

REPÚBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Resolución N° 79208

Ref. Expediente N° NC2019/0002569

Por la cual se otorga una Patente de Invención

EL SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

en ejercicio de sus facultades legales, en especial de las conferidas en el numeral 26 del artículo 3° del Decreto 4886 de 2011, y

CONSIDERANDO:

Que mediante escrito radicado en esta Superintendencia el 19 de marzo de 2019, con el N° NC2019/0002569, por CELLRESEARCH CORPORATION PTE. LTD., entró a fase nacional la solicitud de patente de invención titulada “MÉTODO PARA AISLAR CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES A PARTIR DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE CORDÓN UMBILICAL UTILIZANDO UN MEDIO DE CULTIVO CELULAR”, que corresponde a la solicitud internacional PCT/SG2017/050500 del 5 de octubre de 2017.

Que la solicitud fue publicada en la Gaceta de la Propiedad Industrial N° 861 el 31 de mayo de 2019 habiéndose presentado oposición por parte del INSTITUTO DISTRITAL DE CIENCIA BIOTECNOLOGIA E INNOVACIÓN EN SALUD – IDC BIS.

Que realizado el examen de fondo mediante Oficio N° 10275, notificado el 06 de julio de 2021, se requirió al solicitante en los términos del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina para que presentara respuesta a las observaciones de carácter técnico, relacionadas con la patentabilidad o cumplimiento de los requisitos establecidos por esta Decisión para la concesión de la patente.

Que el solicitante mediante escrito radicado bajo el N° NC2019/0002569 el 16 de noviembre de 2021, respondió oportunamente el requerimiento formulado y presentó las reivindicaciones 1 a 44 que reemplazan las originalmente presentadas. Se acepta este último capítulo reivindicatorio presentado, comoquiera que se ajusta a las prescripciones contenidas en el artículo 34 de la Decisión 486.

Que en virtud de lo dispuesto en el artículo 14 de la Decisión 486 expedida por la Comisión de la Comunidad Andina *“Los países miembros otorgarán patentes para las invenciones, sean de producto o de procedimiento, en todos los campos de la tecnología, siempre que sean nuevas, tengan nivel inventivo y sean susceptibles de aplicación industrial.”*

Que en el presente caso las reivindicaciones 1 a 44 incluidas en el radicado bajo el N° NC2019/0002569 el 16 de noviembre de 2021, cumplen los requisitos indicados en el considerando anterior, toda vez que refieren a un método para aislar una población de células madre mesenquimales de la membrana amniótica del cordón umbilical que difiere



Resolución N° 79208

Ref. Expediente N° NC2019/0002569

del estado de la técnica más cercano, Pham, P.V, *et al. Cell and Tissue Banking*¹, en que el medio de cultivo empleado en el método de la solicitud comprende DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco), F12 (Medio F12 de Ham), M171 (Medio 171), FBS (Suero Bovino Fetal), Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) e insulina, con sus respectivas concentraciones. Adicionalmente, estas diferencias no se encuentran sugeridas en el estado de la técnica y, como consecuencia de ello, se evidencia el aislamiento de una población de células madre mesenquimales de la membrana amniótica del cordón umbilical 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 la expresión de cada uno de los siguientes marcadores: CD34, CD45 y HLA-DR, obteniendo una alta pureza de dicha población y, por lo tanto, esta población de células madre mesenquimales de revestimiento de cordón umbilical puede llegar a ser un patrón para enfoques terapéuticos a base de células madre (Págs. 75 y 76, Figs. 5, 6c, 7a). Sumado a lo anterior, la materia reivindicada, es susceptible de aplicación industrial.

En consecuencia, las reivindicaciones 1 a 44 cumplen los requisitos de novedad, nivel inventivo y aplicación industrial establecidos en la normatividad citada en precedencia y este Despacho encuentra procedente conceder para las mismas la patente solicitada.

Análisis de la Oposición

Argumentaciones del INSTITUTO DISTRITAL DE CIENCIA, BIOTECNOLOGÍA E INNOVACIÓN EN SALUD - IDCBS.

El opositor menciona con respecto a materia no patentable que *“El Artículo 14 de la Decisión 486 establece que:*

Artículo 14.- Los Países Miembros otorgarán patentes para las invenciones, sean de producto o de procedimiento, en todos los campos de la tecnología, siempre que sean nuevas, tengan nivel inventivo y sean susceptibles de aplicación industrial.

En el presente caso, las Reivindicaciones 59 y 60, dirigidas a usos corresponden a materia no patentable en Colombia”.

El opositor continua argumentando que *“El Artículo 15 b) de la Decisión 486 establece que no se considerarán invenciones el todo o parte de seres vivos tal como se encuentran en la naturaleza, los procesos biológicos naturales, el material biológico existente en la naturaleza o aquel que pueda ser aislado, inclusive genoma o germoplasma de cualquier ser vivo natural.*

Por lo anterior, las Reivindicaciones 27 a 36, dirigidas a células madre mesenquimales corresponden a materia existente en la naturaleza, ya que el hecho de que se describan como células aisladas no implica una modificación estructural de las mismas, y por lo tanto corresponden a materia tal y como se encuentra en la naturaleza, la cual está excluida de patentabilidad”.

¹ Pham, P. V, *et al.* (2015). Isolation and proliferation of umbilical cord tissue derived mesenchymal stem cells for clinical applications. *Cell and Tissue Banking*. Recuperado desde: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10561-015-9541-6>

Resolución N° 79208

Ref. Expediente N° NC2019/0002569

Por otra parte, el opositor menciona que “La Decisión 486, Artículo 30, establece en cuanto a las reivindicaciones:

Artículo 30.- Las reivindicaciones definirán la materia que se desea proteger mediante la patente. Deben ser claras y concisas y estar enteramente sustentadas por la descripción.
- Las Reivindicaciones 1 a 11 carecen de claridad, concisión y soporte puesto que se refieren a un método de aislamiento/cultivo de células que no está definido de acuerdo con sus etapas y condiciones en que se realiza, sino por el medio de cultivo que se utiliza.
- Las Reivindicaciones 28 a 30 reclaman un método definido por la población de células que se obtiene, es decir pretenden definir el método por el resultado obtenido. - Las Reivindicaciones 28 a 34 contienen términos imprecisos que no permiten determinar el alcance de la protección tales como “al menos”, “aproximadamente”, “o más”.

- Adicionalmente las reivindicaciones se refieren a porcentajes de células madre que expresan marcadores, lo cual no es limitativo.
- Las Reivindicaciones 33 a 35 se refieren a células madre mesenquimales que no están definidas estructuralmente sino en términos de los marcadores que expresan o de los que carecen de expresión, es decir, mediante resultados a alcanzar.
- Por otra parte, la solicitud pretende protección para modalidades que no se encuentran soportadas en la descripción ni en los ejemplos, tales como composiciones farmacéuticas que comprenden las células de la invención sin especificar los componentes o las proporciones de los mismos.”

Ahora bien, con respecto al Nivel Inventivo el opositor relaciona los siguientes documentos:

Ítem	Autor	Título	Fecha de publicación
D1 ²	Jin Jin H et al	Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Blood as Sources of Cell Therapy Hanging basket assembly for freezer	03/09/2013
D2 ³	Salehinejad P et al	Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly	25/01/2012
D3 ⁴	Ping Chee et al	Enhanced ex vivo expansion of adult mesenchymal stem cells by fetal mesenchymal stem cell ECM	21/02/2014
D4 ⁵	Pirjali T et al	Isolation and Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Umbilical Cord Wharton's Jelly and Amniotic Membrane	

2 Jin Jin H et al. 2013. Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Blood as Sources of Cell Therapy. Int J Mol Sci;14:17986-18001

3 Salehinejad P et al. 2012. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. In Vitro Cell.Dev.Biol.—Animal;48:75–83

4 Ping Chee et al. 2014. Enhanced ex vivo expansion of adult mesenchymal stem cells by fetal mesenchymal stem cell ECM. Biomaterials;35:404-4057

5 Pirjali T et al. 2013. Isolation and Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Umbilical Cord Wharton's Jelly and Amniotic Membrane. Int J Org Transplant Med;4(3):111-116



Resolución N° 79208

Ref. Expediente N° NC2019/0002569

D5 ⁶	Zhao G et al	Large-scale expansion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on gelatin microbeads, with retention of self-renewal and multipotency characteristics and the capacity for enhancing skin wound healing	19/03/2015
D6 ⁷	Caplan A	Mesenchymal Stem Cells	17/01/91
D7 ⁸	DiMarino A et al	Mesenchymal stem cells in tissue repair	04/09/2013
D8 ⁹	Xi J et al	Mesenchymal stem cells in tissue repairing and regeneration: Progress and future	06/2013
D9 ¹⁰	Bianco P et al	Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays	10/04/2009
D10 ¹¹	Dominici M et al	Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement	2006
D11 ¹²	Turinetto V et al	Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells:Functional Changes and Implications in Stem CellBased Therapy	19/07/2016
D12 ¹³	Smith J R et al	Standardizing Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells for Translation to Clinical Use: Selection of GMP-CompliantMedium and a Simplified Isolation Method	29/12/2015

Adicionalmente, el opositor realiza el siguiente análisis sobre dichos documentos: “Los documentos citados anteriormente se refieren a métodos para el aislamiento o cultivo de células madre mesenquimales de diversas fuentes, entre ellas de cordón umbilical, a los medios de cultivo necesarios para su aislamiento y a poblaciones de células obtenidas mediante dicho cultivo las cuales expresan marcadores de superficie característicos, mientras que carecen de la expresión de otros factores. Por todo lo anterior la presente solicitud podría haber sido derivada de manera obvia a partir de los documentos citados, de manera independiente o en combinación. A continuación se mencionan los documentos más cercanos a la solicitud:

D1: Para caracterizar las MSC de diferentes fuentes, se comparó la médula ósea humana (BM), el tejido adiposo (AT) y las MSC derivadas de la sangre del cordón umbilical (UCB-MSC) para la expresión del antígeno de superficie, la capacidad de diferenciación, la capacidad de proliferación, la clonalidad, la tolerancia al envejecimiento, y la actividad paracrina. Aunque las MSC de diferentes tejidos tienen niveles similares de expresión de antígeno de superficie, actividad inmunosupresora y capacidad de diferenciación, las UCB-MSC tuvieron la tasa más alta de proliferación celular y clonalidad, y una expresión significativamente menor de p53, p21 y p16, marcadores de senescencia bien conocidos.

6 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25889402/>
7 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jor.1100090504>
8 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24027567/>
9 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4994498/>
10 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2613570/pdf/nihms51371.pdf>
11 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16923606/>
12 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4964536/pdf/ijms-17-01164.pdf>
13 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4757747/pdf/SCI2016-6810980.pdf>

Resolución N° 79208

Ref. Expediente N° NC2019/0002569

Los resultados confirman que las MSC de las tres fuentes pueden diferenciarse con éxito en múltiples tipos de células, incluidos osteoblastos, condrocitos y adipocitos.

D2: el método de aislamiento utilizado modificó profundamente el número de células y la capacidad de proliferación de las células aisladas. Las células se diferenciaron con éxito en linajes adipogénicos y osteogénicos y se detectó actividad de fosfatasa alcalina en las colonias de células hUCM de todos los grupos. El análisis de citometría de flujo reveló que CD44, CD73, CD90 y CD105 se expresaron en todos los grupos, mientras que CD34 y CD45 no se expresaron. La expresión de C-kit en los grupos enzimáticos fue mayor que en el grupo explante, mientras que la expresión de Oct-4 fue mayor en el grupo CT en comparación con los otros grupos. Se llegó a la conclusión de que el método de colagenasa / tripsina de aislamiento celular produce una mayor densidad celular que los demás. Estas células expresaron una tasa más alta de marcadores celulares pluripotentes como C-kit y Oct-4, mientras que el método de explante de aislamiento celular resultó en una tasa y actividad de proliferación celular más alta en comparación con los otros métodos.

(...)

La expresión de los marcadores hematopoyéticos CD34 y CD45, y los marcadores de células madre mesenquimales CD44 y CD105, fue casi similar en todos los grupos. Sin embargo, la expresión de los marcadores mesenquimales CD73 y CD90 fue diferente entre los tres grupos.

Los resultados informados por otros investigadores son inconsistentes hasta cierto punto cuando se considera la expresión del marcador celular. Por ejemplo, se informó que los patrones de expresión para CD105, CD73, CD44 y CD90 eran del 35%, 42%, 48% y 65%, respectivamente, en células WJ después del aislamiento por digestión con colagenasa (Schugar et al. 2009), mientras que, el 96% y el 91% de las células hUCM se tiñeron positivamente para CD44 y CD90, respectivamente.

D3: La expansión a gran escala de células madre mesenquimales humanas adultas altamente funcionales (aMSC) sigue siendo un desafío tecnológico ya que las aMSC pierden la capacidad de autorrenovación y multipotencia durante el cultivo tradicional a largo plazo y su calidad / cantidad disminuye con la edad y la enfermedad del donante. La identificación de condiciones de cultivo que permitan una expansión y rejuvenecimiento prolongados tendría un impacto dramático en la medicina regenerativa. (...)

D4: Se recuperaron membranas fetales y cordones umbilicales (n = 3) de mujeres sanas a término que se sometieron a cesárea electiva. El amnios se despegó del corion y se enjuagó en solución salina tamponada con fosfato (PBS) para eliminar la sangre. Las piezas de tejido se transfirieron a placas de 10 cm² que contenían DMEM suplementado con FBS al 10% + penicilina 100 U / ml, estreptomicina 100 µg / ml, y se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂. (...)

Así pues, la materia reclamada en la presente solicitud podría haber sido derivada de manera evidente a partir de las enseñanzas de cualquiera de los documentos mencionados o de la combinación de los mismos, dado que todos ellos divulgan métodos para aislar o cultivar células madre mesenquimales de diversos orígenes y medios de

Resolución N° 79208

Ref. Expediente N° NC2019/0002569

cultivo para hacer el aislamiento/cultivo. Los documentos citados guiarían a una persona versada en la materia técnica a obtener el método reclamado con base en las divulgaciones allí incluidas y el conocimiento general de la técnica. Cualquier persona medianamente versada en la materia se habría visto motivada para introducir las modificaciones necesarias y llegar al método reclamado sin necesidad de acudir a experimentación adicional. Por lo tanto la materia reclamada en la solicitud de patente NC2019/0002569 no reviste nivel inventivo sobre el arte previo aquí mencionado.”

Respuesta del solicitante a los argumentos del INSTITUTO DISTRITAL DE CIENCIA, BIOTECNOLOGÍA E INNOVACIÓN EN SALUD - IDC BIS.

El solicitante no radicó respuesta al traslado de oposición del Oficio N° 9504 notificado el 04 de septiembre de 2019.

Respuesta de la Oficina

A continuación, esta Oficina se permite analizar cada uno de los argumentos y documentos presentados por el opositor.

Con respecto al argumento del opositor que menciona “*En el presente caso, las Reivindicaciones 59 y 60, dirigidas a usos corresponden a materia no patentable en Colombia*”, esta Oficina advierte que en el capítulo reivindicatorio radicado bajo el N° NC2019/0002569 el 16 de noviembre de 2021, se eliminaron las reivindicaciones relativas a los usos del medio de cultivo celular.

El opositor argumenta que en el capítulo reivindicatorio se reclama materia considerada no invención “*Por lo anterior, las Reivindicaciones 27 a 36, dirigidas a células madre mesenquimales corresponden a materia existente en la naturaleza, ya que el hecho de que se describan como células aisladas no implica una modificación estructural de las mismas, y por lo tanto corresponden a materia tal y como se encuentra en la naturaleza, la cual está excluida de patentabilidad*”. En primer lugar, esta Oficina aclara que las reivindicaciones 27 a 32 radicadas bajo N° NC2019/0002569 el 19 de marzo de 2019 y sobre las cuales se presentó la oposición, no reclaman células madre mesenquimales como el opositor manifiesta sino que la materia reclamada en dichas reivindicaciones es un método que depende de las reivindicaciones anteriores donde el objeto es un método de aislamiento de las células madre mesenquimales, por lo tanto, aunque este método menciona dichas células es evidente que se está reclamando reivindicaciones concernientes a la categoría de proceso y no de producto como lo manifiesta el opositor. Sin embargo, en cuanto a las reivindicaciones 33 a 36, esta Oficina le asiste la razón al opositor porque dichas reivindicaciones reclamaban una población de células madre mesenquimales aisladas de la membrana amniótica del cordón umbilical, por tal motivo, en el Oficio N° 14837 dichas reivindicaciones fueron objetadas por el art. 15 literal b) de la Decisión 486. En segundo lugar, se evidencia que el capítulo reivindicatorio radicado bajo el N° NC2019/0002569 el 16 de noviembre de 2021, no reclama la población de células madre mesenquimales aisladas de la membrana amniótica del cordón umbilical.

El opositor menciona falta de claridad, concisión y soporte en el Capítulo Descriptivo y luego relaciona el artículo 30 de la Decisión 486, al respecto esta Oficina aclara que, las

Resolución N° 79208

Ref. Expediente N° NC2019/0002569

objeciones relativas a la suficiencia y claridad del capítulo descriptivo están relacionadas con el artículo 28 de la Decisión 486 y no como el opositor lo sostiene con referencia al artículo 30. Así las cosas, el artículo 30 está enfocado a la claridad, concisión y sustento de las reivindicaciones, por lo tanto, esta Oficina resalta que el capítulo reivindicatorio radicado bajo el N° NC2019/0002569 el 16 de noviembre de 2021 define de manera clara y concisa el método para aislar una población de células madre mesenquimales de la membrana amniótica del cordón umbilical que comprende cultivar tejido de la membrana amniótica del 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 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 10 de 15 a 30% (v/v) y FBS en una concentración final de 1 a 8% (v/v), en donde medio de cultivo además comprende Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) en una concentración final de 1 ng/ml a 20 ng/ml e insulina en una concentración final de 1 µg/ml a 10 µg/ml. Por lo anterior, dicho método reclama una etapa y condiciones específicas, las cuales tienen pleno sustento en el capítulo descriptivo. Así mismo, cualquier persona versada en la materia podría llegar a reproducir y ejecutar la invención según lo divulgado en el capítulo descriptivo ya que dicho capítulo cumple con suficiencia y claridad.

Por otra parte, en cuanto a los argumentos del opositor que mencionan *“la solicitud pretende protección para modalidades que no se encuentran soportadas en la descripción ni en los ejemplos, tales como composiciones farmacéuticas que comprenden las células de la invención sin especificar los componentes o las proporciones de los mismos”* y *“Adicionalmente las reivindicaciones se refieren a porcentajes de células madre que expresan marcadores, lo cual no es limitativo”*. Esta Oficina establece que, aunque en el capítulo descriptivo no hay ejemplos de composiciones, el solicitante no está obligado a presentar ejemplos de dichas composiciones y es claro que si la persona normalmente versada en la materia puede reproducir y ejecutar la invención con lo divulgado en el capítulo descriptivo este cumple con suficiencia. Así las cosas, una persona normalmente versada en la materia podría producir una composición farmacéutica que comprende una población de células madre mesenquimales aisladas de la membrana amniótica del cordón umbilical y un excipiente farmacéuticamente aceptable, 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, según lo divulgado en la descripción. Ahora bien, en dicha reivindicación se está reclamando un tipo específico de células madre, es decir, células madre mesenquimales aisladas de la membrana amniótica del cordón umbilical que se mezclan con excipientes farmacéuticamente aceptables, donde al menos 97% o más de dicha población celular está caracterizada por expresar los marcadores CD73, CD90 y CD105 y carecer de la expresión de cada uno de los siguientes marcadores: CD34, CD45 y HLA-DR, lo cual es limitativo y permite distinguir la materia reclamada.

Por último, el opositor presenta argumentos por falta de nivel inventivo relacionados con la reivindicación 1 del capítulo reivindicatorio radicado bajo N° NC2019/0002569 el 19 de marzo de 2019 que reclamaba *“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*

Resolución N° 79208

Ref. Expediente N° NC2019/0002569

DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco), F12 (Medio F12 de Ham), M171 (Medio 171) y FBS (Suero Bovino Fetal)”. Esta Oficina reitera que, el capítulo reivindicatorio fue modificado por el solicitante mediante radicado N° NC2019/0002569 el 16 de noviembre de 2021, por lo tanto, el análisis de falta de nivel inventivo con los documentos mencionados por el opositor se realizará con base en estas últimas reivindicaciones.

El documento denominado por el opositor D1² de Jin Jin H, *et al.* con título “*Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Blood as Sources of Cell Therapy Hanging basket assembly for freezer*” y fecha de publicación 03/09/2013 enseña análisis comparativos de las MSC de diferentes fuentes, donde se comparó la médula ósea humana (BM), el tejido adiposo (AT) y las MSC derivadas de la sangre del cordón umbilical (UCBMSC) para la expresión del antígeno de superficie, la capacidad de diferenciación, la capacidad de proliferación, la clonalidad, la tolerancia al envejecimiento, y la actividad paracrina. Aunque las MSC de diferentes tejidos tienen niveles similares de expresión de antígeno de superficie, actividad inmunosupresora y capacidad de diferenciación, las UCBMSC tuvieron la tasa más alta de proliferación celular y clonalidad, y una expresión significativamente menor de p53, p21 y p16, marcadores de senescencia bien conocidos. Los resultados confirman que las MSC de las tres fuentes pueden diferenciarse con éxito en múltiples tipos de células, incluidos osteoblastos, condrocitos y adipocitos.

El documento nombrado por el opositor D2³ de Salehinejad P, *et al.*, titulado “*Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton’s jelly*” y fecha de publicación 25/01/2012 divulga un método de aislamiento, el cual modificó el número de células y la capacidad de proliferación de las células aisladas. Las células se diferenciaron con éxito en linajes adipogénicos y osteogénicos y se detectó actividad de fosfatasa alcalina en las colonias de células hUCM de todos los grupos. El análisis de citometría de flujo reveló que CD44, CD73, CD90 y CD105 se expresaron en todos los grupos, mientras que CD34 y CD45 no se expresaron. La expresión de C-kit en los grupos enzimáticos fue mayor que en el grupo explante, mientras que, la expresión de Oct-4 fue mayor en el grupo CT en comparación con los otros grupos. Se llegó a la conclusión de que el método de colagenasa / tripsina de aislamiento celular produce una mayor densidad celular que los demás. Estas células expresaron una tasa más alta de marcadores celulares pluripotentes como C-kit y Oct-4, en tanto que, el método de explante de aislamiento celular resultó en una tasa y actividad de proliferación celular más alta en comparación con los otros métodos. Dicho documento menciona el empleo de WJ el cual fue separado de la membrana amniótica y donde el grupo experimental explante (Exp) WJ se sembró en una placa de cultivo con DMEM-F12 suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% (v/v), penicilina (100 unidades / ml), estreptomycin (100 µg / ml) y anfotericina B (2.5 µg / ml) durante 2 semanas. En este período, la mitad del medio de cultivo se renovó cada 5 días hasta que las células migraron desde los bordes del fragmento y alcanzaron aproximadamente 80% de confluencia.

El documento designado por el opositor D3⁴ de Ping Chee, *et al.*, con título “*Enhanced ex vivo expansion of adult mesenchymal stem cells by fetal mesenchymal stem cell ECM*” y fecha de publicación 21/02/2014 enseña la expansión a gran escala de células madre mesenquimales humanas adultas altamente funcionales (aMSC) mencionando que sigue siendo un desafío tecnológico ya que las aMSC pierden la capacidad de autorrenovación

Resolución N° 79208

Ref. Expediente N° NC2019/0002569

y multipotencia durante el cultivo tradicional a largo plazo y su calidad / cantidad disminuye con la edad y la enfermedad del donante. La identificación de condiciones de cultivo que permitan una expansión y rejuvenecimiento prolongados tendría un impacto dramático en la medicina regenerativa.

Adicionalmente, D3⁴ menciona que las fMSC se aislaron y se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco con alto contenido de glucosa (DMEM) (Life Technologies, Carlsbad, CA) suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10% (calificado con MSC) (Life Technologies, Carlsbad, CA) y penicilina/estreptomicina al 1% (Life Technologies, Carlsbad, CA), denominado medio D10. Se obtuvieron células madre mesenquimales de humanos adultos (aMSC) del segundo pasaje de Lonza (Basilea, Suiza) y se cultivaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Donde las hMSC deben expresar altos niveles de CD73, CD90, CD105 y carecer de la expresión de CD45, CD34, CD79a y HLA-DR, según lo definido por el Comité de células madre de tejido mesenquimatoso y tisular de la Sociedad Internacional para Terapia Celular (ISCT). Los resultados de la Fig. 3 muestran que, de forma similar a sus contrapartes cultivadas en TCPS, las aMSC retienen su inmunofenotipo cuando se cultivan en ECM fMSC.

Por otra parte, el documento nombrado por el opositor D4⁵ de Pirjali T, *et al.*, titulado *"Isolation and Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Umbilical Cord Wharton's Jelly and Amniotic Membrane"*, el opositor no relaciona la fecha de publicación, sin embargo, realizando la búsqueda de dicho documento esta Oficina determinó que la fecha de publicación fue el 01/08/2013, por ende, es anterior a la fecha de prioridad y puede considerarse parte del estado de la técnica. Así las cosas, en dicho documento el objetivo es aislar y caracterizar las células madre mesenquimales (MSC) derivadas de la gelatina de Wharton del cordón umbilical humano (WJ-MSC) y membrana amniótica (AM-MSC) en cuanto a su morfología, inmunofenotipo y mesodérmica potencial de diferenciación con el fin de obtener una fuente alternativa de MSC para tratamientos clínicos. Por consiguiente, se recuperaron membranas fetales y cordones umbilicales de mujeres sanas, la membrana amniótica y el cordón umbilical fueron separados y cultivados en DMEM suplementado con FBS al 10% + penicilina 100 U / ml, estreptomicina 100 µg / ml, y se incubaron a 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂. Se lavó el cordón, se extrajeron los vasos sanguíneos, luego se cortó el tejido en trozos (1 mm²) y se cultivó en placas de cultivo. La expansión del cultivo de pequeños trozos de tejido se conoce como el *"método de explantes"*. Los explantes se dejaron sin perturbar durante una semana para permitir la migración de células desde los márgenes de los explantes. Después de alcanzar una confluencia del 70% al 80%, las células adherentes se cosecharon con tripsinización con 0,05% de tripsina-EDTA (Gibco, Alemania); se usó una suspensión de células individuales para experimentos posteriores. Tanto, las WJ-MSC como las AM-MSC se caracterizaron por la expresión de marcadores de superficie celular con citometría de flujo.

Con respecto, al documento denominado por el opositor D5⁶ de Zhao G, *et al.* con título *"Large-scale expansion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on gelatin microbeads, with retention of self-renewal and multipotency characteristics and the capacity for enhancing skin wound healing"* y fecha de publicación 19/03/2015 tuvo como objetivo establecer un sistema de cultivo tridimensional a gran escala de hWJ-MSC e investigar la actividad de autorrenovación, la estabilidad genómica y el potencial de la

Resolución N° 79208

Ref. Expediente N° NC2019/0002569

diferenciación de múltiples linajes, tales como, hWJ-MSC para mejorar la cicatrización de heridas cutáneas. En cuanto, a la metodología se sembraron hWJ-MSC en microperlas de gelatina y se cultivaron en botellas giratorias 3D, mientras que, otras se sembraron en cultivos 2D, como resultado las hWJ-MSC que se cultivaron en 3D tuvieron mayor proliferación que las cultivadas en 2D. Así mismo, en los dos cultivos se evidenciaron marcadores de superficie. Concluyendo que, las hWJ-MSC se pueden expandir notablemente en microperlas de gelatina, mientras retienen marcadores de superficie MSC, potencial diferencial multipotente y expresión de factores de transcripción centrales. Estas células también se pueden emplear de manera eficiente para curar heridas en la piel *in vivo*, de una manera comparable a las hWJ-MSC obtenidas a partir del cultivo 2D.

El documento nombrado por el opositor D6⁷ de Caplan A, titulado “*Mesenchymal Stem Cells*” y con fecha de publicación 17/01/1991 enseña que la formación de hueso y cartílago en el embrión, la reparación y renovación en el adulto involucran a la progenie de una pequeña cantidad de células llamadas células madre mesenquimales. Estas células se dividen y su progenie se compromete con una ruta fenotípica distintiva, un linaje con pasos discretos y, finalmente, las células en etapa terminal involucradas en la fabricación de un tipo de tejido único, por ejemplo, cartílago o hueso. Los factores extrínsecos y factores intrínsecos (potencial genómico) interactúan en cada paso del linaje para controlar la tasa y las características fenotípicas de las células en el tejido emergente. El estudio de estas células madre mesenquimales, ya sean aisladas de embriones o adultos, proporciona la base para el surgimiento de una nueva tecnología terapéutica de reparación de las propias células. El aislamiento, la expansión mitótica y entrega dirigida al sitio de células madre autólogas puede gobernar la reparación rápida y específica de los tejidos esqueléticos. Cabe resaltar que, dicho documento no divulga el aislamiento de células madre mesenquimales aisladas de la membrana amniótica del cordón umbilical ni métodos o medios de cultivos específicos para dicho aislamiento.

Por su parte, el documento designado por el opositor D7⁸ de DiMarino A, *et al.*, titulado “*Mesenchymal stem cells in tissue repair*” y con fecha de publicación 04/09/2013 menciona la importancia de las células madre mesenquimales para el tratamiento de una variedad de enfermedades asociadas con inflamación, daño tisular y posterior regeneración y reparación. Este documento se enfoca en las medidas de eficacia y potencia para la función de la actividad de las MSC y su aplicación en el ámbito clínico. Así pues, el D7⁸ no divulga el aislamiento de células madre mesenquimales aisladas de la membrana amniótica del cordón umbilical ni métodos o medios de cultivos específicos para dicho aislamiento.

El documento denominado por el opositor D8⁹ de Xi J, *et al.*, titulado “*Mesenchymal stem cells in tissue repairing and regeneration: Progress and future*” y con fecha de publicación 06/2013 enseña que la presencia de células progenitoras mesenquimales en la médula ósea se conoce desde finales del siglo XIX. Hasta la fecha, se han aislado células madre mesenquimales (MSC) de varios tejidos conectivos, como: tejido adiposo, músculo, placenta, cordón umbilical, sangre, hígado y pulpa dental. Sin embargo, la médula ósea sigue siendo la principal fuente de MSC para investigación preclínica y clínica. Las MSC fueron evaluadas por primera vez para aplicaciones regenerativas y desde entonces se ha demostrado que pueden influir en el sistema inmunológico y promover la neovascularización de los tejidos isquémicos. Estas observaciones han provocado una

Resolución N° 79208

Ref. Expediente N° NC2019/0002569

nueva era del trasplante de MSC como tratamiento para diversas enfermedades. Dicho documento resume los estudios importantes en el uso de MSC como agente terapéutico para la medicina regenerativa, los trastornos inmunitarios, el cáncer y la terapia génica. Además, menciona los mecanismos involucrados en las terapias basadas en MSC y la fabricación de las MSC de grado clínico.

Ahora bien, el documento relacionado por el opositor como D9¹⁰ de Bianco P, *et al.*, titulado “*Mesenchymal Stem Cells: Revisiting History, Concepts, and Assays*” y con fecha de publicación 10/04/2009 revisa el concepto de poblaciones de células madre mesenquimales y el marco experimental necesario para evaluar su origen y función. Esta Oficina considera importante mencionar que, el documento D9¹⁰ no divulga medios de cultivos como el reclamado por la solicitud objeto de decisión ni el aislamiento de células madre mesenquimales aisladas de la membrana amniótica del cordón umbilical.

Con relación, al documento denominado por el opositor D10¹¹ de Dominici M, *et al.*, titulado “*Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement*” y publicado en el año 2006, cabe mencionar que, aunque dicho documento divulga los perfiles de expresión de los marcadores superficiales de las MSC, es decir, que $\geq 95\%$ de la población de MSC expresa CD105, CD73 y CD90, también estas células deben carecer de la expresión ($\leq 2\%$ positivas) de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79 α o CD19 y HLA clase II. Es importante resaltar que, no es posible con estas enseñanzas obtener la composición reclamada en esta solicitud, dado que, la composición reclamada tiene un mayor grado de pureza y unos marcadores específicos que definitivamente no están presentes en dichas células, al mencionar que, al menos el 97% o más células de la población de células madre mesenquimales aisladas de la membrana amniótica 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.

Siguiendo con el análisis de los documentos relacionados por el opositor para afectar el nivel inventivo el documento nombrado por el opositor D11¹² de Turinetto V, *et al.*, con título “*Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell- Based Therapy*” y publicado el 19/07/2016 enseña que la medicina regenerativa está muy interesada en desarrollar terapias celulares utilizando células madre mesenquimales (MSC) con aplicaciones en varias enfermedades asociadas al envejecimiento, por lo tanto, se requiere de una amplia expansión celular *ex vivo* y relaciona que una proporción sustancial de células puede experimentar senescencia. En este documento se caracteriza fenotípicamente las células madre mesenquimales humanas senescentes (hMSCs) y sus posibles alteraciones funcionales. La acumulación de estrés oxidativo y la desregulación de los factores reguladores de diferenciación determinan la disminución del potencial de diferenciación de hMSCs también muestran un marcado deterioro en sus migraciones, provocando la proliferación o la migración de células cancerosas. De acuerdo con lo anterior, el documento menciona que es importante monitorear la ocurrencia de las hMSCs por los cambios nocivos y evaluar posibles formas de prevenir *in vitro* la senescencia de las hMSC.

Finalmente, el opositor indica el documento D12¹³ de Smith J R, *et al.*, titulado “*Standardizing Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells for Translation to Clinical Use:*

Resolución N° 79208

Ref. Expediente N° NC2019/0002569

Selection of GMP-Compliant Medium and a Simplified Isolation Method” con fecha de publicación 29/12/2015, el cual divulga la estandarización para el aislamiento y la expansión de células estromales mesenquimales derivadas del cordón umbilical (UC- MSCs) empleando digestión enzimática, logrando la reducción de riesgos en la contaminación y tiempo de manipulación y demostrando una mayor producción de UC- MSCs por gramo después del parto vaginal en comparación con los partos por cesárea. Las UC- MSCs se expandieron en un medio enriquecido con 2%, 5%, o 10% de lisado plaquetario humano (HPL) combinado eliminando componentes del suero xenogénico. Así mismo, las UC- MSCs cultivadas en HPL al 10% tenían una expresión de marcador de superficie típica de MSC. Sin embargo, dicho documento no enseña un método para aislar células madre mesenquimales aisladas de la membrana amniótica del cordón umbilical ni los medios de cultivo celular con los componentes reclamados en la solicitud.

Por lo anterior, ninguno de los documentos mencionados por el opositor solos o en combinación enseñan ni sugieren el método de aislamiento de células madre mesenquimales aisladas de la membrana amniótica del cordón umbilical ni los componentes ni concentraciones del medio de cultivo celular reclamados como características técnicas esenciales del método, es decir, donde el medio de cultivo comprende: DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco), F12 (Medio F12 de Ham), M171 (Medio 171) y FBS (Suero Bovino Fetal), 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 10 de 15 a 30% (v/v) y FBS en una concentración final de 1 a 8% (v/v), en donde medio de cultivo además comprende Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) en una concentración final de 1 ng/ml a 20 ng/ml e insulina en una concentración final de 1 µg/ml a 10 µg/ml, con el fin de producir 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 la expresión de cada uno de los siguientes marcadores: CD34, CD45 y HLA-DR, lo cual indica una población con alta pureza. Así las cosas, tampoco se puede anticipar una composición farmacéutica que comprenda dicha población celular y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En conclusión, no es posible afectar el nivel inventivo del objeto reclamado en las reivindicaciones 1 a 44 radicadas bajo N° NC2019/0002569 el 16 de noviembre de 2021.

Que el solicitante en el escrito radicado bajo el N° NC2019/0002569 el 19 de marzo de 2019, tituló la invención como: “MÉTODO PARA AISLAR CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES A PARTIR DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE CORDÓN UMBILICAL UTILIZANDO UN MEDIO DE CULTIVO CELULAR”. Sin embargo, no se acepta porque no especifica la materia reclamada, y de acuerdo con el objeto concedido, el título de la invención quedará de la siguiente manera: “MÉTODO PARA AISLAR CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES A PARTIR DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE CORDÓN UMBILICAL UTILIZANDO UN MEDIO DE CULTIVO CELULAR QUE COMPRENDE DMEM (MEDIO EAGLE MODIFICADO DE DULBECCO), F12 (MEDIO F12 DE HAM), M171 (MEDIO 171), FBS (SUERO BOVINO FETAL), FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF) E INSULINA”.

Resolución N° 79208

Ref. Expediente N° NC2019/0002569

Con fundamento en las anteriores consideraciones, el Superintendente de Industria y Comercio,

RESUELVE

ARTÍCULO 1: Declarar infundada la oposición presentada por el INSTITUTO DISTRITAL DE CIENCIA BIOTECNOLOGIA E INNOVACIÓN EN SALUD - IDCBIS de acuerdo con las razones expuestas en la parte considerativa de la presente Resolución.

ARTÍCULO 2: Otorgar patente de invención a la solicitud que entró en fase nacional en virtud del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), para la creación titulada:

“MÉTODO PARA AISLAR CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES A PARTIR DE MEMBRANA AMNIÓTICA DE CORDÓN UMBILICAL UTILIZANDO UN MEDIO DE CULTIVO CELULAR QUE COMPRENDE DMEM (MEDIO EAGLE MODIFICADO DE DULBECCO), F12 (MEDIO F12 DE HAM), M171 (MEDIO 171), FBS (SUERO BOVINO FETAL), FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF) E INSULINA”

Clasificación IPC: C12N 5/0775, A61K 35/51.

Reivindicación(es): 1 a 44 incluidas en el radicado bajo el N° NC2019/0002569 el 16 de noviembre de 2021, de acuerdo con el anexo 1.

Titular(es): CELLRESEARCH CORPORATION PTE. LTD.

Domicilio(s): 7500A BEACH ROAD #06-302 THE PLAZA, SINGAPORE 199591, SINGAPUR.

Inventor(es): Toan Thang PHAN.

Prioridad(es) N° 5/10/2016, US (ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA), 62/404,582.

Solicitud internacional N°: PCT/SG2017/050500 **Fecha:** 5 de octubre de 2017.

Vigente desde: 5 de octubre de 2017

Hasta: 5 de octubre de 2037.

ARTÍCULO 3: El titular tendrá los derechos y las obligaciones establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina y en las demás disposiciones legales vigentes sobre propiedad industrial, precisando que para mantener vigente la patente se deberá cancelar la tasa anual de mantenimiento, conforme lo dispone el artículo 80 de la referida norma comunitaria.

ARTÍCULO 4: Notificar el contenido de la presente resolución a CELLRESEARCH CORPORATION PTE. LTD., y en calidad de Opositor a INSTITUTO DISTRITAL DE CIENCIA BIOTECNOLOGIA E INNOVACIÓN EN SALUD - IDCBIS, advirtiéndole que contra ella procede el recurso de reposición, ante el Superintendente de Industria y Comercio, el

Resolución N° 79208

Ref. Expediente N° NC2019/0002569

cual podrá ser interpuesto en el momento de la notificación o dentro de los diez (10) días hábiles siguientes a ella.

NOTIFÍQUESE Y CÚMPLASE

Dada en Bogotá D.C., el 3 de diciembre de 2021



ANEXO 1

REIVINDICACIONES CONCEDIDAS

1. Un método para aislar una población de células madre mesenquimales de la membrana amniótica del cordón umbilical, el método que comprende cultivar tejido de la membrana amniótica del 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 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), en donde medio de cultivo además comprende Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) en una concentración final de 1 ng/ml a 20 ng/ml e insulina en una concentración final de 1 µg/ml a 10 µg/ml.
2. El método de la reivindicación 1, 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).
3. El método de la reivindicación 2, 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).
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el medio de cultivo comprende EGF en una concentración final de 10 ng/ml.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el medio de cultivo comprende insulina en una concentración final de 5 µg/ml.
6. 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).
7. 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).
8. El método de la reivindicación 7, 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.
9. 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.
10. El método de la reivindicación 9, que comprende remover las células madre mesenquimales del recipiente de cultivo utilizado para el cultivo.

Resolución N° 79208

Ref. Expediente N° NC2019/0002569

11. El método de la reivindicación 10, en donde la remoción de las células madre mesenquimales del recipiente de cultivo se lleva a cabo por tratamiento enzimático.
12. El método de la reivindicación 11, en donde el tratamiento enzimático comprende tripsinización.
13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde las células madre mesenquimales se transfieren para subcultivo a un recipiente de cultivo para el subcultivo.
14. El método de la reivindicación 13, en donde las células mesenquimales se suspenden para el subcultivo en una concentración de 1.0×10^6 células/ml.
15. El método de la reivindicación 14, en donde las células madre mesenquimales se subcultivan en un medio de cultivo como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
16. El método de la reivindicación 15, en donde las células madre mesenquimales se subcultivan hasta que las células madre mesenquimales alcanzan 70-80% de confluencia.
17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en donde el subcultivo se lleva a cabo en un biorreactor autocontenido.
18. El método de la reivindicación 17, 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.
19. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tejido de cordón umbilical es una pieza de la membrana amniótica del cordón umbilical.
20. 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.
21. El método de la reivindicación 20, que comprende remover las células madre mesenquimales del recipiente de cultivo utilizado para el subcultivo.
22. El método de la reivindicación 21, en donde la remoción de las células madre mesenquimales del recipiente de cultivo se lleva a cabo por tratamiento enzimático.
23. El método de la reivindicación 22, en donde el tratamiento enzimático comprende tripsinización.
24. El método de la reivindicación 23, que comprende además recolectar las células madre mesenquimales aisladas.
25. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde 97% o más, 98% o más, 99% o más de las células madre mesenquimales aisladas expresan los siguientes marcadores: CD73, CD90 y CD105.
26. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde 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).

Resolución N° 79208

Ref. Expediente N° NC2019/0002569

27. El método de cualquiera de las reivindicaciones 25 o 26, 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.

28. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además conservar las células progenitoras/madres aisladas.

29. El método de la reivindicación 28, en donde la conservación se lleva a cabo por crioconservación.

30. Una composición farmacéutica que comprende una población de células madre mesenquimales aisladas de la membrana amniótica del cordón umbilical y un excipiente farmacéuticamente aceptable, 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.

31. 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,

iv. 12.5 ml de Suero Bovino Fetal (FBS) (concentración final de 2.5%), que comprende además adicionar

v. 1 ml de solución madre de EGF (5 µg/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 µg/ml.

32. El método de la reivindicación 31, que comprende además adicionar a DMEM uno o más de los siguientes complementos: adenina, hidrocortisona, y sal de sodio de 3,3',5-Triodo-L-tironina (T3), logrando de esta manera un volumen total de 500 ml de medio de cultivo.

33. El método de la reivindicación 32, en donde la concentración final de los complementos en DMEM es como sigue,

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

1 a 10 µg/ml de hidrocortisona,

0.5 a 5 ng/ml de sal de sodio de 3,3',5-Triodo-L-tironina (T3), por ejemplo, 1.36 ng/ml de sal de sodio de 3,3',5-Triodo-L-tironina (T3).

34. 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 31 a 33.

Resolución N° 79208

Ref. Expediente N° NC2019/0002569

35. 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),
- M171 en una concentración final de 15 a 30% (v/v),
- FBS en una concentración final de 1 a 8% (v/v),
- Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) en una concentración final de 1 ng/ml a 20 ng/ml,
- Insulina en una concentración final de 1 µg/ml a 10 µg/ml.

36. El medio de cultivo celular de la reivindicación 35, 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).

37. El medio de cultivo celular de la reivindicación 36, 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).

38. El medio de cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37, en donde el medio de cultivo comprende EGF en una concentración final de 10 ng/ml.

39. El medio de cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones 35 a 38, en donde el medio de cultivo comprende insulina en una concentración final de 5 µg/ml.

40. El medio de cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones 35 a 39, 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).

41. El medio de cultivo celular de la reivindicación 40, en donde el medio de cultivo comprende los tres de adenina, hidrocortisona, y sal de sodio de 3,3',5-Triiodo-L-tironina (T3).

42. El medio de cultivo celular de la reivindicación 40 o 41, 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.

43. El medio de cultivo celular de cualquiera de las reivindicaciones 35 a 42, en donde 500 ml del medio de cultivo celular comprenden:

- 250 ml de DMEM,
- 118 ml de M171,
- 118 ml de DMEM/F12,

Resolución N° **79208**

Ref. Expediente N° NC2019/0002569

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

v. EGF en una concentración final de 10ng/ml.

vi. Insulina en una concentración final de 5µg/ml.

44. El medio de cultivo celular de la reivindicación 43, 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.