de las reivindicaciones
anteriores, que comprende además conservar las células
progenitoras/madre aisladas para uso posterior.

32. El método de la reivindicación 31, en donde la conservación se lleva a cabo por crioconservación.

33. Una población de células madre mesenquimales aisladas de la membrana amniótica del cordón umbilical, en
5 donde al menos aproximadamente 90% o más células de la población de células madre expresan cada uno de los siguientes marcadores: CD73, CD90 y CD105.

34. La población de células madre mesenquimales de la reivindicación 33, en donde al menos aproximadamente 90%
10 o más células de la población de células madre carecen de la expresión de cada uno de CD34, CD45 y HLA-DR.

35. La población de células madre mesenquimales de la reivindicación 34, en donde al menos aproximadamente 91% o más, aproximadamente 92% o más, aproximadamente 92% o
15 más, aproximadamente 93% o más, aproximadamente 94% o más, aproximadamente 95% o más, aproximadamente 96% o más, aproximadamente 97% o más, aproximadamente 98% o más, aproximadamente 99% o más células de la población de células madre mesenquimales aisladas expresan cada uno de
20 CD73, CD90 y CD105 y carecen de la expresión de cada uno de CD34, CD45 y HLA-DR.

36. La población de células madre mesenquimales de cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35, en donde la

población se puede obtener por el método como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30.

37. La población de células madre mesenquimales de cualquiera de las reivindicaciones 33 a 35, en donde la población se obtiene por el método como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30.

38. Una composición farmacéutica que comprende una población de células madre mesenquimales aisladas de la membrana amniótica del cordón umbilical, en donde al menos 90% o más células de la población de células madre expresan cada uno de los siguientes marcadores: CD73, CD90 y CD105 y carecen de la expresión de cada uno de los siguientes marcadores: CD34, CD45 y HLA-DR.

39. La composición farmacéutica de la reivindicación 38, en donde la composición farmacéutica se adapta para aplicación sistémica o tópica.

40. La composición farmacéutica de la reivindicación 38 o 39, que comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

41. Un método para producir un medio de cultivo adecuado para aislar una población de células madre mesenquimales de la membrana amniótica del cordón umbilical, el método que comprende la mezcla para obtener

un volumen final de 500 ml de medio de cultivo:

- i. 250 ml de DMEM
- ii. 118 ml de M171
- iii. 118 ml de DMEM/F12
- 5 iv. 12.5 ml de Suero Bovino Fetal (FBS)
(concentración final de 2.5%).

42. El método de la reivindicación 41, que comprende además adicionar

- v. 1 ml de solución madre de EGF (5 µg/ml) para
10 lograr una concentración final de 10ng/ml.

vi. 0.175 ml de solución madre de insulina (14.28 mg/ml) para lograr una concentración final de 5 µg/ml.

- 43. El método de la reivindicación 41 o 42, que comprende además adicionar a DMEM uno o más de los
15 siguientes complementos: adenina, hidrocortisona, y sal de sodio de 3,3',5-Triiodo-L-tironina (T3), logrando de esta manera un volumen total de 500 ml de medio de cultivo.

- 44. El método de la reivindicación 43, en donde la concentración final de los complementos en DMEM es como
20 sigue,

aproximadamente 0.05 a 0.1 µg/ml de adenina, por ejemplo, aproximadamente 0.025 µg/ml de adenina,

aproximadamente 1 a 10 $\mu\text{g/ml}$ de hidrocortisona,
aproximadamente 0.5 a 5 ng/ml de sal de sodio de
3,3',5-Triiodo-L-tironina (T3), por ejemplo, 1.36 ng/ml de
sal de sodio de 3,3',5-Triiodo-L-tironina (T3).

5 45. Un medio de cultivo celular obtenible por el
método de cualquiera de las reivindicaciones 41 a 44.

 46. Un método para aislar células madre
mesenquimales de la membrana amniótica del cordón
umbilical, que comprende el cultivo de tejido de membrana
10 amniótica en el medio de cultivo preparado por el método
como se define en cualquiera de las reivindicaciones 41 a
44.

 47. Un medio de cultivo celular que comprende:

 - DMEM en la concentración final de aproximadamente
15 55 a 65% (v/v),

 - F12 en una concentración final de aproximadamente
5 a 15% (v/v),

 - M171 en una concentración final de
aproximadamente 15 a 30% (v/v), y

20 - FBS en una concentración final de aproximadamente
1 a 8% (v/v).

 48. El medio de cultivo celular de la
reivindicación 47, en donde el medio de cultivo comprende

DMEM en la concentración final de aproximadamente 57.5 a 62.5% (v/v), F12 en una concentración final de aproximadamente 7.5 a 12.5 % (v/v), M171 en una concentración final de aproximadamente 17.5 a 25.0% (v/v) y

5 FBS en una concentración final de aproximadamente 1.75 a 3.5% (v/v).

49. El medio de cultivo celular de la reivindicación 48, en donde el medio de cultivo comprende DMEM en una concentración final de aproximadamente 61.8 %

10 (v/v), F12 en una concentración final de aproximadamente 11.8 % (v/v), M171 en una concentración final de aproximadamente 23.6 % (v/v) y FBS en una concentración final de aproximadamente 2.5 % (v/v).

50. El medio de cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones 47 a 49, en donde el medio de cultivo además comprende Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) en una concentración final de aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 20 ng/ml.

15

51. El medio de cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 50, en donde el medio de cultivo comprende EGF en una concentración final de aproximadamente 10 ng/ml.

20

52. El medio de cultivo celular de cualquiera de

las reivindicaciones 47 a 51, en donde el medio de cultivo comprende insulina en una concentración final de aproximadamente 1 $\mu\text{g/ml}$ a 10 $\mu\text{g/ml}$.

5 53. El medio de cultivo celular de la reivindicación 52, en donde el medio de cultivo comprende insulina en una concentración final de aproximadamente 5 $\mu\text{g/ml}$.

10 54. El medio de cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones 47 a 53, en donde el medio de cultivo comprende además al menos uno de los siguientes complementos: adenina, hidrocortisona, y sal de sodio de 3,3',5-Triiodo-L-tironina (T3).

15 55. El medio de cultivo celular de la reivindicación 54, en donde el medio de cultivo comprende los tres de adenina, hidrocortisona, y sal de sodio de 3,3',5-Triiodo-L-tironina (T3).

20 56. El medio de cultivo celular de la reivindicación 54 o 55, en donde el medio de cultivo comprende adenina en una concentración final de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de adenina, hidrocortisona en una concentración final de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 $\mu\text{g/ml}$ de hidrocortisona, y/o sal de sodio de 3,3',5-Triiodo-L-

tironina (T3) en una concentración final de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 5 ng/ml.

57. El medio de cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones 47 a 56, en donde 500 ml del medio de cultivo celular comprenden:

- i. 250 ml de DMEM
 - ii. 118 ml de M171
 - iii. 118 ml de DMEM/F12
 - iv. 12.5 ml de Suero Bovino Fetal (FBS)
- 10 (concentración final de 2.5%).

58. El medio de cultivo celular de la reivindicación 57, que comprende además

- v. EGF en una concentración final de 10ng/ml.
- vi. Insulina en una concentración final de 5µg/ml.
- 15 vii. 0.175 ml de insulina (concentración final de 5µg/ml).

59. El medio de cultivo celular de la reivindicación 57 o 58, que comprende además adenina en una concentración final de aproximadamente 0.05 a aproximadamente 0.1 µg/ml de adenina, hidrocortisona en una concentración final de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 µg/ml de hidrocortisona, y/o sal de sodio de 3,3',5-Triiodo-L-tironina (T3) en una concentración final de

aproximadamente 0.5 a aproximadamente 5 ng/ml.

60. El uso de un medio de cultivo celular como se define en cualquiera de las reivindicaciones 47 a 59, para aislamiento de células madre mesenquimales de la membrana amniótica de cordón umbilical.

61. El uso de un medio de cultivo celular como se define en cualquiera de las reivindicaciones 47 a 59, para cultivo de células madre mesenquimales de la membrana amniótica de cordón umbilical.

10

15

20

25

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para aislar una población de células madre mesenquimales de la membrana amniótica del cordón umbilical, el método que

5 comprende cultivar el tejido de cordón umbilical en un medio de cultivo que comprende DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco), F12 (Medio F12 de Ham), M171 (Medio 171) y FBS (Suero Bovino Fetal). La invención también se refiere a una población de células madre mesenquimales aisladas de la

10 membrana amniótica del cordón umbilical, en donde al menos aproximadamente 90% o más células de la población de células madre expresan cada uno de los siguientes marcadores: CD73, CD90 y CD105 y carecen de expresión de los siguientes marcadores: CD34, CD45 y HLA-DR. La

15 invención también se refiere a una composición farmacéutica de esta población de células madre mesenquimales.