

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

3. El método de la reivindicación 2, en donde el medio de cultivo comprende DMEM en una concentración final de 57.5 a 62.5% (v/v), F12 en una concentración final de 7.5 a 12.5% (v/v), M171 en una concentración final de 17.5 a 25.0% (v/v) y FBS en una concentración final de 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 61.8% (v/v), F12 en una concentración final de 11.8% (v/v), M171 en una concentración final de 23.6% (v/v) y FBS en una concentración final de 2.5 % (v/v).

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 1 ng/ml a 20 ng/ml.

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

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

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).

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

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 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.

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.

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.

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.

28. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde al menos 90% o más, 91% o más, 92% o más, 93% o más, 94% o más, 95% o más, 96% o más, 97% o más, 98% o más, 99% o más de las células madre mesenquimales aisladas expresan los siguientes marcadores: CD73, CD90 y CD105.

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

30. El método de cualquiera de las reivindicaciones 28 o 29, en donde 97% o más, 98% o más, 99% o más de las células madre mesenquimales aisladas expresan CD73, CD90 y 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/madres aisladas.

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

33. Una composición farmacéutica que comprende una población de células madre mesenquimales aisladas de la membrana amniótica del cordón umbilical, en donde al menos 97% 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 cada uno de los siguientes marcadores: CD34, CD45 y HLA-DR.

34. La composición farmacéutica de la reivindicación 33, que comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

35. 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

5 iii. 118 ml de DMEM/F12

iv. 12.5 ml de Suero Bovino Fetal (FBS) (concentración final de 2.5%).

36. El método de la reivindicación 35, que comprende además adicionar

10 v. 1 ml de solución madre de EGF (5 μ g/ml) para 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 μ g/ml.

15 37. El método de la reivindicación 35 o 36, que
comprende además adicionar a DMEM uno o más de los 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.

38. El método de la reivindicación 37, en donde la concentración final de
los complementos en DMEM es como sigue,

20 0.05 a 0.1 μ g/ml de adenina, por ejemplo, 0.025 μ g/ml de
adenina, 1 a 10 μ g/ml de hidrocortisona, 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).

25 39. Un método para aislar células madre mesenquimales de la membrana
amniótica del cordón umbilical, que comprende el cultivo de tejido de membrana
amniótica en el medio de cultivo preparado por el método como se define en
cualquiera de las reivindicaciones 35 a 38.

40. Un medio de cultivo celular que comprende:

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

10 41. El medio de cultivo celular de la reivindicación 40, en donde el medio de cultivo comprende DMEM en la concentración final de 57.5 a 62.5% (v/v), F12 en una concentración final de 7.5 a 12.5% (v/v), M171 en una concentración final de 17.5 a 25.0% (v/v) y FBS en una concentración final de 1.75 a 3.5% (v/v).

15 42. El medio de cultivo celular de la reivindicación 41, en donde el medio de cultivo comprende DMEM en una concentración final de 61.8% (v/v), F12 en una concentración final de 11.8% (v/v), M171 en una concentración final de 23.6 % (v/v) y FBS en una concentración final de 2.5 % (v/v).

20 43. El medio de cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones 40 a 42, en donde el medio de cultivo además comprende Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) en una concentración final de 1 ng/ml a 20 ng/ml.

20 44. El medio de cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones 40 a 43, en donde el medio de cultivo comprende EGF en una concentración final de 10 ng/ml.

25 45. El medio de cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones 40 a 44, en donde el medio de cultivo comprende insulina en una concentración final de 1 µg/ml a 10 µg/ml.

46. El medio de cultivo celular de la reivindicación 45, en donde el medio de cultivo comprende insulina en una concentración final de 5 µg/ml.

47. El medio de cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones 40 a 46, 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).

5 48. El medio de cultivo celular de la reivindicación 47, en donde el medio de cultivo comprende los tres de adenina, hidrocortisona, y sal de sodio de 3,3',5-Triiodo-L- tironina (T3).

 49. El medio de cultivo celular de la reivindicación 47 o 48, en donde el medio de cultivo comprende adenina en una concentración final de 0.05 a 0.1 µg/ml de adenina, hidrocortisona en una concentración final de 1 a 10 µg/ml de hidrocortisona, y/o sal de sodio de 3,3',5-Triiodo-L-tironina (T3) en una concentración final de 0.5 a 5 ng/ml.

 50. El medio de cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones 40 a 49, en donde 500 ml del medio de cultivo celular comprenden:

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

 51. El medio de cultivo celular de la reivindicación 50, que comprende, además

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

52. El medio de cultivo celular de la reivindicación 51 o 52, que comprende además adenina en una concentración final de 0.05 a 0.1 µg/ml de adenina, hidrocortisona en una concentración final de 1 a 10 µg/ml de hidrocortisona, y/o sal de sodio de 3,3',5-Triiodo-L-tironina (T3) en una concentración final de 0.5 a 5 ng/ml.