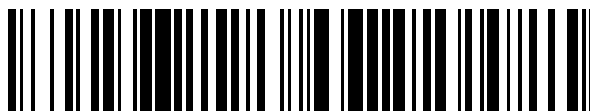


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 925**

51 Int. Cl.:

**C12M 1/00** (2006.01)  
**A61M 1/02** (2006.01)  
**C12M 1/28** (2006.01)  
**C12M 3/00** (2006.01)  
**C12N 5/0775** (2010.01)  
**C12N 5/078** (2010.01)  
**A61K 35/28** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.08.2011 PCT/JP2011/067758**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2012 WO12018040**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2011 E 11814665 (3)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2020 EP 2602310**

54 Título: **Sistema de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero, procedimiento de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero y procedimiento para producir una composición medicinal que comprende células de médula ósea cultivadas que contiene autosuero como ingrediente activo**

30 Prioridad:

**29.09.2010 JP 2010218275**  
**03.08.2010 JP 2010174903**  
**03.08.2010 JP 2010174902**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.08.2020**

73 Titular/es:

**SAPORO MEDICAL UNIVERSITY (50.0%)**  
**291, Minami 1-jo Nishi 17-chome Chuo-ku**  
**Sapporo-shi**  
**Hokkaido 060-0061, JP y**  
**NIPRO CORPORATION (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HONMOU OSAMU;**  
**YOSHIKAWA YOSHIHIRO y**  
**MORIKAWA NAOMI**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 778 925 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Sistema de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero, procedimiento de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero y procedimiento para producir una composición medicinal que comprende células de médula ósea cultivadas que contiene autosuero como ingrediente activo

### 5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un procedimiento de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero, y un procedimiento para producir una composición medicinal que comprende células de médula ósea cultivadas que contiene autosuero como ingrediente activo. Más específicamente, la presente invención se refiere a un procedimiento de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero para cultivar células de médula ósea recolectadas de un sujeto sin el uso de un anticoagulante con el suero del sujeto, y un procedimiento para producir una composición medicinal que comprende, como un ingrediente activo, células de médula ósea cultivadas que contienen autosuero obtenidas recogiendo células de médula ósea de un sujeto sin el uso de un anticoagulante y cultivando las células con el suero del sujeto.

### **Antecedentes de la invención**

15 Se ha desarrollado un procedimiento, que implica la administración intravenosa de células de médula ósea de fracciones de células mononucleares obtenidas de la médula ósea de un paciente, al paciente como parte de medicina regenerativa para tratar una enfermedad del nervio craneal, tal como infarto cerebral, lesión de la médula espinal y enfermedad desmielinizante. (Literatura de Patentes 1). Este procedimiento de tratamiento es fácil de practicar desde el punto de vista de administrar las células a la vena sin administrar directamente las células a un área afectada y, ventajosamente, puede realizarse convenientemente en entornos médicos generales.

Para un procedimiento de tratamiento de este tipo, es importante asegurar las células de médula ósea en una cantidad suficiente para la administración intravenosa a un paciente. Ejemplos de tales técnicas pueden incluir un sistema que consiste en recolectar células de médula ósea de un paciente, luego adquirir directamente las células de médula ósea de manera aséptica o adquirir de forma hermética las células de médula ósea y administrar las células al paciente (Literatura de Patentes 2), y un procedimiento que implica el cultivo de células de médula ósea contenidas en un fluido de médula ósea recolectado en un medio que contiene heparina o suero humano (Literatura de Patentes 3). Según los informes anteriores, las células de médula ósea se cultivan preferiblemente utilizando el suero de un paciente que es donante de las células de médula ósea, desde el punto de vista de la compatibilidad y la seguridad (Literatura de Patentes 4, 5 y 6). La literatura de patentes 7 se refiere a un procedimiento para suministrar una célula que prolifera rápidamente en masa para hacer frente a la terapia de una enfermedad en una etapa aguda. Se proporciona una célula que tiene la potencia de proliferación utilizable para la reparación y regeneración de un tejido corporal. La célula se origina a partir de una célula madre mieloide, y cuando se cultiva en presencia de suero homólogo, la célula tiene una tasa de proliferación mayor que la tasa de proliferación cuando se cultiva en presencia de suero ajeno.

### **Lista de citaciones**

#### 35 Literatura de Patentes

Literatura de Patentes 1: Publicación internacional No. WO2005/007176

Literatura de Patentes 2: Publicación Nacional de la Solicitud Internacional de Patente No. 2008-538514

Literatura de Patentes 3: Patente japonesa abierta a inspección pública No. 2006-055106

Literatura de Patentes 4: Patente japonesa abierta a inspección pública No. 2009-065854

40 Literatura de Patentes 5: Patente japonesa abierta a inspección pública No. 2009-065884

Literatura de Patentes 6: Publicación Internacional No. WO2009/034708

Literatura de Patentes 7: Patente japonesa abierta a inspección pública No: 2009-100719

### **Sumario de la invención**

#### Problema técnico

45 Dado que un fluido de médula ósea recolectado de un paciente coagula rápidamente, se usa un anticoagulante como la heparina para inhibir esta reacción de coagulación. Por lo general, es difícil para los profesionales de la salud cultivar inmediatamente células de médula ósea en el sitio donde se recolecta el fluido de médula ósea del paciente. Además, las células de médula ósea deben cultivarse en un centro de procesamiento celular (CPC), que es la ubicación del cultivo de células distante del sitio de recolección de médula ósea, debido a la necesidad de garantizar los efectos y la seguridad de las células de médula ósea cultivadas. Por estas razones, el anticoagulante debe usarse

inevitablemente. Sin embargo, se ha encontrado que el anticoagulante, tal como la heparina, tiene efectos inhibitorios significativos sobre el crecimiento celular.

5 En los últimos años, los entornos de la medicina regenerativa asociados con el tratamiento de la enfermedad del nervio craneal, como el infarto cerebral, la lesión de la médula espinal y la enfermedad desmielinizante, han requerido además cultivar células de médula ósea de manera limpia, segura, confiable y altamente eficiente. Ninguno de los sistemas o procedimientos convencionales satisface tales necesidades.

10 La presente invención se ha realizado para resolver estos problemas, y un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento de cultivo de células de médula ósea que contenga autosuero para anticoagulación y cultivar células de médula ósea recolectadas de un sujeto sin el uso de un anticoagulante en un estado hermético a líquidos usando un medio y cultivando adicionalmente las células de médula ósea resultantes con el suero del sujeto preparado en un estado hermético a líquidos, y un procedimiento para producir una composición medicinal que comprende células de médula ósea cultivadas que contienen autosuero como ingrediente activo .

Solución al problema

15 Como resultado de la realización de estudios diligentes, los presentes inventores han descubierto que la reacción de coagulación puede suprimirse durante un período suficiente mezclando un fluido de médula ósea que contiene células de médula ósea recolectadas de un sujeto con una cantidad mínima de medio. Los presentes inventores también han descubierto que las células de médula ósea se pueden cultivar de forma limpia, segura, confiable y altamente eficiente mezclando el fluido de médula ósea con el medio en un estado hermético en el sitio de recolección de la médula ósea para preparar una suspensión celular de médula ósea anticoagulada y transporte de la suspensión en este estado a CPC, donde se cultivan las células de médula ósea, seguido de cultivo utilizando el autosuero del sujeto preparado en un estado hermético a líquidos, o mezclando un fluido de médula ósea que contiene células de médula ósea recolectadas del sujeto con un medio en un estado hermético a líquidos en el sitio de recolección de médula ósea para preparar una suspensión de células de médula ósea anticoagulada, cultivando directamente las células de médula ósea y transportando las células resultantes a CPC, seguido de un cultivo adicional usando el autosuero del sujeto preparado en un estado hermético. Sobre la base de estos hallazgos, se ha completado la presente invención de acuerdo con la materia de las reivindicaciones 1 a 6.

30 (1) Un sistema de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero para cultivar células de médula ósea recolectadas de un sujeto sin el uso de un anticoagulante con el suero del sujeto, en el que: un fluido de médula ósea que contiene células de médula ósea recolectadas del sujeto se transfiere al sitio de recolección de una jeringa de almacenamiento de fluido de médula ósea donde el fluido de médula ósea se almacena en un recipiente de transporte de suspensión de células de médula ósea que es un recipiente rígido sellable herméticamente a líquidos, y luego se anticoagula mezclando con un medio; la suspensión de células de médula ósea anticoagulada así obtenida mediante la mezcla del fluido de médula ósea con el medio se transporta en estado suspendido mientras se almacena en el recipiente de transporte de la suspensión de células de médula ósea, y luego se transfiere a un recipiente de cultivo de células de médula ósea que cultiva las células de médula ósea en la ubicación del cultivo de células, para iniciar el cultivo; después de un lapso de un período de cultivo predeterminado, se elimina el sobrenadante de cultivo; y se añaden un medio y el suero del sujeto al recipiente de cultivo de células de médula ósea para realizar un cultivo adicional.

40 (2) El sistema de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero de acuerdo con (1), que comprende al menos uno de los siguientes dispositivos (a), (b), (c) y (d): (a) un dispositivo de almacenamiento de suspensión de células de médula ósea que tiene la jeringa de almacenamiento de fluido de médula ósea, una jeringa de almacenamiento de medio que almacena un medio, el recipiente de transporte de suspensión de células de médula ósea que almacena la suspensión de células de médula ósea y una unidad de conexión para suspensión de células de médula ósea que es capaz de distribuir el fluido de médula ósea y el medio y capaz de conectar herméticamente el líquido de la jeringa de almacenamiento de fluido de médula ósea, la jeringa de almacenamiento de medio y el recipiente de transporte de suspensión de células de médula ósea; (b) un dispositivo de recolección y almacenamiento de sangre que tiene una aguja de punción vascular que se inserta en el vaso sanguíneo del sujeto, un recipiente para almacenamiento de sangre hermético a líquidos que almacena la sangre del sujeto y es capaz de ser centrifugado, y una unidad de conexión para la recolección de sangre que es capaz de distribuir sangre y capaz de conectar herméticamente al líquido la aguja de punción vascular y el recipiente para almacenamiento de sangre; (c) un dispositivo de adquisición de autosuero que tiene una unidad de centrifugación que centrifuga el recipiente para almacenamiento de sangre donde se almacena la sangre del sujeto para obtener el suero del sujeto; y (d) un dispositivo de cultivo de células de médula ósea que tiene el recipiente de cultivo de células de médula ósea.

55 (3) El sistema de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero de acuerdo con (1), que comprende los siguientes dispositivos (a), (b), (c) y (d): (a) un dispositivo de almacenamiento de suspensión de células de médula ósea que tiene la jeringa de almacenamiento de fluido de médula ósea, una jeringa de almacenamiento de medio que almacena un medio, el recipiente de transporte de la suspensión de células de médula ósea que almacena la suspensión de células de médula ósea y una unidad de conexión para suspensión de células de médula ósea que es capaz de distribuir el fluido de médula ósea y el medio y capaz de conectar herméticamente

el líquido de la jeringa de almacenamiento de fluido de médula ósea, la jeringa de almacenamiento de medio y el recipiente de transporte de la suspensión de células de médula ósea; (b) un dispositivo de recolección y almacenamiento de sangre que tiene una aguja de punción vascular que se inserta en el vaso sanguíneo del sujeto, un recipiente para almacenamiento de sangre hermético a líquidos que almacena la sangre del sujeto y es capaz de ser centrifugado, y una unidad de conexión para la recolección de sangre que es capaz de distribuir sangre y capaz de conectar herméticamente al líquido la aguja de punción vascular y el recipiente para almacenamiento de sangre; (c) un dispositivo de adquisición de autosuero que tiene una unidad de centrifugación que centrifuga el recipiente para almacenamiento de sangre donde se almacena la sangre del sujeto para obtener el suero del sujeto; y (d) un dispositivo de cultivo de células de médula ósea que tiene el recipiente de cultivo de células de médula ósea.

(4) El sistema de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero de acuerdo con (2) o (3), en el que el recipiente de transporte de suspensión de células de médula ósea tiene los siguientes componentes (e) y (f) y la unidad de conexión para suspensión de células de médula ósea tiene el siguiente componente (g): (e) un tubo de recipiente de transporte que comunica la unidad de conexión para suspensión de células de médula ósea con el espacio interior del recipiente de transporte de suspensión de células de médula ósea; (f) un respiradero del recipiente de transporte que comunica el espacio interior de la suspensión de células de médula ósea que transporta el recipiente con el espacio exterior y está provisto en su punta de un filtro de respiradero del recipiente de transporte que evita que entren bacterias en el respiradero; y (g) una llave de tres vías para suspensión de células de médula ósea que tiene tres puertos de conexión, es decir, un primer puerto para suspensión, un segundo puerto para suspensión y un tercer puerto para suspensión, y un grifo para suspensión que comunica selectivamente dos de estos puertos de conexión.

(5) El sistema de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero de acuerdo con cualquiera de (2) a (4), en el que el recipiente para almacenamiento de sangre tiene los siguientes componentes (h) e (i): (h) un tubo de recipiente para almacenamiento que comunica la unidad de conexión para la recolección de sangre con el espacio interior del recipiente para almacenamiento de sangre; e (i) un respiradero del recipiente para almacenamiento que comunica el espacio interior del recipiente para almacenamiento de sangre con el espacio exterior y está provisto en su punta de un filtro de respiradero del recipiente para almacenamiento que evita que entren bacterias en el respiradero.

(6) El sistema de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero de acuerdo con cualquiera de (2) a (4), en el que el dispositivo de recolección y almacenamiento de sangre es un dispositivo de recolección y almacenamiento de sangre que tiene: una aguja permanente que es una aguja de recolección de sangre capaz de mantener un estado insertado en el vaso sanguíneo del sujeto; un tubo de conexión de aguja permanente conectado con la aguja permanente; un recipiente para almacenamiento de sangre hermético a líquidos que almacena la sangre del sujeto y es capaz de ser centrifugado y tiene los siguientes componentes (j) y (k); una jeringa para recolección de sangre que es capaz de recolectar y almacenar sangre del sujeto en un estado hermético y capaz de expulsar la sangre; y una unidad de conexión de tres vías para la recolección de sangre que es capaz de distribuir sangre y capaz de conectar herméticamente al líquido el tubo de conexión de la aguja permanente conectado con la aguja permanente, la jeringa para la recolección de sangre y el recipiente para almacenamiento de sangre, y tiene lo siguiente componente (1): (j) un tubo de recipiente para almacenamiento que comunica la unidad de conexión de tres vías para la recolección de sangre con el espacio interior del recipiente para almacenamiento de sangre; (k) un respiradero del recipiente para almacenamiento que comunica el espacio interior del recipiente para almacenamiento de sangre con el espacio exterior y está provisto en su punta de un filtro de respiradero del recipiente para almacenamiento que evita que entren bacterias en el respiradero; y (1) una llave de tres vías para recolección de sangre que tiene tres puertos de conexión, es decir, un primer puerto para recolección de sangre, un segundo puerto para recolección de sangre y un tercer puerto para recolección de sangre, y un grifo para recolección de sangre que comunica selectivamente dos de estos puertos de conexión.

(7) El sistema de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero de acuerdo con cualquiera de (1) a (6), en el que el cultivo se inicia mediante la adición de un medio y/o el suero del sujeto cuando la suspensión de células de médula ósea es transferida al recipiente de cultivo de células de médula ósea.

(8) Un sistema de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero para cultivar células de médula ósea recolectadas de un sujeto sin el uso de un anticoagulante con el suero del sujeto, en el que: un fluido de médula ósea que contiene células de médula ósea recolectadas del sujeto se transfiere al sitio de recolección de una jeringa de almacenamiento de fluido de médula ósea donde el fluido de médula ósea se almacena en un recipiente de cultivo y transporte de células de médula ósea, que es un recipiente rígido herméticamente sellado que almacena una suspensión anticoagulada de células de médula ósea obtenida mezclando el fluido médula ósea con un medio y comienza el cultivo de las células de médula ósea, y luego se mezcla con el medio para realizar la anticoagulación mientras se inicia el cultivo de las células de médula ósea; la suspensión de células de médula ósea resultante se transporta en un estado cultivado mientras se almacena en el recipiente de cultivo y transporte de células de médula ósea; después de un lapso de un período de cultivo predeterminado, se elimina el sobrenadante de cultivo; y en la ubicación del cultivo de células, se añaden un medio y el suero del sujeto al recipiente de cultivo y transporte de células de médula ósea para realizar un cultivo adicional.

(9) El sistema de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero según (8), que comprende al menos uno de los siguientes dispositivos (i), (ii) y (iii): (i) un dispositivo de cultivo de células de médula ósea que tiene el jeringa de almacenamiento de fluido de médula ósea, una jeringa de almacenamiento de medio que almacena un medio, el recipiente de cultivo y transporte de células de médula ósea y una unidad de conexión para suspensión de células de médula ósea que es capaz de distribuir el fluido de médula ósea y el medio y capaz de conectar herméticamente al líquido la jeringa de almacenamiento de fluido de médula ósea, la jeringa de almacenamiento de medio y el recipiente de cultivo y transporte de células de médula ósea; (ii) un dispositivo de recolección y almacenamiento de sangre que tiene una aguja de punción vascular que se inserta en el vaso sanguíneo del sujeto, un recipiente para almacenamiento de sangre hermético a líquidos que almacena la sangre del sujeto y es capaz de ser centrifugado, y una unidad de conexión para la recolección de sangre que es capaz de distribuir sangre y capaz de conectar herméticamente al líquido la aguja de punción vascular y el recipiente para almacenamiento de sangre; y (iii) un dispositivo de adquisición de autosuero que tiene una unidad de centrifugación que centrifuga el recipiente para almacenamiento de sangre donde se almacena la sangre del sujeto para obtener el suero del sujeto.

(10) El sistema de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero de acuerdo con (8), que comprende los siguientes dispositivos (i), (ii) y (iii): (i) un dispositivo de cultivo de células de médula ósea que tiene la jeringa de almacenamiento de fluido de médula ósea, una jeringa de almacenamiento de medio que almacena un medio, el recipiente de cultivo y transporte de células de médula ósea, y una unidad de conexión para suspensión de células de médula ósea que es capaz de distribuir el fluido de médula ósea y el medio y capaz de conectar herméticamente la jeringa de almacenamiento de fluido de médula ósea, la jeringa de almacenamiento de medio y el recipiente de cultivo y transporte de células de médula ósea; (ii) un dispositivo de recolección y almacenamiento de sangre que tiene una aguja de punción vascular que se inserta en el vaso sanguíneo del sujeto, un recipiente para almacenamiento de sangre hermético a líquidos que almacena la sangre del sujeto y es capaz de ser centrifugado, y una unidad de conexión para la recolección de sangre que es capaz de distribuir sangre y capaz de conectar herméticamente al líquido la aguja de punción vascular y el recipiente para almacenamiento de sangre; y (iii) un dispositivo de adquisición de autosuero que tiene una unidad de centrifugación que centrifuga el recipiente para almacenamiento de sangre donde se almacena la sangre del sujeto para obtener el suero del sujeto.

(11) El sistema de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero de acuerdo con (9) o (10), en el que el recipiente de cultivo y transporte de células de médula ósea tiene los siguientes componentes (iv) y (v) y la unidad de conexión para suspensión de células de médula ósea tiene el siguiente componente (vi): (iv) un tubo de recipiente de cultivo y transporte que comunica la unidad de conexión para suspensión de células de médula ósea con el espacio interior del recipiente de cultivo y transporte de células de médula ósea; (v) un respiradero del recipiente de cultivo y transporte que comunica el espacio interior del recipiente de cultivo y transporte de células de médula ósea con el espacio exterior y está provisto en su punta de un filtro de respiradero de cultivo y transporte que evita que entren bacterias en el respiradero; y (vi) una llave de tres vías para suspensión de células de médula ósea que tiene tres puertos de conexión, es decir, un primer puerto para suspensión, un segundo puerto para suspensión y un tercer puerto para suspensión, y un grifo para suspensión que comunica selectivamente dos de estos puertos de conexión.

(12) El sistema de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero de acuerdo con cualquiera de (9) a (11), en el que el recipiente para almacenamiento de sangre tiene los siguientes componentes (vii) y (viii): (vii) un tubo de recipiente para almacenamiento que comunica la unidad de conexión para la recolección de sangre con el espacio interior del recipiente para almacenamiento de sangre; y (viii) un respiradero del recipiente para almacenamiento que comunica el espacio interior del recipiente para almacenamiento de sangre con el espacio exterior y está provisto en su punta con un filtro de respiradero del recipiente para almacenamiento que evita que entren bacterias en el respiradero.

(13) El sistema de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero de acuerdo con cualquiera de (9) a (11), en el que el dispositivo de recolección y almacenamiento de sangre es un dispositivo de recolección y almacenamiento de sangre que tiene: una aguja permanente que es una aguja de recolección de sangre capaz de mantener un estado insertado en el vaso sanguíneo del sujeto; un tubo de conexión de aguja permanente conectado con la aguja permanente; un recipiente para almacenamiento de sangre hermético a líquidos que almacena la sangre del sujeto y es capaz de ser centrifugado y tiene los siguientes componentes (ix) y (x); una jeringa para recolección de sangre que es capaz de recolectar y almacenar sangre del sujeto en un estado hermético y capaz de expulsar la sangre; y una unidad de conexión de tres vías para la recolección de sangre que es capaz de distribuir sangre y capaz de conectar herméticamente a líquidos el tubo de conexión de la aguja permanente conectado con la aguja permanente, la jeringa para la recolección de sangre y el recipiente para almacenamiento de sangre y tiene el siguiente componente (xi): (ix) un tubo de recipiente para almacenamiento que comunica la unidad de conexión de tres vías para la recolección de sangre con el espacio interior del recipiente para almacenamiento de sangre; (x) un respiradero del recipiente para almacenamiento que comunica el espacio interior del recipiente para almacenamiento de sangre con el espacio exterior y está provisto en su punta con un filtro de respiradero del recipiente para almacenamiento que evita que entren bacterias en el respiradero; y (xi) una llave de tres vías para recolección de sangre que tiene tres puertos de conexión, es decir, un primer puerto para recolección de sangre, un segundo puerto para recolección de sangre y un tercer puerto para recolección de sangre, y un grifo para recolección de sangre que comunica selectivamente dos de estos puertos de conexión.

(14) Una realización de la presente invención se refiere a un procedimiento para cultivar células de médula ósea recolectadas de un sujeto sin el uso de un anticoagulante con el suero del sujeto, que comprende: una etapa de preparación de suspensión de células de médula ósea en el que un fluido de médula ósea que contiene las células de médula ósea recolectadas del sujeto se anticoagula mezclando con un medio en una cantidad apropiada para la cantidad de fluido de médula ósea en un estado hermético en el sitio de recolección del fluido de médula ósea para preparar una suspensión de células de médula ósea libre de anticoagulantes; una etapa de recolección y almacenamiento de sangre en el que se recolecta sangre del sujeto sin la adición de un anticoagulante y se almacena en un estado hermético a líquidos en un recipiente para almacenamiento de sangre capaz de ser centrifugado; una etapa de adquisición de autosuero en el que el recipiente para almacenamiento de sangre donde se almacena la sangre del sujeto se centrifuga para obtener el suero del sujeto; una etapa de cultivo de células de médula ósea en el que las células de médula ósea contenidas en la suspensión de células de médula ósea preparada se cultivan en un recipiente de cultivo de células de médula ósea; una etapa de eliminación del sobrenadante de cultivo en el que el sobrenadante de cultivo que contiene células flotantes se retira del recipiente de cultivo de células de médula ósea con las células de médula ósea así cultivadas unidas al mismo; y una etapa de adición de medio de autosuero en el que el suero obtenido del sujeto y un medio se agregan al recipiente de cultivo de células de médula ósea con las células de médula ósea unidas al mismo.

(15) Una realización adicional de la invención se refiere a un procedimiento para cultivar células de médula ósea recolectadas de un sujeto sin el uso de un anticoagulante con el suero del sujeto, que comprende: una etapa de preparación de suspensión de células de médula ósea en el que un fluido de médula ósea que contiene las células de médula ósea recolectadas del sujeto se anticoagula mezclándose con un medio en una cantidad apropiada para la cantidad del fluido de médula ósea en un estado hermético en el sitio de recolección del fluido de médula ósea para preparar una suspensión de células de médula ósea libre de anticoagulantes; una etapa de recolección y almacenamiento de sangre en el que se recolecta sangre del sujeto sin la adición de un anticoagulante y se almacena en un estado hermético a líquidos en un recipiente para almacenamiento de sangre capaz de ser centrifugado; una etapa de adquisición de autosuero en el que el recipiente para almacenamiento de sangre donde se almacena la sangre del sujeto se centrifuga para obtener el suero del sujeto; una etapa de preparación de la mezcla de suspensión de células de médula ósea en el que la suspensión de células de médula ósea preparada se mezcla con un medio y/o el suero obtenido del sujeto para preparar una mezcla de suspensión de células de médula ósea; una etapa de cultivo de células de médula ósea en el que las células de médula ósea contenidas en la mezcla de suspensión de células de médula ósea preparada se cultivan en un recipiente de cultivo de células de médula ósea; una etapa de eliminación del sobrenadante de cultivo en el que el sobrenadante de cultivo que contiene células flotantes se retira del recipiente de cultivo de células de médula ósea con las células de médula ósea así cultivadas unidas al mismo; y una etapa de adición de medio de autosuero en el que el suero obtenido del sujeto y un medio se agregan al recipiente de cultivo de células de médula ósea con las células de médula ósea unidas al mismo.

(16) El procedimiento de acuerdo con (15), en el que la cantidad total de los medios mezclados con el fluido de médula ósea en la mezcla de suspensión de células de médula ósea o la suma total de la cantidad del medio o los medios mezclados con el fluido de médula ósea y la cantidad del suero obtenido del sujeto mezclado con el fluido de médula ósea en la mezcla de suspensión de células de médula ósea es de 4 a 80 veces la cantidad del fluido de médula ósea.

(17) El procedimiento de acuerdo con cualquiera de (14) a (16), en el que la cantidad apropiada para la cantidad de fluido de médula ósea es de 1,5 veces a 6 veces la cantidad de fluido de médula ósea.

(18) El procedimiento de acuerdo con cualquiera de (14) a (17), en el que las células de médula ósea contenidas en la suspensión de células de médula ósea o la mezcla de suspensión de células de médula ósea se cultivan durante 4 días a 7 días en el recipiente de cultivo de células de médula ósea.

(19) Una realización adicional de acuerdo con la invención se refiere a un procedimiento para cultivar directamente células de médula ósea recolectadas de un sujeto sin el uso de un anticoagulante y cultivar adicionalmente las células resultantes con el suero del sujeto, que comprende: una etapa de preparación de la suspensión de células de médula ósea en el que un fluido de médula ósea que contiene células de médula ósea recolectadas del sujeto se anticoagula mezclando con un medio en una cantidad apropiada para la cantidad de fluido de médula ósea en un recipiente de cultivo y transporte de células de médula ósea con un estado hermético a líquidos en el sitio de recolección del fluido de médula ósea para preparar una suspensión de células de médula ósea libre de anticoagulantes; una etapa de cultivo y transporte de células de médula ósea en el que las células de médula ósea contenidas en la suspensión de células de médula ósea preparada se transportan a la ubicación del cultivo de células mientras se cultivan en el recipiente de cultivo y transporte de células de médula ósea; una etapa de recolección y almacenamiento de sangre en el que se recolecta sangre del sujeto sin la adición de un anticoagulante y se almacena en un estado hermético a líquidos en un recipiente para almacenamiento de sangre capaz de ser centrifugado; una etapa de adquisición de autosuero en el que el recipiente para almacenamiento de sangre donde se almacena la sangre del sujeto se centrifuga para obtener el suero del sujeto; una etapa de eliminación del sobrenadante de cultivo en el que el sobrenadante de cultivo que contiene células flotantes se retira del recipiente de cultivo y transporte de células de médula ósea con las células de médula ósea así cultivadas

unidas al mismo; y una etapa de adición de medio de autosuero en el que el suero del sujeto y un medio se añaden al recipiente de cultivo y transporte de células de médula ósea con las células de médula ósea unidas al mismo.

(20) El procedimiento de acuerdo con (19), en el que el recipiente de cultivo y transporte de células de médula ósea es un matraz para cultivo de células.

5 (21) El procedimiento de acuerdo con (19) o (20), en el que la cantidad apropiada para la cantidad de fluido de médula ósea es de 2 a 4 veces la cantidad de fluido de médula ósea.

(22) El procedimiento de acuerdo con cualquiera de (19) a (21), en el que las células de médula ósea contenidas en la suspensión de células de médula ósea preparada se cultivan durante 4 días a 7 días en el recipiente de cultivo y transporte de células de médula ósea.

10 (23) El procedimiento de acuerdo con cualquiera de (14) a (22), en el que el recipiente para almacenamiento de sangre es un recipiente rígido.

(24) Una realización adicional de la invención se refiere a un procedimiento para producir una composición medicinal que comprende, como ingrediente activo, células de médula ósea que se han recolectado de un sujeto sin el uso de un anticoagulante y se han cultivado con el suero del sujeto, que comprende : una etapa de  
15 preparación de la suspensión de células de médula ósea en el que un fluido de médula ósea que contiene células de médula ósea recolectadas del sujeto se anticoagula mezclando con un medio en una cantidad apropiada para la cantidad de fluido de médula ósea en un estado hermético en el sitio de recolección del fluido de médula ósea para preparar una suspensión de células de médula ósea libre de anticoagulantes; una etapa de recolección y almacenamiento de sangre en el que se recolecta sangre del sujeto sin la adición de un anticoagulante y se  
20 almacena en un estado hermético a líquidos en un recipiente para almacenamiento de sangre capaz de ser centrifugado; una etapa de adquisición de autosuero en el que el recipiente para almacenamiento de sangre donde se almacena la sangre del sujeto se centrifuga para obtener el suero del sujeto; una etapa de cultivo de células de médula ósea en el que las células de médula ósea contenidas en la suspensión de células de médula ósea preparada se cultivan en un recipiente de cultivo de células de médula ósea; una etapa de eliminación del sobrenadante de cultivo en el que el sobrenadante de cultivo que contiene células flotantes se retira del recipiente de cultivo de células de médula ósea con las células de médula ósea así cultivadas unidas al mismo; y una etapa de cultivo y adición de medio de autosuero en el que el suero obtenido del sujeto y un medio se agregan al  
25 recipiente de cultivo de células de médula ósea con las células de médula ósea unidas al mismo para cultivar las células.

(25) Una realización adicional de la invención se refiere a un procedimiento para producir una composición medicinal que comprende, como ingrediente activo, células de médula ósea que se han recolectado de un sujeto sin el uso de un anticoagulante y se han cultivado con el suero del sujeto, que comprende : una etapa de  
35 preparación de la suspensión de células de médula ósea en el que un fluido de médula ósea que contiene células de médula ósea recolectadas del sujeto se anticoagula mezclando con un medio en una cantidad apropiada para la cantidad de fluido de médula ósea en un estado hermético en el sitio de recolección del fluido de médula ósea para preparar una suspensión de células de médula ósea libre de anticoagulantes; una etapa de recolección y almacenamiento de sangre en el que se recolecta sangre del sujeto sin la adición de un anticoagulante y se almacena en un estado hermético a líquidos en un recipiente para almacenamiento de sangre capaz de ser  
40 centrifugado; una etapa de adquisición de autosuero en el que el recipiente para almacenamiento de sangre donde se almacena la sangre del sujeto se centrifuga para obtener el suero del sujeto; una etapa de preparación de la mezcla de suspensión de células de médula ósea en el que la suspensión de células de médula ósea preparada se mezcla con un medio y/o el suero obtenido del sujeto para preparar una mezcla de suspensión de células de médula ósea; una etapa de cultivo de células de médula ósea en el que las células de médula ósea contenidas en la mezcla de suspensión de células de médula ósea preparada se cultivan en un recipiente de cultivo de células de médula ósea; una etapa de eliminación del sobrenadante de cultivo en el que el sobrenadante de cultivo que  
45 contiene células flotantes se retira del recipiente de cultivo de células de médula ósea con las células de médula ósea así cultivadas unidas al mismo; y una etapa de cultivo y adición de medio de autosuero en el que el suero obtenido del sujeto y un medio se agregan al recipiente de cultivo de células de médula ósea con las células de médula ósea unidas al mismo para cultivar las células.

(26) Una realización adicional de la invención se refiere a un procedimiento para producir una composición medicinal que comprende, como ingrediente activo, células de médula ósea que se han recolectado de un sujeto sin el uso de un anticoagulante, luego se cultivan directamente y se cultivan más con el suero del sujeto, que comprende: una etapa de preparación de suspensión de células de médula ósea en el que un fluido de médula  
55 ósea que contiene células de médula ósea recolectadas del sujeto se anticoagula mezclando con un medio en una cantidad apropiada para la cantidad de fluido de médula ósea en un recipiente de cultivo y transporte de células de médula ósea con un estado hermético a líquidos en el sitio de recolección del fluido de médula ósea para preparar una suspensión de células de médula ósea libre de anticoagulantes; una etapa de cultivo y transporte de células de médula ósea en el que las células de médula ósea contenidas en la suspensión de células de médula ósea preparada se transportan a la ubicación del cultivo de células mientras se cultivan en el recipiente de cultivo y transporte de células de médula ósea; una etapa de recolección y almacenamiento de sangre en el que se  
60

5 recolecta sangre del sujeto sin la adición de un anticoagulante y se almacena en un estado hermético a líquidos en un recipiente para almacenamiento de sangre capaz de ser centrifugado; una etapa de adquisición de autosuero en el que el recipiente para almacenamiento de sangre donde se almacena la sangre del sujeto se centrifuga para obtener el suero del sujeto; una etapa de eliminación del sobrenadante de cultivo en el que el sobrenadante de cultivo que contiene células flotantes se retira del recipiente de cultivo y transporte de células de médula ósea con las células de médula ósea así cultivadas unidas al mismo; y una etapa de cultivo y adición de medio de autosuero en el que el suero del sujeto y un medio se añaden al recipiente de cultivo y transporte de células de médula ósea con las células de médula ósea unidas al mismo para cultivar las células.

**Efectos ventajosos de la invención**

10 Según la presente invención, las células de médula ósea se pueden recolectar y cultivar de forma limpia, segura, confiable y altamente eficiente en entornos de medicina regenerativa asociados con el tratamiento de enfermedad del nervio craneal, como infarto cerebral, lesión de la médula espinal y enfermedad desmielinizante. Además, se puede obtener una composición medicinal que comprende, como ingrediente activo, células de médula ósea cultivadas que contienen autosuero que se han recolectado y cultivado de manera limpia, segura, confiable y altamente eficiente.

**Breve descripción de los dibujos**

[Figura 1] La Figura 1 es un diagrama que muestra un primer aspecto del sistema de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero.

[Figura 2] La Figura 2 es un diagrama que muestra un dispositivo de almacenamiento de suspensión de células de médula ósea según el primer aspecto.

20 [Figura 3] La Figura 3 es un diagrama que muestra un dispositivo de recolección y almacenamiento de sangre de acuerdo con el primer y segundo aspecto.

[Figura 4] La Figura 4 es un diagrama que muestra un aspecto diferente del dispositivo de recolección y almacenamiento de sangre.

25 [Figura 5] La Figura 5 es un diagrama que muestra un segundo aspecto del sistema de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero.

[Figura 6] La Figura 6 es un diagrama que muestra un dispositivo de cultivo de células de médula ósea según el segundo aspecto.

[Figura 7] La Figura 7 es un diagrama de flujo que muestra la primera realización del procedimiento de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero de acuerdo con la presente invención.

30 [Figura 8] La Figura 8 es un diagrama de flujo que muestra un aspecto del procedimiento de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero de acuerdo con la primera realización, que además tiene la etapa S7 de preparación de la mezcla de suspensión de células de médula ósea. En el diagrama, las flechas punteadas representan que la selección es posible.

35 [Figura 9] La Figura 9 es un diagrama de flujo que muestra la segunda realización del procedimiento de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero de acuerdo con la presente invención.

[Figura 10] La Figura 10 es un diagrama de flujo que muestra la primera realización del procedimiento para producir una composición medicinal que comprende células de médula ósea cultivadas que contienen autosuero como ingrediente activo de acuerdo con la presente invención.

40 [Figura 11] La Figura 11 es un diagrama de flujo que muestra un aspecto del procedimiento para producir una composición medicinal que comprende células de médula ósea cultivadas que contienen autosuero como ingrediente activo de acuerdo con la primera realización, que además tiene la etapa S7 de preparación de la mezcla de suspensión de células de médula ósea. En el diagrama, las flechas punteadas representan que la selección es posible.

45 [Figura 12] La Figura 12 es un diagrama de flujo que muestra la segunda realización del procedimiento para producir una composición medicinal que comprende células de médula ósea cultivadas que contienen autosuero como ingrediente activo de acuerdo con la presente invención.

**Descripción**

50 En lo que sigue, se describirá en detalle el procedimiento de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero, y el procedimiento para producir una composición medicinal que comprende células de médula ósea cultivadas que contienen autosuero como ingrediente activo de acuerdo con la presente invención. En el primer aspecto, un sistema 1 de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero es un sistema de cultivo de médula ósea que contiene autosuero para cultivar células de médula ósea recolectadas de un sujeto sin el uso de un anticoagulante con el suero



del sujeto, en el que: un fluido de médula ósea que contiene células de médula ósea recolectadas del sujeto se transfiere al sitio de recolección de una jeringa 21 de almacenamiento de fluido de médula ósea donde el fluido de médula ósea se almacena en un recipiente 23 de transporte de suspensión de células de médula ósea que es un recipiente rígido sellable herméticamente, y luego anticoagulado mezclándolo con un medio; la suspensión de células de médula ósea anticoagulada obtenida de este modo mediante la mezcla del fluido de médula ósea con el medio se transporta en estado suspendido mientras se almacena en el recipiente 23 de transporte de suspensión de células de médula ósea, y luego se transfiere a un recipiente 51 de cultivo de células de médula ósea que cultiva las células de médula ósea en la ubicación del cultivo de células, para comenzar el cultivo; después de un lapso de un período de cultivo predeterminado, se elimina el sobrenadante de cultivo; y se añaden un medio y el suero del sujeto al recipiente 51 de cultivo de células de médula ósea para realizar un cultivo adicional.

En un primer aspecto, el sistema 1 de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero comprende preferiblemente al menos uno de un dispositivo 2 de almacenamiento de suspensión de células de médula ósea, un dispositivo 3 de recolección y almacenamiento de sangre, un dispositivo 4 de adquisición de autosuero y un dispositivo 5 de cultivo de células de médula ósea y más preferiblemente comprende todos estos dispositivos.

El dispositivo 2 de almacenamiento de suspensión de células de médula ósea está constituido principalmente por una jeringa 21 de almacenamiento de fluido de médula ósea, una jeringa 22 de almacenamiento de medio, un recipiente 23 de transporte de suspensión de células de médula ósea y una unidad 24 de conexión para suspensión de células de médula ósea.

La jeringa 21 de almacenamiento de fluido de médula ósea no está particularmente limitada siempre que la jeringa sea capaz de recolectar, almacenar un fluido de médula ósea que contenga células de médula ósea del sujeto y expulsar el fluido de médula ósea en un estado hermético. Ejemplos de la misma pueden incluir las que se usan habitualmente en el campo médico.

La jeringa 22 de almacenamiento de medio no está particularmente limitada siempre que la jeringa sea capaz de almacenar un medio y expulsar el medio en un estado hermético. Ejemplos de la misma pueden incluir las que se usan habitualmente en el campo médico. En el primer aspecto presente, se puede usar una jeringa similar a la jeringa 21 de almacenamiento de fluido de médula ósea.

En la presente invención, el medio puede seleccionarse apropiadamente de acuerdo con el tipo, dirección o nivel de diferenciación deseados, tasa de crecimiento requerida, etc., de las células de médula ósea. Ejemplos de medios adecuados para el crecimiento de células madre mesenquimales como las células del estroma de la médula ósea para su uso en la reparación del sistema nervioso pueden incluir, entre otros, un medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que se muestra a continuación, así como un progenitor basal neural medio (NPBM; Clontech Laboratories, Inc.) y un medio  $\alpha$ -MEM.

#### Composición de DMEM: <concentración (mg/L)>

CaCl<sub>2</sub> (anhídrido) <160 a 240>, KCL <320 a 480>, Fe (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O <0,08 a 1,2>, MgSO<sub>4</sub> (anhídrido) <80 a 120>, NaCl <5120 a 7680>, NaHCO<sub>3</sub> <2960 a 4440>, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O <100 a 150>, D-glucosa <3600 a 5400>, rojo fenol <12 a 18>, piruvato de sodio <88 a 132>, L-arginina·HCl <67 a 101 >, L-cisteína·2HCl <50 a 76>, L-histidina·HCl·H<sub>2</sub>O <34 a 50>, L-isoleucina <84 a 126>, L-leucina <84 a 126>, L-lisina-HCl <117 a 175>, L-metionina <24 a 36>, L-fenilalanina <53 a 79>, L-serina <34 a 50>, L-treonina <76 a 114>, L-triptófano <13 a 19>, L-tirosina (sal disódica) <83 a 125>, L-valina <75 a 113>, cloruro de colina <3,2 a 4,8>, ácido D-Ca-pantoténico <3,2 a 4,8>, ácido fólico <3,2 a 4,8>, i-inositol <5,8 a 8,6>, niacinamida <3,2 a 4,8>, piridoxal-HCl <3,2 a 4,8>, riboflavina <0,3 a 0,5> y tiamina-HCl <3,2 a 4,8>.

En la presente invención, el medio puede complementarse adicionalmente con suero, un factor nutricional, un factor proliferativo, un factor de crecimiento, un factor inductor de diferenciación, un antibiótico, un aminoácido y similares, si es necesario. Las concentraciones de estas sustancias añadidas al medio pueden establecerse adecuadamente de acuerdo con la dirección deseada o el nivel de diferenciación, la tasa de crecimiento requerida, etc., de las células de médula ósea.

Ejemplos específicos del factor nutricional, el factor proliferativo, el factor de crecimiento y el factor inductor de diferenciación pueden incluir: vitaminas tales como ácido ascórbico y nicotinamida; factores neurotróficos tales como NGF y BDNF; factores morfogenéticos óseos tales como BMP; factores de crecimiento de células epiteliales; factores básicos de crecimiento de fibroblastos; factores de crecimiento similares a la insulina y citoquinas como la IL-2.

Ejemplos del antibiótico pueden incluir penicilina y estreptomina. Estos antibióticos se pueden agregar solos o en combinación al medio. La concentración del antibiótico agregado al mismo puede ser, por ejemplo, 0,5 a 2% (v/v), preferiblemente 0,8 a 1,2% (v/v), de cada antibiótico con respecto a la cantidad total del medio cuando penicilina y estreptomina se agregan en combinación.

Ejemplos del aminoácido pueden incluir L-alanina, L-ácido aspártico, L-cisteína, L-glutamina, L-isoleucina, L-metionina, L-fenilalanina, L-prolina, L-serina, L-treonina, L-tirosina, L-valina, ácido L-ascórbico y ácido L-glutámico. La concentración del aminoácido agregado al medio puede ser, por ejemplo, 0,1 a 2% (p/v) de L-glutamina con respecto a la cantidad total del medio para el rápido crecimiento de las células madre mesenquimales.

El recipiente 23 de transporte de la suspensión de células de médula ósea no está particularmente limitado siempre que el recipiente sea un recipiente rígido hermético a líquidos capaz de almacenar una suspensión de células de médula ósea anticoagulada obtenida mezclando el fluido de médula ósea con el medio. Ejemplos de dicha constitución pueden incluir una constitución en la que, como se muestra en la Figura 2, el recipiente 23 de transporte de suspensión de células de médula ósea tiene un extremo superior abierto al que se fija una tapa 25 de recipiente de transporte de manera hermética a los líquidos con tornillos, la tapa 25 de recipiente de transporte que comprende un tubo 26 del recipiente de transporte y un respiradero 27 del recipiente de transporte. El tubo 26 del recipiente de transporte comunica la unidad 24 de conexión para suspensión de células de médula ósea con el espacio interior del recipiente 23 de transporte de la suspensión de células de médula ósea. El respiradero 27 del recipiente de transporte comunica el espacio interior del recipiente 23 de transporte de la suspensión de células de médula ósea con el espacio exterior. El respiradero 27 del recipiente de transporte está provisto en su punta con un filtro 28 de respiradero del recipiente de transporte que evita que entren bacterias en el respiradero.

En la presente invención, los términos "medio" y "solución de cultivo" se pueden usar indistintamente. Del mismo modo, los términos "anticoagulación" y "tratamiento de anticoagulación" o los términos "terminación de la coagulación" e "inhibición de la coagulación" pueden usarse indistintamente.

Ejemplos de materiales que constituyen el recipiente rígido pueden incluir metales y vidrio, así como resinas algo flexibles tales como polipropileno, cloruro de polivinilo y poliestireno. Además, ejemplos de materiales que constituyen el tubo 26 del recipiente de transporte pueden incluir aquellos sellables en un estado hermético a líquidos sellando con un sellador por calor, clip o similares comercialmente disponibles. Además, ejemplos del filtro 28 de respiradero del recipiente de transporte pueden incluir un filtro de tipo de profundidad capaz de capturar bacterias dentro del filtro, y un filtro de tipo pantalla capaz de capturar bacterias en la superficie del filtro.

La unidad 24 de conexión para suspensión de células de médula ósea no está limitada siempre que la unidad sea constitutiva o funcionalmente capaz de distribuir el fluido de médula ósea y el medio y capaz de conectar herméticamente el líquido de la jeringa 21 de almacenamiento de fluido de médula ósea, la jeringa 22 de almacenamiento de medio, y el recipiente 23 de transporte de suspensión de células de médula ósea. Ejemplos de dicha constitución pueden incluir una constitución que tiene, como se muestra en la Figura 2, una llave 6 de paso de tres vías para suspensión de células de médula ósea. La llave 6 de paso de tres vías para suspensión de células de médula ósea tiene tres puertos de conexión, es decir, un primer puerto 61 para suspensión, un segundo puerto 62 para suspensión y un tercer puerto 63 para suspensión, y un grifo 64 para suspensión que comunica selectivamente dos de estos puertos de conexión. El grifo 64 para suspensión puede girarse para cambiar su postura al menos a una postura mediante la cual el primer puerto 61 para suspensión y el segundo puerto 62 para suspensión se comunican entre sí y una postura mediante la cual el segundo puerto 62 para suspensión y el tercer puerto 63 para suspensión se comunican entre sí. Por ejemplo, una llave de tres vías médica en forma de T general, así como la llave de paso descrita en la Patente japonesa abierta a inspección pública No. 2009-077879 o 2009-183583, se pueden usar como la llave 6 de paso de tres vías para suspensión de células de médula ósea.

En un primer aspecto, la unidad 24 de conexión para suspensión de células de médula ósea se ejemplifica mediante la llave 6 de paso de tres vías para suspensión de células de médula ósea, pero no se limita a esto. Se puede adoptar otra constitución en la que la jeringa 21 de almacenamiento de fluido de médula ósea y la una jeringa 22 de almacenamiento de medio se insertan selectivamente en el tubo 26 del recipiente de transporte y se comunican de este modo con el mismo.

El dispositivo 3 de recolección y almacenamiento de sangre está constituido principalmente por una aguja 31 de punción vascular, un recipiente 32 para almacenamiento de sangre y una unidad 33 de conexión para la recolección de sangre.

La aguja 31 de punción vascular no está limitada siempre que la aguja pueda insertarse en el vaso sanguíneo del sujeto para permitir que la sangre fluya dentro de ella y pueda usarse habitualmente en el campo médico.

El recipiente 32 para almacenamiento de sangre no está particularmente limitado siempre que el recipiente sea un recipiente sellable hermético a líquidos que almacene la sangre del sujeto y sea capaz de ser centrifugado y pueda usarse habitualmente en el campo médico. Ejemplos de dicha constitución pueden incluir una constitución en la cual, como se muestra en la Figura 3, el recipiente 32 para almacenamiento de sangre permite la inyección de sangre desde la aguja 31 de punción vascular a través de la unidad 33 de conexión para la recolección de sangre y puede sellarse en un estado hermético y centrifugado, y el recipiente 32 para almacenamiento de sangre tiene un extremo superior abierto al que se fija una tapa 7 de recipiente para almacenamiento de manera hermética a los líquidos con tornillos, comprendiendo la tapa 7 de recipiente para almacenamiento un tubo 71 de recipiente para almacenamiento y un respiradero 72 de recipiente para almacenamiento. El tubo 71 de recipiente para almacenamiento comunica la unidad 33 de conexión para la recolección de sangre con el espacio interior del recipiente 32 para almacenamiento de sangre. El respiradero 72 del recipiente para almacenamiento comunica el espacio interior del recipiente 32 para almacenamiento de sangre con el espacio exterior. El respiradero 72 del recipiente para almacenamiento está provisto en su punta con un filtro 73 de respiradero del recipiente para almacenamiento que evita que entren bacterias en el respiradero.

La unidad 33 de conexión para la recolección de sangre no está limitada siempre que la unidad sea capaz constitutiva o funcionalmente de distribuir sangre y capaz de conectar herméticamente a líquidos la aguja 31 de punción vascular y el recipiente 32 para almacenamiento de sangre.

- 5 Como alternativa, el dispositivo 3 de recolección y almacenamiento de sangre está constituido principalmente por, como se muestra en la Figura 4, una aguja 34 permanente, un tubo 35 de conexión de aguja permanente conectado con la aguja 34 permanente, un recipiente 32 para almacenamiento de sangre, una jeringa 36 para recolección de sangre, y una unidad 37 de conexión de tres vías para recolección de sangre. En esta constitución del dispositivo 3 de recolección y almacenamiento de sangre, se utilizarán los mismos números de referencia para designar los mismos componentes o similares a los de la constitución descrita anteriormente, de modo que se omitirá la descripción.
- 10 La aguja 34 permanente es una aguja de recolección de sangre capaz de mantener un estado insertado en el vaso sanguíneo del sujeto. La aguja 34 permanente no está particularmente limitada siempre que la aguja pueda usarse habitualmente en el campo médico. La aguja 34 permanente es preferiblemente una aguja de mariposa porque la aguja de mariposa se puede anclar fácilmente a una extremidad o similar del sujeto. Ejemplos de la aguja de mariposa incluyen los descritos en la Publicación Internacional No. WO2006/123645.
- 15 El tubo 35 de conexión de la aguja permanente está conectado en un extremo con la aguja 34 permanente y conectado en el otro extremo con la unidad 37 de conexión de tres vías para la recolección de sangre. La sangre se distribuye a la unidad 37 de conexión de tres vías para la recolección de sangre desde la aguja 34 permanente a través del tubo 35 de conexión de la aguja permanente. El tubo 35 de conexión de la aguja permanente no está particularmente limitado siempre que el tubo sea un tubo médico.
- 20 La jeringa 36 para la recolección de sangre no está particularmente limitada siempre que la jeringa sea capaz de recolectar, almacenar sangre del sujeto y expulsar la sangre en un estado hermético. Ejemplos de la misma pueden incluir los que se usan habitualmente en el campo médico.

- 25 La unidad 37 de conexión de tres vías para la recolección de sangre no está limitada siempre que la unidad sea constitutiva o funcionalmente capaz de distribuir sangre y capaz de conectar herméticamente al líquido el tubo 35 de conexión de la aguja permanente conectado con la aguja 34 permanente, la jeringa 36 para la recolección de sangre, y el recipiente 32 para almacenamiento de sangre. Ejemplos de dicha constitución pueden incluir una constitución que tenga, como se muestra en la Figura 4, una llave 8 de tres vías para la recolección de sangre. La llave 8 de paso de tres vías para recolección de sangre tiene tres puertos de conexión, es decir, un primer puerto 81 para recolección de sangre, un segundo puerto 82 para recolección de sangre y un tercer puerto 83 para recolección de sangre, y un grifo 84 para recolección de sangre que selectivamente comunica dos de estos puertos de conexión. El grifo 84 para la recolección de sangre se puede girar para cambiar su postura al menos a una postura mediante la cual el primer puerto 81 para la recolección de sangre y el segundo puerto 82 para la recolección de sangre se comunican entre sí, y una postura mediante la cual el segundo puerto 82 para la recolección de sangre y el tercer puerto 83 para la recolección de sangre se comunican entre sí. Por ejemplo, una llave de paso similar a la llave 6 de tres vías para suspensión de células de médula ósea se puede usar como la llave 8 de tres vías para la recolección de sangre.
- 30
- 35

En un primer aspecto, la unidad 33 de conexión para la recolección de sangre está ejemplificada por la constitución que comunica el recipiente 32 para almacenamiento de sangre con la aguja 31 de punción vascular y por la unidad 37 de conexión de tres vías para la recolección de sangre, pero no está limitada a ellos. Se puede adoptar una constitución alternativa.

- 40 El dispositivo 4 de adquisición de autosuero está constituido por una unidad 41 de centrifugación. La unidad 41 de centrifugación no está particularmente limitada siempre que la unidad sea capaz de centrifugar el recipiente 32 para almacenamiento de sangre donde se almacena la sangre del sujeto para obtener el suero del sujeto. Ejemplos de las mismas pueden incluir centrifugadoras usadas habitualmente.
- 45 El dispositivo 5 de cultivo de células de médula ósea está constituido por un recipiente 51 de cultivo de células de médula ósea. El recipiente 51 de cultivo de células de médula ósea no está particularmente limitado siempre que el recipiente cultive las células de médula ósea después de la transferencia de la suspensión de células de médula ósea. Ejemplos del mismo pueden incluir placas (por ejemplo, placas de Petri de plástico o vidrio), placas de vidrio fijadas en recipientes, placas de pozos, láminas para cultivo de células, matraces de cultivo de células y matraces giratorios. Se prefiere un recipiente rígido.
- 50 A continuación, los efectos del dispositivo 2 de almacenamiento de la suspensión de células de médula ósea, el dispositivo 3 de recolección y almacenamiento de sangre, el dispositivo 4 de adquisición de autosuero, el dispositivo 5 de cultivo de células de médula ósea y el sistema 1 de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero que comprende estos dispositivos según el primer aspecto, se describirá un procedimiento de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero, y un procedimiento para producir una composición medicinal que comprende
- 55 células de médula ósea cultivadas que contienen autosuero como ingrediente activo.

En el dispositivo 2 de almacenamiento de suspensión de células de médula ósea, un fluido de médula ósea recolectado del sujeto se mezcla herméticamente con un medio para preparar una suspensión de células de médula ósea

anticoagulada, que luego se transporta a un centro de procesamiento celular (CPC), que es la ubicación del cultivo de células. En lo que sigue, se describirá el procedimiento en detalle.

5 El fluido de médula ósea recolectado del sujeto se almacena en la jeringa 21 de almacenamiento de fluido de médula ósea. Aunque el fluido de médula ósea se recolecta del sujeto, se omitirá la descripción sobre la metodología de recolectar el fluido de médula ósea del sujeto. Como se muestra en la Figura 2, la jeringa 21 que almacena el fluido de médula ósea donde se almacena el fluido de médula ósea que contiene células de médula ósea recolectadas del sujeto se conecta, en el sitio de recolección, al primer puerto 61 para suspensión de la llave 6 de paso de tres vías para suspensión de células de médula ósea que sirve como la unidad 24 de conexión para suspensión de células de médula ósea. Luego, el grifo 64 para suspensión se gira para alcanzar el estado en el que el primer puerto 61 para suspensión y el segundo puerto 62 para suspensión se comunican entre sí. Posteriormente, el fluido de médula ósea almacenado en la jeringa 21 de almacenamiento de fluido de médula ósea se expulsa de la jeringa 21 de almacenamiento de fluido de médula ósea de modo que el fluido de médula ósea se inyecta desde el primer puerto 61 para suspensión a través del segundo puerto 62 para suspensión y el tubo 26 del recipiente de transporte al recipiente 23 de transporte de suspensión de células de médula ósea mientras se descarga aire desde el espacio interior del recipiente 23 de transporte de suspensión de células de médula ósea a través del respiradero 27 del recipiente de transporte.

20 La una jeringa 22 de almacenamiento de medio está conectada al tercer puerto 63 para suspensión antes de la conexión de la jeringa 21 de almacenamiento de fluido de médula ósea al primer puerto 61 para suspensión. Luego, el grifo 64 para suspensión se gira para cambiar el estado en el que el segundo puerto 62 para suspensión y el tercer puerto 63 para suspensión se comunican entre sí. Posteriormente, se empuja un medio almacenado en la una jeringa 22 de almacenamiento de medio, en una cantidad apropiada para la cantidad de fluido de médula ósea almacenada en la jeringa 21 de almacenamiento de fluido de médula ósea, fuera de la jeringa 22 de almacenamiento de medio para que el medio se inyecte el tercer puerto 63 para suspensión a través del segundo puerto 62 para suspensión y el tubo 26 del recipiente de transporte al recipiente 23 de transporte de suspensión de células de médula ósea mientras se descarga aire desde el espacio interior del recipiente 23 de transporte de suspensión de células de médula ósea a través del respiradero 27 del recipiente de transporte. Como resultado, en el recipiente 23 de transporte de suspensión de células de médula ósea, el fluido de médula ósea recolectado del sujeto y el medio en una cantidad apropiada para la cantidad de este fluido de médula ósea se mezclan herméticamente para preparar una suspensión de células de médula ósea anticoagulada.

30 En el aspecto descrito anteriormente, la jeringa 21 de almacenamiento de fluido de médula ósea está conectada al primer puerto 61 para suspensión después de la conexión de la jeringa de almacenamiento de medio al tercer puerto 63 para suspensión. El orden en que se conectan estos componentes no está particularmente limitado. La jeringa de almacenamiento de medio puede conectarse al tercer puerto 63 para suspensión después de la conexión de la jeringa 21 de almacenamiento de fluido de médula ósea al primer puerto 61 para suspensión, o de lo contrario, estas jeringas pueden conectarse simultáneamente. La cantidad del medio apropiado para la cantidad de fluido de médula ósea es preferiblemente de 1,5 veces a 6 veces la cantidad de fluido de médula ósea almacenada en la jeringa 21 de almacenamiento de fluido de médula ósea. A este respecto, al menos una de las jeringas 22 de almacenamiento de medio, la jeringa 21 de almacenamiento de fluido de médula ósea, y el recipiente 23 de transporte de suspensión de células de médula ósea se gradúan preferiblemente para medir visualmente el volumen del contenido.

40 Luego, el tubo 26 del recipiente transportador se sella herméticamente a líquidos con un sellador de calor o clip y luego se corta entre la porción sellada y el segundo puerto 62 para suspensión para separar el recipiente 23 de transporte de la suspensión de médula ósea de la jeringa 21 de almacenamiento de fluido de médula ósea, la jeringa 22 de almacenamiento de medio y la unidad 24 de conexión para suspensión de células de médula ósea. La suspensión de células de médula ósea almacenada en el recipiente 23 de transporte de suspensión de células de médula ósea se transporta en estado suspendido a CPC.

Mientras tanto, en el dispositivo 3 de recolección y almacenamiento de sangre, la sangre del sujeto se almacena en el recipiente 32 para almacenamiento de sangre. A continuación, el procedimiento se describirá en detalle.

50 La aguja 31 de punción vascular se inserta en el vaso sanguíneo del sujeto para recolectar sangre. La sangre recolectada se inyecta en el recipiente 32 para almacenamiento de sangre a través de la unidad 33 de conexión para la recolección de sangre y el tubo 71 del recipiente para almacenamiento mientras se descarga aire desde el espacio interior del recipiente 32 para almacenamiento de sangre a través del respiradero 72 del recipiente para almacenamiento. Como resultado, la sangre recolectada se almacena herméticamente en el recipiente 32 para almacenamiento de sangre.

55 Luego, el tubo 71 del recipiente para almacenamiento se sella herméticamente a líquidos con un sellador de calor o clip y luego se corta entre la porción sellada y la unidad 33 de conexión para la recolección de sangre para separar el recipiente 32 para almacenamiento de sangre donde está la sangre del sujeto almacenada desde la aguja 31 de punción vascular y la unidad 33 de conexión para la recolección de sangre.

Alternativamente, en el caso de adoptar el aspecto diferente del dispositivo 3 de recolección y almacenamiento de sangre, la aguja 34 permanente se encuentra dentro de un estado insertado en el vaso sanguíneo del sujeto. Esto

elimina la necesidad de insertar repetidamente la aguja de recolección de sangre al sujeto para obtener la cantidad de sangre deseada. Como se muestra en la Figura 4, el primer puerto 81 para la recolección de sangre de la llave 8 de paso de tres vías para la recolección de sangre está conectado al tubo 35 de conexión de la aguja permanente conectado con la aguja 34 permanente. Como resultado, se puede inyectar sangre desde la aguja 34 permanente a la unidad 37 de conexión de tres vías para la recolección de sangre. El grifo 84 para la recolección de sangre de la llave 8 de paso de tres vías para la recolección de sangre se gira para alcanzar el estado en el que el primer puerto 81 para la recolección de sangre y el segundo puerto 82 para la recolección de sangre se comunican entre sí. En este estado, se tira de un émbolo 38 para la recolección de sangre de la jeringa 36 para la recolección de sangre para recolectar sangre del sujeto. Esta recolección de sangre continúa mediante la operación activa de continuar tirando del émbolo 38 para la recolección de sangre por parte del operador.

Una vez que el interior de la jeringa 36 para la recolección de sangre se llena con la sangre del sujeto, se suspende la operación con el émbolo 38 para la recolección de sangre. Luego, el grifo 84 para la recolección de sangre de la llave 8 de paso de tres vías para la recolección de sangre se gira para cambiar el estado en el que el segundo puerto 82 para la recolección de sangre y el tercer puerto 83 para la recolección de sangre se comunican entre sí. El émbolo 38 para la recolección de sangre se acciona de nuevo. Específicamente, el émbolo 38 para la recolección de sangre se empuja para expulsar sangre de la jeringa 36 para la recolección de sangre. Esta sangre expulsada se inyecta en el recipiente 32 para almacenamiento de sangre a través de la llave 8 de paso de tres vías para la recolección de sangre. Una vez que la sangre en la jeringa 36 para la recolección de sangre se inyecta completamente en el recipiente 32 para almacenamiento de sangre, se termina la operación con el émbolo 38 para la recolección de sangre. Después de la inyección de la sangre en el recipiente 32 para almacenamiento de sangre, el tubo 71 del recipiente para almacenamiento se sella herméticamente a líquidos con un sellador de calor o clip y luego se corta entre la porción sellada y el tercer puerto 83 para la recolección de sangre para separar el recipiente 32 para almacenamiento de sangre donde la sangre del sujeto se almacena desde la aguja 34 permanente, el tubo 35 de conexión de la aguja permanente, la jeringa 36 para la recolección de sangre y la unidad 37 de conexión de tres vías para la recolección de sangre.

Posteriormente, en el dispositivo 4 de adquisición de autosuero, se obtiene suero de la sangre del sujeto. El recipiente 32 para almacenamiento de sangre donde se almacena la sangre del sujeto se centrifuga en la unidad 41 de centrifugación. Luego, se recolecta el sobrenadante para obtener el suero del sujeto.

Las células de médula ósea contenidas en la suspensión de células de médula ósea se cultivan en el dispositivo 5 de cultivo de células de médula ósea. El sobrenadante de cultivo que contiene células flotantes se retira del recipiente 51 de cultivo de células de médula ósea. Luego, se obtiene el suero del sujeto y se añade un medio fresco al recipiente 51 de cultivo de células de médula ósea para seguir cultivando las células. En lo que sigue, el procedimiento se describirá en detalle.

La suspensión de células de médula ósea transportada a CPC se transfiere al recipiente 51 de cultivo de células de médula ósea. Las células de médula ósea contenidas en esta suspensión de células de médula ósea se cultivan durante un período de cultivo predeterminado. El período de cultivo predeterminado es preferiblemente de 4 días a 7 días.

Después del cultivo, el sobrenadante de cultivo que contiene células flotantes se retira del recipiente 51 de cultivo de células de médula ósea. El suero obtenido del sujeto y un medio fresco se añaden al recipiente 51 de cultivo de células de médula ósea para cultivar más las células.

Las células de médula ósea pueden cultivarse durante el período de cultivo predeterminado añadiendo al menos uno de un medio fresco y el suero obtenido del sujeto cuando la suspensión de células de médula ósea transportada a CPC se transfiere al recipiente 51 de cultivo de células de médula ósea. En el caso de agregar el medio fresco sin agregar el suero del sujeto, esta adición se realiza preferiblemente de modo que la cantidad total de los medios se mezcle con el fluido de médula ósea, es decir, la suma total de la cantidad del medio mezclado con el fluido de médula ósea en el sitio de recolección de fluido de médula ósea y la cantidad del medio fresco agregado, es de 4 a 80 veces la cantidad de fluido de médula ósea almacenada en la jeringa 21 de almacenamiento de fluido de médula ósea. Alternativamente, en el caso de agregar solo el suero obtenido del sujeto, esta adición se realiza preferiblemente de modo que la cantidad total del medio se mezcle con el fluido de médula ósea y el suero obtenido del sujeto, es decir, la suma total de la cantidad del medio mezclado con el fluido de médula ósea en el sitio de recolección del fluido de médula ósea y la cantidad del suero obtenido agregado del sujeto, es de 4 a 80 veces la cantidad del fluido de médula ósea almacenada en la jeringa 21 de almacenamiento de fluido de médula ósea. Alternativamente, en el caso de agregar tanto el medio fresco como el suero obtenido del sujeto, esta adición se realiza preferiblemente de modo que la cantidad total de los medios se mezcle con el fluido de médula ósea y el suero obtenido del sujeto, es decir, la suma total de la cantidad del medio mezclado con el fluido de médula ósea en el sitio de recolección del fluido de médula ósea, la cantidad del medio fresco agregado y la cantidad del suero obtenido agregado del sujeto, es de 4 a 80 veces la cantidad de fluido de médula ósea almacenada en la jeringa 21 de almacenamiento de fluido de médula ósea.

A continuación, el procedimiento de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero de acuerdo con la presente primera realización comprende, como se muestra en la Figura 7, la etapa S1 de preparación de suspensión de células de médula ósea, la etapa S2 de recolección y almacenamiento de sangre, la etapa S3 de adquisición de

autosuero, la etapa S4 de cultivo de células de médula ósea, la etapa S5 de eliminación de sobrenadante de cultivo, y la etapa S6 de adición de medio de autosuero, en el que: se transfiere un fluido de médula ósea en el sitio de recolección desde la jeringa 21 de almacenamiento de fluido de médula ósea al recipiente 23 de transporte de suspensión de células de médula ósea y luego anticoagulado mezclando con un medio; la suspensión de células de médula ósea resultante se transporta en un estado suspendido mientras se almacena en el recipiente 23 de transporte de suspensión de células de médula ósea, y luego se transfiere al recipiente 51 de cultivo de células de médula ósea en CPC para iniciar el cultivo; después de un lapso de un período de cultivo predeterminado, se elimina el sobrenadante de cultivo que contiene células flotantes; y se añaden un medio fresco y el suero del sujeto al recipiente 51 de cultivo de células de médula ósea para realizar un cultivo adicional. En los asuntos que especifican la invención del procedimiento de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero de acuerdo con la presente primera realización, se usarán los mismos números de referencia para designar los mismos componentes o similares a los de cada constitución descrita anteriormente en el sistema 1 de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero, de modo que se omitirá la descripción.

La etapa S1 de preparación de suspensión de células de médula ósea es una etapa que se realiza en el dispositivo 2 de almacenamiento de suspensión de células de médula ósea. En esta etapa, un fluido de médula ósea que contiene células de médula ósea recolectadas del sujeto se anticoagula mezclando con un medio en una cantidad apropiada para la cantidad del fluido de médula ósea en un estado hermético a líquidos en el sitio de recolección del fluido de médula ósea inmediatamente después de la recolección para preparar una suspensión de células de médula ósea libre de anticoagulantes. La cantidad apropiada para la cantidad de fluido de médula ósea es preferiblemente de 1,5 veces a 6 veces la cantidad de fluido de médula ósea.

En este contexto, el "anticoagulante" descrito en la presente invención se refiere a un fármaco o agente que evita la coagulación de sustancias biogénicas tales como componentes sanguíneos y evita la formación de coágulos, por ejemplo, heparina sódica y heparina cálcica), heparina de bajo peso molecular (por ejemplo, dalteparina sódica, parnaparina sódica y reviparina sódica), mesilato de nafamostat, mesilato de gabexato, ácido cítrico, solución de citrato-fosfato-dextrosa (CPD), solución ácida de citrato-dextrosa-A (ACD-A), warfarina, cumarina, dicumarol, fenprocumón, acenocumarol, biscumacetato de etilo o derivados de indanediona y está destinado a excluir algunas cosas, como el medio celular utilizado en la presente invención, el cual tampoco previene originalmente la coagulación de sustancias biogénicas como componentes sanguíneos ni previene la formación de coágulos como fármaco o agente, aunque suprime la coagulación en el evento. Específicamente, los términos "anticoagulante", "anticoagulante a excepción de un medio celular", "anticoagulante a excepción de un medio" pueden usarse indistintamente.

La etapa S2 de recolección y almacenamiento de sangre es una etapa que se realiza en el dispositivo 3 de recolección y almacenamiento de sangre. En esta etapa, se recolecta sangre del sujeto sin adición de un anticoagulante y se almacena en un estado hermético a líquidos en el recipiente 32 para almacenamiento de sangre capaz de ser centrifugado. El recipiente 32 para almacenamiento de sangre es preferiblemente un recipiente rígido capaz de ser centrifugado.

La etapa S3 de adquisición de autosuero es una etapa que se realiza en el dispositivo 4 de adquisición de autosuero. En esta etapa, el recipiente 32 para almacenamiento de sangre donde se almacena la sangre del sujeto se centrifuga para obtener el suero del sujeto.

La etapa S4 de cultivo de células de médula ósea es una etapa que se realiza en el dispositivo 5 de cultivo de células de médula ósea. En esta etapa, las células de médula ósea contenidas en la suspensión de células de médula ósea preparada se cultivan en el recipiente 51 de cultivo de células de médula ósea. En la etapa S4 de cultivo de células de médula ósea, el cultivo de las células de médula ósea es preferiblemente cultivo estático. Como se describió anteriormente, las células de médula ósea contenidas en la suspensión de células de médula ósea se cultivan preferiblemente durante 4 días a 7 días.

La etapa S5 de eliminación de sobrenadante de cultivo es una etapa que se realiza en el dispositivo 5 de cultivo de células de médula ósea. En esta etapa, el sobrenadante de cultivo que contiene células flotantes se retira del recipiente 51 de cultivo de células de médula ósea con las células de médula ósea así cultivadas unidas al mismo.

La etapa S6 de adición de medio de autosuero es una etapa que se realiza en el dispositivo 5 de cultivo de células de médula ósea. En esta etapa, el suero obtenido del sujeto y un medio se agregan al recipiente 51 de cultivo de células de médula ósea con las células de médula ósea unidas al mismo.

Como se muestra en la Figura 8, el procedimiento de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero según la presente primera realización puede comprender además la etapa S7 de preparación de la mezcla de suspensión de células de médula ósea descrito más adelante. En este caso, la "suspensión de células de médula ósea" en la etapa S4 de cultivo de células de médula ósea se reemplazará por una "mezcla de suspensión de células de médula ósea".

La etapa S7 de preparación de la mezcla de suspensión de células de médula ósea es una etapa que se realiza en el dispositivo 5 de cultivo de células de médula ósea. En esta etapa, la suspensión de células de médula ósea preparada se mezcla con un medio y/o el suero obtenido del sujeto a preparar una mezcla de suspensión de células de médula

ósea. Específicamente, en esta etapa, se agrega al menos uno de un medio fresco y el suero obtenido del sujeto cuando la suspensión de células de médula ósea se transfiere al recipiente 51 de cultivo de células de médula ósea, para preparar una mezcla de suspensión de células de médula ósea. En el caso de agregar el medio fresco sin agregar el suero del sujeto, esta adición se realiza preferiblemente de modo que la cantidad total de los medios en la mezcla de suspensión de células de médula ósea, es decir, la suma total de la cantidad del medio mezclado con el fluido de médula ósea en la etapa S1 de preparación de la suspensión de células de médula ósea y la cantidad de medio fresco agregado en la etapa S7 de preparación de la mezcla de suspensión de células de médula ósea es de 4 a 80 veces la cantidad de fluido de médula ósea que contiene las células de médula ósea recolectadas del sujeto en la etapa S1 de preparación de suspensión de células de médula ósea. Alternativamente, en el caso de agregar solo el suero obtenido del sujeto, esta adición se realiza preferiblemente de modo que la cantidad total del medio se mezcle con el fluido de médula ósea y el suero obtenido del sujeto, es decir, la suma total de la cantidad del medio mezclado con el fluido de médula ósea en la etapa S1 de preparación de la suspensión de células de médula ósea y la cantidad del suero obtenido del sujeto agregado en la etapa S7 de preparación de la mezcla de suspensión de células de médula ósea, es de 4 a 80 veces la cantidad de fluido de médula ósea que contiene células de médula ósea recolectadas del sujeto en la etapa S1 de preparación de suspensión de células de médula ósea. Alternativamente, en el caso de agregar tanto el medio fresco como el suero obtenido del sujeto, esta adición se realiza preferiblemente de modo que la cantidad total de los medios se mezcle con el fluido de médula ósea y el suero, es decir, la suma total de la cantidad del medio mezclado con el fluido de médula ósea en la etapa S1 de preparación de la suspensión de células de médula ósea, la cantidad del medio fresco agregado en la etapa S7 de preparación de la mezcla de suspensión de células de médula ósea y la cantidad del suero obtenido del sujeto agregado en la etapa S7 de preparación de la mezcla de suspensión de células de médula ósea es 4 a 80 veces la cantidad de fluido de médula ósea que contiene células de médula ósea recolectadas del sujeto en la etapa S1 de preparación de suspensión de células de médula ósea.

A continuación, el procedimiento para producir una composición medicinal que comprende células de médula ósea cultivadas que contienen autosuero como ingrediente activo de acuerdo con la presente primera realización comprende, como se muestra en la Figura 10, la etapa S1 de preparación de suspensión de células de médula ósea, la etapa S2 de recolección y almacenamiento de sangre, la etapa S3 de adquisición de autosuero, la etapa S4 de cultivo de células de médula ósea, la etapa S5 de eliminación de sobrenadante de cultivo, y la etapa S9 de adición de medio de autosuero y cultivo, en el que: se transfiere un fluido de médula ósea en el sitio de recolección desde la jeringa 21 de almacenamiento de fluido de médula ósea al recipiente 23 de transporte de suspensión de células de médula ósea y luego se anticoagula mezclando con un medio; la suspensión de células de médula ósea resultante se transporta en un estado suspendido mientras se almacena en el recipiente 23 de transporte de suspensión de células de médula ósea, y luego se transfiere al recipiente 51 de cultivo de células de médula ósea en CPC para iniciar el cultivo; después de un lapso de un período de cultivo predeterminado, se elimina el sobrenadante de cultivo que contiene células flotantes; y se añaden un medio fresco y el suero del sujeto al recipiente 51 de cultivo de células de médula ósea para realizar un cultivo adicional. En los asuntos que especifican la invención del procedimiento para producir una composición medicinal que comprende células de médula ósea cultivadas que contienen autosuero como ingrediente activo de acuerdo con la presente primera realización, se usarán los mismos números de referencia para designar los mismos componentes o etapas similares a las de cada constitución y cada materia que especifica la invención descrita anteriormente en el sistema 1 de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero y el procedimiento de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero de acuerdo con el presente primer aspecto, de modo que se omitirá la descripción.

La etapa S9 de cultivo y adición de medio de autosuero es una etapa que se realiza en el dispositivo 5 de cultivo de células de médula ósea. En esta etapa, el suero obtenido del sujeto y un medio se añaden al recipiente 51 de cultivo de células de médula ósea con las células de médula ósea unidas a las mismas para realizar más cultivo.

Como se muestra en la Figura 11, el procedimiento para producir una composición medicinal que comprende células de médula ósea cultivadas que contienen autosuero como ingrediente activo de acuerdo con la presente primera realización puede tener además la etapa S7 de preparación de la mezcla de suspensión de células de médula ósea descrito anteriormente. En este caso, la "suspensión de células de médula ósea" en la etapa S4 de cultivo de células de médula ósea se reemplazará por una "mezcla de suspensión de células de médula ósea".

El dispositivo 2 de almacenamiento de la suspensión de células de médula ósea, el dispositivo 3 de recolección y almacenamiento de sangre, el dispositivo 4 de adquisición de autosuero, el dispositivo 5 de cultivo de células de médula ósea y el sistema 1 de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero que comprende estos dispositivos de acuerdo con el primer aspecto actual, el procedimiento de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero, y el procedimiento para producir una composición medicinal que comprende células de médula ósea cultivadas que contienen autosuero como ingrediente activo producen los siguientes efectos:

1. Las células de médula ósea contenidas en el fluido de médula ósea recolectada del sujeto se pueden anticoagular limpia y convenientemente en un estado hermético a líquidos para obtener eficientemente las células de interés de la médula ósea.

2. La sangre del sujeto puede almacenarse limpia y convenientemente en un estado hermético a líquidos, y el suero del mismo puede obtenerse de manera eficiente.

3. Las células de médula ósea del sujeto pueden cultivarse usando el autosuero y, por lo tanto, crecer de manera eficiente, y las células de médula ósea resultantes pueden usarse en medicina regenerativa.

4. Las células de médula ósea contenidas en el fluido de médula ósea recolectada del sujeto pueden cultivarse de manera conveniente y confiable incluso cuando la cantidad de células es pequeña, y las células de médula ósea resultantes pueden usarse en medicina regenerativa.

A continuación, se describirá en detalle el segundo aspecto del sistema 1 de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero. En el segundo aspecto, un sistema 1 de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero es un sistema de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero para cultivar células de médula ósea recolectadas de un sujeto sin el uso de un anticoagulante con el suero del sujeto, en el que: un fluido de médula ósea que contiene células de médula ósea recolectadas del sujeto se transfiere al sitio de recolección de una jeringa 21 de almacenamiento de fluido de médula ósea donde el fluido de médula ósea se almacena en un recipiente 52 de cultivo y transporte de células de médula ósea que es un recipiente rígido herméticamente sellado que almacena una suspensión de células de médula ósea anticoagulada obtenida mezclando el fluido de médula ósea con un medio y comienza el cultivo de las células de médula ósea, y luego se mezcla con el medio para realizar la anticoagulación mientras se inicia el cultivo de las células de médula ósea; la suspensión de células de médula ósea resultante se transporta en un estado cultivado mientras se almacena en el recipiente 52 de cultivo y transporte de células de médula ósea; después de un lapso de un período de cultivo predeterminado, se elimina el sobrenadante de cultivo; y en la ubicación del cultivo de células, se añaden un medio y el suero del sujeto en el recipiente 52 de cultivo y transporte de células de médula ósea para realizar un cultivo adicional.

En el segundo aspecto presente, el sistema 1 de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero comprende preferiblemente al menos uno de un dispositivo 3 de recolección y almacenamiento de sangre, un dispositivo 4 de adquisición de autosuero y un dispositivo 5 de cultivo de células de médula ósea y más preferiblemente comprende todos estos dispositivos. En esta constitución del sistema 1 de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero de acuerdo con el presente segundo aspecto, se utilizarán los mismos números de referencia para designar los mismos componentes o similares a los de cada constitución según el primer aspecto descrito anteriormente, de modo que la descripción será omitida.

El dispositivo 5 de cultivo de células de médula ósea según el segundo aspecto presente está constituido principalmente por una jeringa 21 de almacenamiento de fluido de médula ósea, una jeringa 22 de almacenamiento de medio, un recipiente 52 de cultivo y transporte de células de médula ósea, y una unidad 24 de conexión para suspensión de células de médula ósea.

El recipiente 52 de cultivo y transporte de células de médula ósea no está particularmente limitado siempre que el recipiente sea un recipiente rígido hermético a líquidos que sea capaz de almacenar una suspensión de células de médula ósea anticoagulada obtenida mezclando el fluido de médula ósea con el medio y capaz de cultivar las células de médula ósea. Ejemplos de dicha constitución pueden incluir una constitución en la que, como se muestra en la Figura 6, el recipiente 52 de cultivo y transporte de células de médula ósea tiene un extremo superior abierto al que se fija una tapa 53 de recipiente de cultivo y transporte de manera hermética a los líquidos con tornillos, la tapa 53 del recipiente de cultivo y transporte comprende un tubo 54 del recipiente de cultivo y transporte y un respiradero 55 del recipiente de cultivo y transporte. El tubo 54 del recipiente de cultivo y transporte penetra en la tapa 53 del recipiente de cultivo y transporte para comunicar la unidad 24 de conexión para la suspensión de células de médula ósea con el espacio interior del recipiente 52 de cultivo y transporte de células de médula ósea. El respiradero 55 del recipiente de cultivo y transporte penetra en la tapa 53 del recipiente de cultivo y transporte para comunicar el espacio interior del recipiente 52 de cultivo y transporte de células de médula ósea con el espacio exterior. El respiradero 55 del recipiente de cultivo y transporte está provisto en su punta de un filtro 56 de respiradero del recipiente de cultivo y transporte que evita que entren bacterias en el respiradero. Pueden usarse aquellos que sean similares a un material para el tubo 26 del recipiente de transporte y el filtro 28 de respiradero del recipiente de transporte como un material que constituye el tubo 54 de recipiente de cultivo y transporte y el filtro 56 de respiradero del recipiente de cultivo y transporte, respectivamente.

En el presente segundo aspecto, la unidad 24 de conexión para suspensión de células de médula ósea no está limitada siempre que la unidad sea constitutiva o funcionalmente capaz de distribuir el fluido de médula ósea y el medio y capaz de conectar herméticamente la jeringa 21 de almacenamiento de fluido médula ósea, la jeringa 22 de almacenamiento de medio y el recipiente 52 de cultivo y transporte de células de médula ósea. Ejemplos de dicha constitución pueden incluir una constitución que tiene, como se muestra en la Figura 6, una llave 6 de paso de tres vías para suspensión de células de médula ósea. La constitución de la llave 6 de paso de tres vías para suspensión de células de médula ósea de acuerdo con el presente segundo aspecto es similar a la del presente primer aspecto.

A continuación, se describirán los efectos del dispositivo 5 de cultivo de células de médula ósea, el dispositivo 3 de recolección y almacenamiento de sangre, el dispositivo 4 de adquisición de autosuero y el sistema 1 de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero que comprende estos dispositivos de acuerdo con el segundo aspecto presente, un procedimiento de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero, y un procedimiento para producir una composición medicinal que comprende células de médula ósea cultivadas que contienen autosuero como ingrediente activo.



En el dispositivo 5 de cultivo de células de médula ósea, un fluido de médula ósea recolectado del sujeto se mezcla herméticamente con un medio para preparar una suspensión de células de médula ósea anticoagulada, que luego se transporta al CPC mientras se cultivan las células de médula ósea allí contenidas. En lo que sigue, el procedimiento se describirá en detalle.

- 5 La suspensión de células de médula ósea preparada por anticoagulación se almacena en el recipiente 52 de cultivo y transporte de células de médula ósea de una manera similar al almacenamiento de la suspensión de células de médula ósea en el recipiente 23 de transporte de suspensión de células de médula ósea de acuerdo con el primer aspecto. En el segundo aspecto presente, el recipiente 52 de cultivo y transporte de células de médula ósea tiene una constitución en la que las células de médula ósea cultivadas pueden unirse al mismo desde el comienzo del cultivo.
- 10 Por lo tanto, se prepara una suspensión de células de médula ósea mientras se inicia el cultivo de las células de médula ósea contenidas en el mismo, de modo que las células de médula ósea cultivadas se unen al recipiente 52 de cultivo y transporte de células de médula ósea.

Específicamente, el recipiente 52 de cultivo y transporte de células de médula ósea no está particularmente limitado siempre que el recipiente permita la unión de las células de médula ósea cultivadas desde el comienzo del cultivo. Se prefiere un matraz para cultivo de células. En la segunda realización, la cantidad del medio almacenado en la una jeringa 22 de almacenamiento de medio es preferiblemente de 2 a 4 veces la cantidad del fluido de médula ósea almacenada en la jeringa 21 de almacenamiento de fluido de médula ósea.

Las células de médula ósea almacenadas en el recipiente 52 de cultivo y transporte de células de médula ósea se transportan en un estado cultivado a CPC. Después de un lapso de un período de cultivo predeterminado, el sobrenadante de cultivo que contiene células flotantes se retira del recipiente 52 de cultivo y transporte de células de médula ósea. Luego, se agrega el autosuero del sujeto y un medio fresco al recipiente 52 de cultivo y transporte de células de médula ósea para realizar más cultivo. El dispositivo 3 de recolección y almacenamiento de sangre y el dispositivo 4 de adquisición de autosuero según el segundo aspecto presente tienen los mismos efectos que en la primera realización. El cultivo de las células de médula ósea después del transporte en un estado cultivado a CPC es preferiblemente un cultivo estático. El período de cultivo predeterminado es preferiblemente de 4 días a 7 días.

A continuación, el procedimiento de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero según la presente segunda realización es un procedimiento para cultivar directamente células de médula ósea recolectadas de un sujeto sin el uso de un anticoagulante y luego cultivar más las células resultantes usando el suero del tema. Específicamente, como se muestra en la Figura 9, el procedimiento comprende la etapa S1 de preparación de suspensión de células de médula ósea, la etapa S8 de cultivo y transporte de células de médula ósea, la etapa S2 de recolección y almacenamiento de sangre, la etapa S3 de adquisición de autosuero, la etapa S5 de eliminación de sobrenadante de cultivo y la etapa S6 de adición de medio de autosuero, en el que: se transfiere un fluido de médula ósea en el sitio de recolección desde la jeringa 21 que almacena el fluido de médula ósea al recipiente 52 de cultivo y transporte de células de médula ósea y luego se mezcla con un medio para realizar la anticoagulación mientras se inicia el cultivo de células de médula ósea; la suspensión de células de médula ósea resultante se transporta en un estado cultivado mientras se almacena en el recipiente 52 de cultivo y transporte de células de médula ósea; después de un lapso de un período de cultivo predeterminado, se elimina el sobrenadante de cultivo que contiene células flotantes; y en CPC, se añaden un medio fresco y el suero del sujeto al recipiente 52 de cultivo y transporte de células de médula ósea para realizar un cultivo adicional. En los asuntos que especifican la invención del procedimiento de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero según la presente segunda realización, se usarán los mismos números de referencia para designar los mismos componentes o etapas similares a las de cada constitución y cada materia descrita anteriormente en el sistema 1 de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero, el procedimiento de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero y el procedimiento para producir una composición medicinal que comprende células de médula ósea cultivadas que contienen autosuero como ingrediente activo según la presente primera o segunda realización, de forma que se omitirá la descripción.

La etapa S8 de cultivo y transporte de células de médula ósea es una etapa que se realiza en el dispositivo 5 de cultivo de células de médula ósea. En esta etapa, las células de médula ósea contenidas en la suspensión de células de médula ósea preparada se cultivan en el recipiente 52 de cultivo y transporte de células de médula ósea. También en esta etapa, la suspensión de células de médula ósea preparada en un lugar distante se almacena en el recipiente 52 de cultivo y transporte de células de médula ósea y se transporta directamente en un estado cultivado. Como se describió anteriormente, el recipiente 52 de cultivo y transporte de células de médula ósea es preferiblemente un matraz para cultivo de células. La cantidad del medio apropiado para la cantidad de fluido de médula ósea en la etapa S1 de preparación de suspensión de células de médula ósea es preferiblemente de 2 a 4 veces la cantidad de fluido de médula ósea. En la etapa S8 de cultivo y transporte de células de médula ósea, las células de médula ósea se cultivan preferiblemente durante 4 días a 7 días en el recipiente 52 de cultivo y transporte de células de médula ósea.

A continuación, el procedimiento para producir una composición medicinal que comprende células de médula ósea cultivadas que contienen autosuero como ingrediente activo según la presente segunda realización es un procedimiento para cultivar directamente células de médula ósea recolectadas de un sujeto sin el uso de un anticoagulante y luego cultivar más las células resultantes usando el suero del sujeto. Específicamente, como se muestra en la Figura 12, el procedimiento comprende la etapa S1 de preparación de suspensión de células de médula ósea, la etapa S8 de cultivo y transporte de células de médula ósea, la etapa S2 de recolección y almacenamiento de

5 sangre, la etapa S3 de adquisición de autosuero, la etapa S5 de eliminación de sobrenadante de cultivo y la etapa S9  
 de adición de medio de autosuero y de cultivo, en el que: se transfiere un fluido de médula ósea en el sitio de  
 recolección desde la jeringa 21 que almacena el fluido de médula ósea al recipiente 52 de cultivo y transporte de  
 células de médula ósea y luego se mezcla con un medio para realizar la anticoagulación mientras se inicia el cultivo  
 10 del células de médula ósea; la suspensión de células de médula ósea resultante se transporta en un estado cultivado  
 mientras se almacena en el recipiente 52 de cultivo y transporte de células de médula ósea; después de un lapso de  
 un período de cultivo predeterminado, se elimina el sobrenadante de cultivo que contiene células flotantes; y en CPC,  
 se añaden un medio fresco y el suero del sujeto al recipiente 52 de cultivo y transporte de células de médula ósea  
 para realizar un cultivo adicional. En los asuntos que especifican la invención del procedimiento para producir una  
 15 composición medicinal que comprende células de médula ósea cultivadas que contienen autosuero como ingrediente  
 activo de acuerdo con la presente segunda realización, se usarán los mismos números de referencia para designar  
 los mismos componentes o etapas similares a las de cada constitución y cada materia descrita anteriormente en la  
 primera realización o el sistema 1 de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero y el procedimiento de  
 cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero según la presente segunda realización, de modo que se  
 omitirá la descripción.

El dispositivo 5 de cultivo de células de médula ósea, el dispositivo 3 de recolección y almacenamiento de sangre, el  
 dispositivo 4 de adquisición de autosuero y el sistema 1 de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero  
 que comprende estos dispositivos de acuerdo con el segundo aspecto presente, el cultivo de células de médula ósea  
 20 que contiene autosuero y el procedimiento para producir una composición medicinal que comprende células de  
 médula ósea cultivadas que contienen autosuero como ingrediente activo producen los siguientes efectos:

1. Las células de médula ósea contenidas en el fluido de médula ósea recolectada del sujeto se pueden  
 anticoagular limpia y convenientemente en un estado hermético a líquidos para obtener eficientemente las células  
 de interés de la médula ósea.
- 25 2. La sangre del sujeto puede almacenarse limpia y convenientemente en un estado hermético a líquidos, y el  
 suero del mismo puede obtenerse de manera eficiente.
3. Las células de médula ósea del sujeto pueden cultivarse usando el autosuero y, por lo tanto, crecer de manera  
 eficiente, y las células de médula ósea resultantes pueden usarse en medicina regenerativa.
4. Las células de médula ósea contenidas en el fluido de médula ósea recolectada del sujeto pueden cultivarse de  
 30 manera conveniente y confiable incluso cuando la cantidad de células es pequeña, y las células de médula ósea  
 resultantes pueden usarse en medicina regenerativa.
5. Incluso las células de médula ósea contenidas en el fluido de médula ósea recolectada del sujeto en un lugar  
 distante se pueden cultivar y cultivar de manera confiable, y las células de médula ósea resultantes se pueden  
 usar en medicina regenerativa.

**Listado de signos de referencia**

- 35 1: Sistema de cultivo de células de médula ósea que contiene autosuero
- 2: Dispositivo de almacenamiento de suspensión de células de médula ósea
- 3: Dispositivo de recolección y almacenamiento de sangre
- 4: Dispositivo de adquisición de autosuero
- 5: Dispositivo de cultivo de células de médula ósea
- 40 6: Llave de tres vías para suspensión de células de médula ósea
- 7: Tapa de recipiente para almacenamiento
- 8: Llave de tres vías para recolección de sangre
- 21: Jeringa de almacenamiento de fluido de médula ósea
- 22: Jeringa de almacenamiento de medio
- 45 23: Recipiente transportador de suspensión de células de médula ósea
- 24: Unidad de conexión para suspensión de células de médula ósea
- 25: Tapa de recipiente de transporte
- 26: Tubo de recipiente de transporte

- 27: Respiradero del recipiente de transporte
- 28: Filtro de respiradero del recipiente de transporte
- 31: Aguja de punción vascular
- 32: Recipiente para almacenamiento de sangre
- 5 33: Unidad de conexión para la recolección de sangre.
- 34: Aguja permanente
- 35: Tubo de conexión de aguja permanente
- 36: Jeringa para recolección de sangre
- 37: Unidad de conexión de tres vías para recolección de sangre.
- 10 38: Émbolo para la recolección de sangre
- 41: Unidad de centrifugación
- 51: Recipiente de cultivo de células de médula ósea
- 52: Recipiente de cultivo y transporte de células de médula ósea.
- 53: Tapa del recipiente de cultivo y transporte
- 15 61: Primer puerto para suspensión
- 62: Segundo puerto para suspensión
- 63: Tercer puerto para suspensión
- 64: Grifo para suspensión
- 71: Tubo de recipiente para almacenamiento
- 20 72: Respiradero del recipiente de almacenamiento
- 73: Filtro de respiradero del recipiente de almacenamiento
- 81: Primer puerto para recolección de sangre
- 82: Segundo puerto para recolección de sangre
- 83: Tercer puerto para recolección de sangre
- 25 84: Grifo para recolección de sangre
- S1: Etapa de preparación de la suspensión de células de médula ósea
- S2: Etapa de recolección y almacenamiento de sangre
- S3: Etapa de adquisición de autosuero
- S4: Etapa de cultivo de células de médula ósea
- 30 S5: Etapa de eliminación del sobrenadante de cultivo
- S6: Etapa de adición de medio de autosuero
- S7: Etapa de preparación de la mezcla de suspensión de células de médula ósea
- S8: Etapa de cultivo y transporte de células de médula ósea
- S9: Etapa de adición de medio de autosuero y de cultivo

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de cultivo de células de médula ósea recolectadas de un sujeto, con el suero del sujeto, **caracterizado porque:**

5 una etapa de preparación de la suspensión de células de médula ósea en la que un fluido de médula ósea que contiene células de médula ósea recolectadas del sujeto es anticoagulado sin el uso de un anticoagulante al mezclarlo con un medio en una cantidad de 1,5 veces a 6 veces la cantidad del fluido de médula ósea en un estado hermético a líquidos en el sitio de recolección del fluido de médula ósea para preparar una suspensión de células de médula ósea libre de anticoagulantes;

10 una etapa de recolección y almacenamiento de sangre en la que la sangre recolectada del sujeto sin la adición de un anticoagulante es almacenada en un estado hermético a líquidos en un recipiente (32) para almacenamiento de sangre capaz de ser centrifugado; y

una etapa de adquisición de autosuero en la que el recipiente (32) para almacenamiento de sangre donde se almacena la sangre del sujeto es centrifugado para obtener el suero del sujeto.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:

15 una etapa de cultivo de células de médula ósea en la que las células de médula ósea contenidas en la suspensión de células de médula ósea preparadas son cultivadas en un recipiente (51) de cultivo de células de médula ósea;

una etapa de eliminación del sobrenadante de cultivo en la que el sobrenadante de cultivo que contiene células flotantes es retirado del recipiente (51) de cultivo de células de médula ósea con las células de médula ósea así cultivadas unidas al mismo; y

20 una etapa de adición de medio de autosuero en la que el suero obtenido del sujeto y un medio son agregados al recipiente (51) de cultivo de células de médula ósea con las células de médula ósea unidas al mismo.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende:

25 una etapa de preparación de la mezcla de suspensión de células de médula ósea en la que la suspensión de células de médula ósea preparada es mezclada con un medio y/o el suero obtenido del sujeto para preparar una mezcla de suspensión de células de médula ósea;

una etapa de cultivo de células de médula ósea en la que las células de médula ósea contenidas en la mezcla de suspensión de células de médula ósea preparada son cultivadas en un recipiente (51) de cultivo de células de médula ósea;

30 una etapa de eliminación del sobrenadante de cultivo en la que el sobrenadante de cultivo que contiene células flotantes es retirado del recipiente (51) de cultivo de células de médula ósea con las células de médula ósea así cultivadas unidas al mismo; y

una etapa de adición de medio de autosuero en la que el suero obtenido del sujeto y un medio son agregados al recipiente (51) de cultivo de células de médula ósea con las células de médula ósea unidas al mismo.

4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que:

35 una etapa de preparación de la suspensión de células de médula ósea en la que un fluido de médula ósea que contiene células de médula ósea recolectadas del sujeto es anticoagulado mezclando con un medio en una cantidad de 1,5 veces a 6 veces la cantidad de fluido de médula ósea en un recipiente (52) de cultivo y transporte de células de médula ósea con un estado hermético a líquidos en el sitio de recolección del fluido de médula ósea para preparar una suspensión de células de médula ósea libre de anticoagulantes;

40 una etapa de cultivo y transporte de células de médula ósea en la que las células de médula ósea contenidas en la suspensión de células de médula ósea preparada son transportadas a la ubicación del cultivo de células mientras son cultivadas en el recipiente (52) de cultivo y transporte de células de médula ósea;

45 una etapa de eliminación de sobrenadante de cultivo en la que el sobrenadante de cultivo que contiene células flotantes es retirado del recipiente (52) de cultivo y transporte de células de médula ósea con las células de médula ósea así cultivadas unidas al mismo; y

una etapa de adición de medio de autosuero en la que el suero del sujeto y un medio son añadidos al recipiente (52) de cultivo y transporte de células de médula ósea con las células de médula ósea unidas al mismo.

50 5. Un procedimiento de producción de una composición medicinal que comprende, como ingrediente activo, células de médula ósea que han sido recolectadas de un sujeto y han sido cultivadas con el suero del sujeto, **caracterizado porque** el fluido de médula ósea que contiene las células de médula ósea es anticoagulado sin uso de un

anticoagulante mediante la mezcla con un medio en una cantidad de 1,5 veces a 6 veces la cantidad de fluido de médula ósea en un estado hermético en el sitio de recolección del fluido de médula ósea.

- 5 6. Un procedimiento de producción de una composición medicinal de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** comprende una etapa en la que las células de médula ósea son cultivadas mediante el procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 sin el uso de un anticoagulante.

Fig. 1

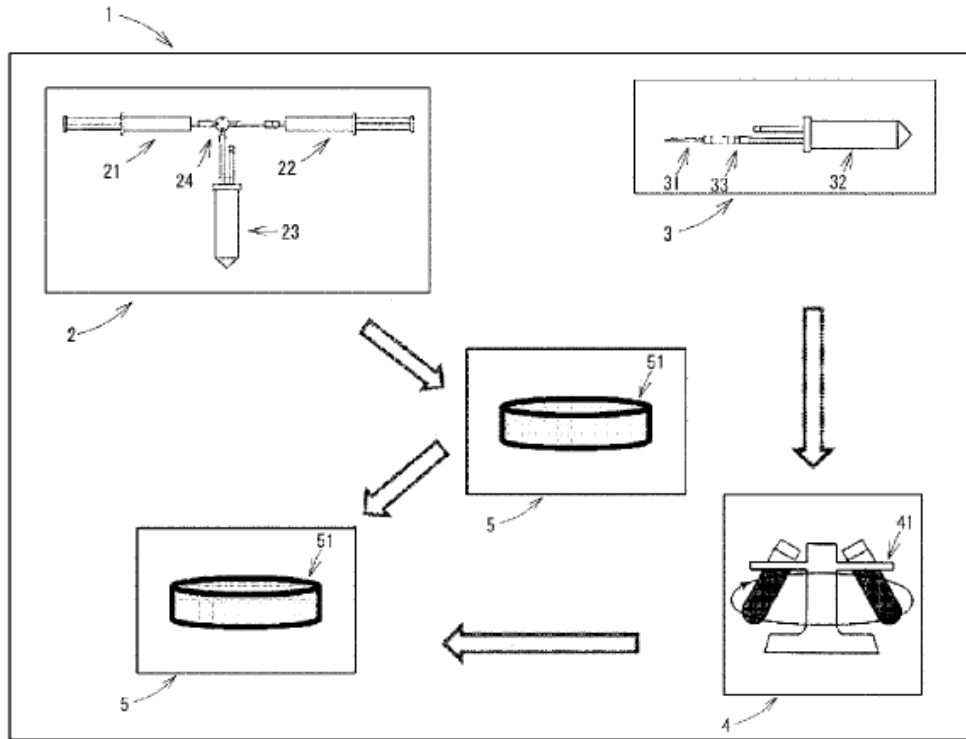


Fig. 2

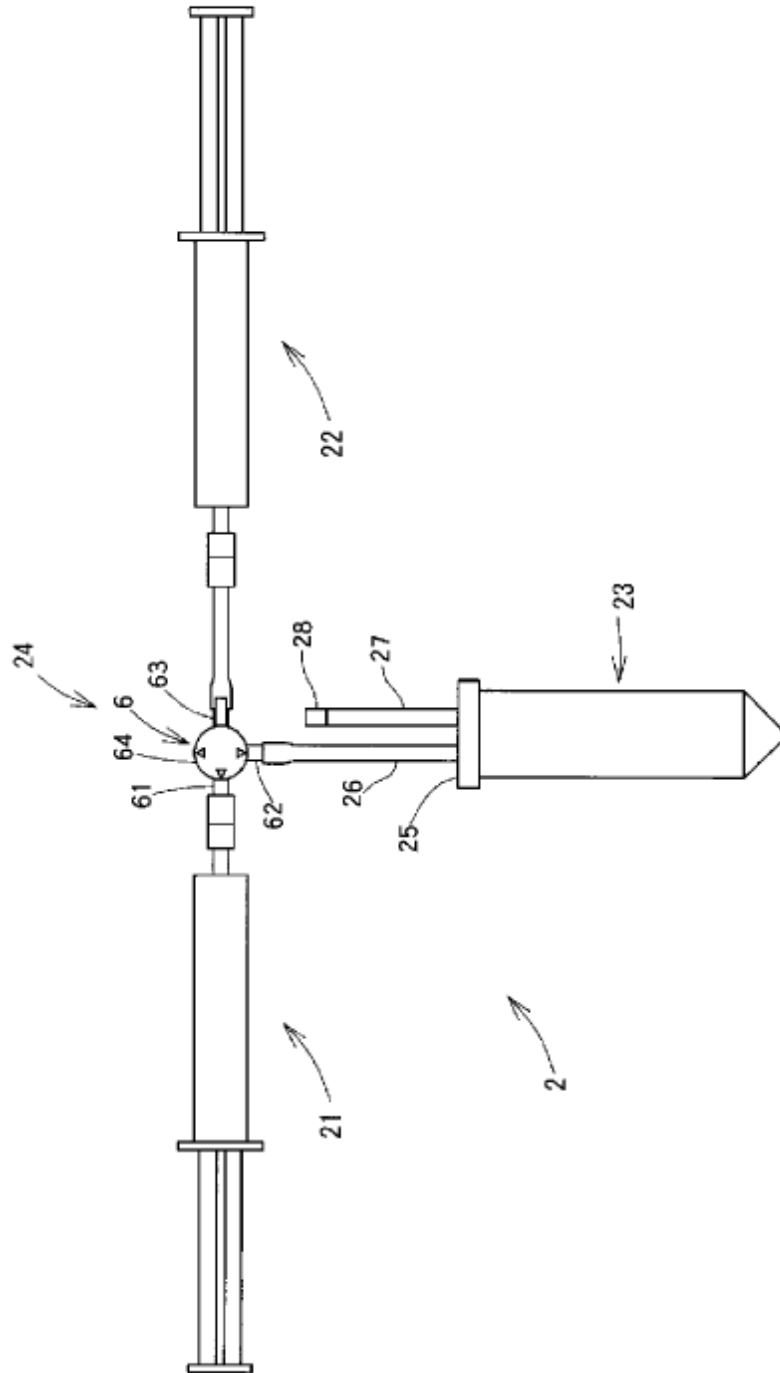


Fig. 3

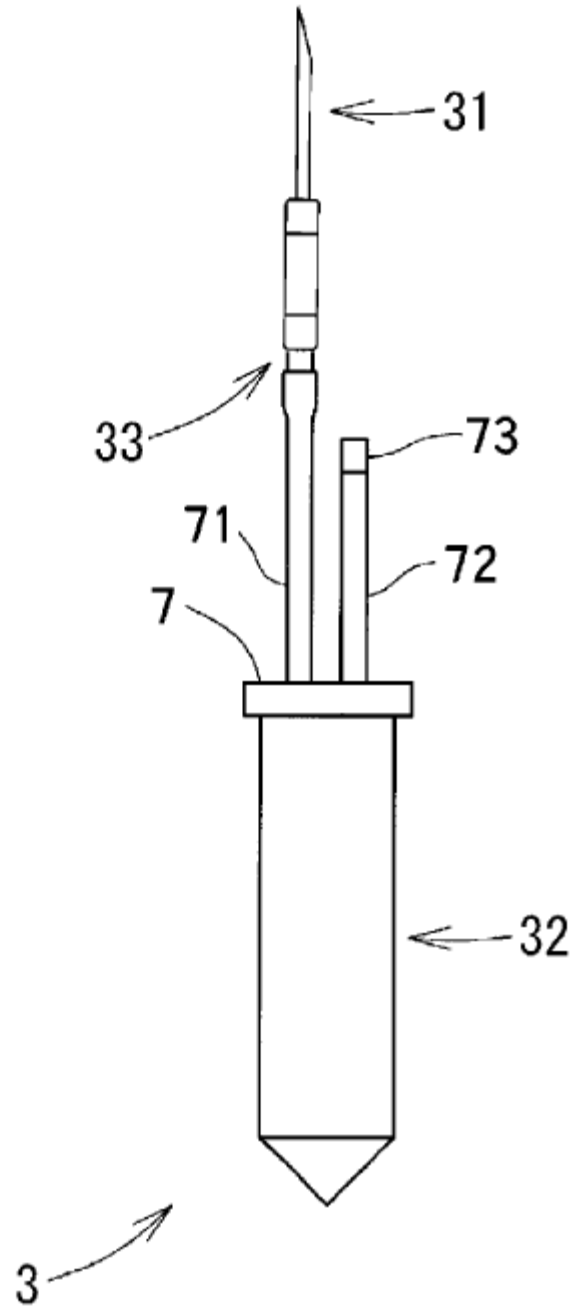




Fig. 4

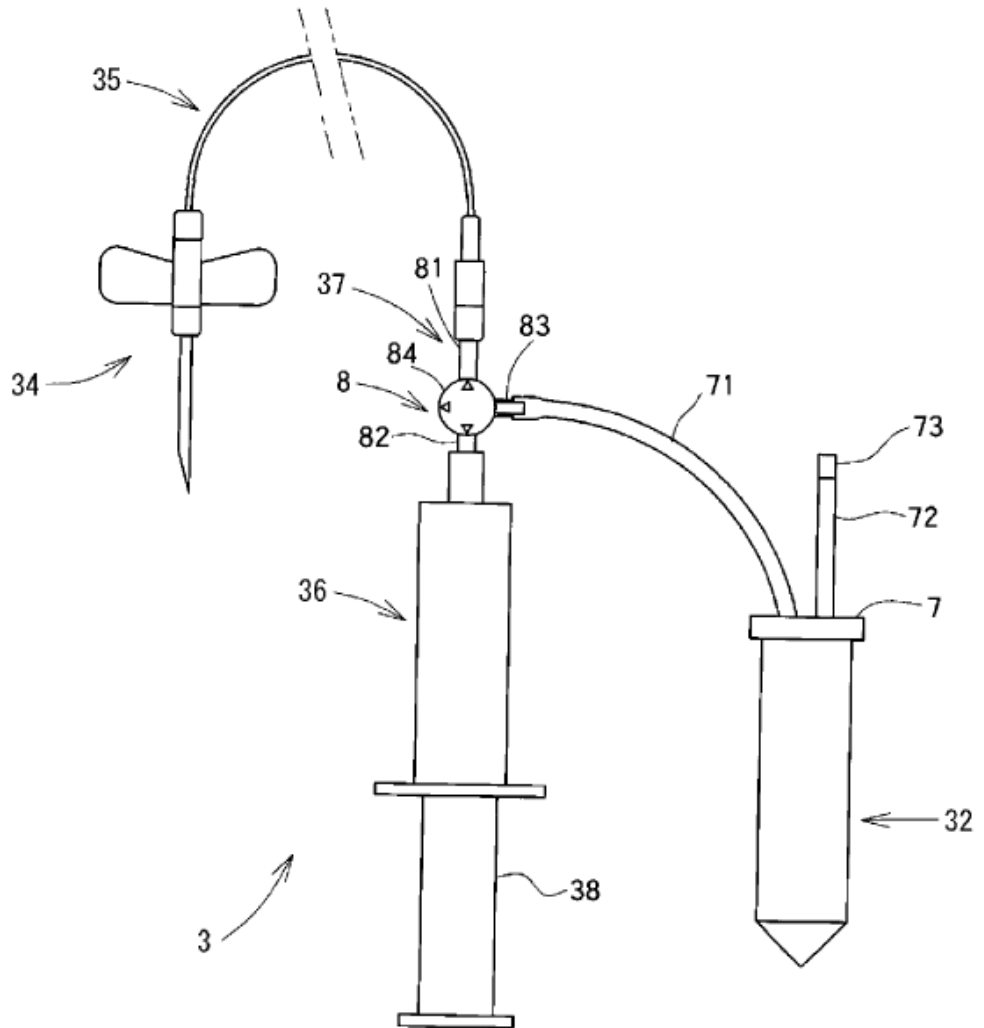


Fig. 5

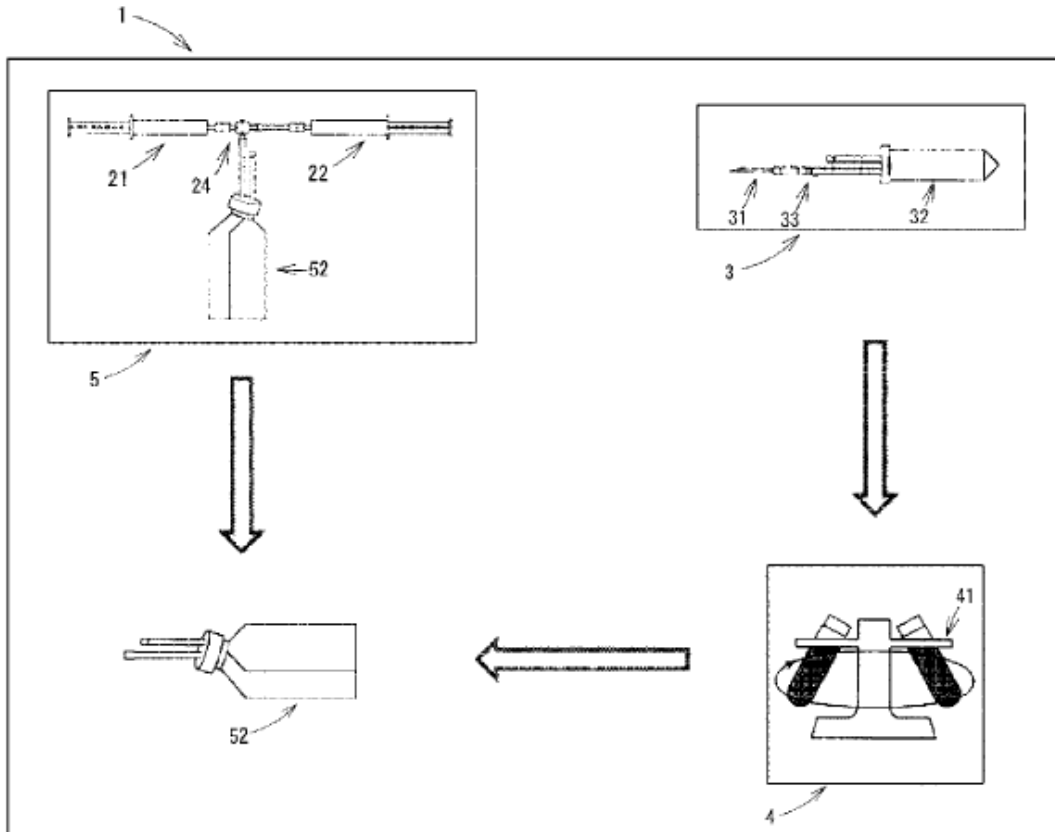


Fig. 6

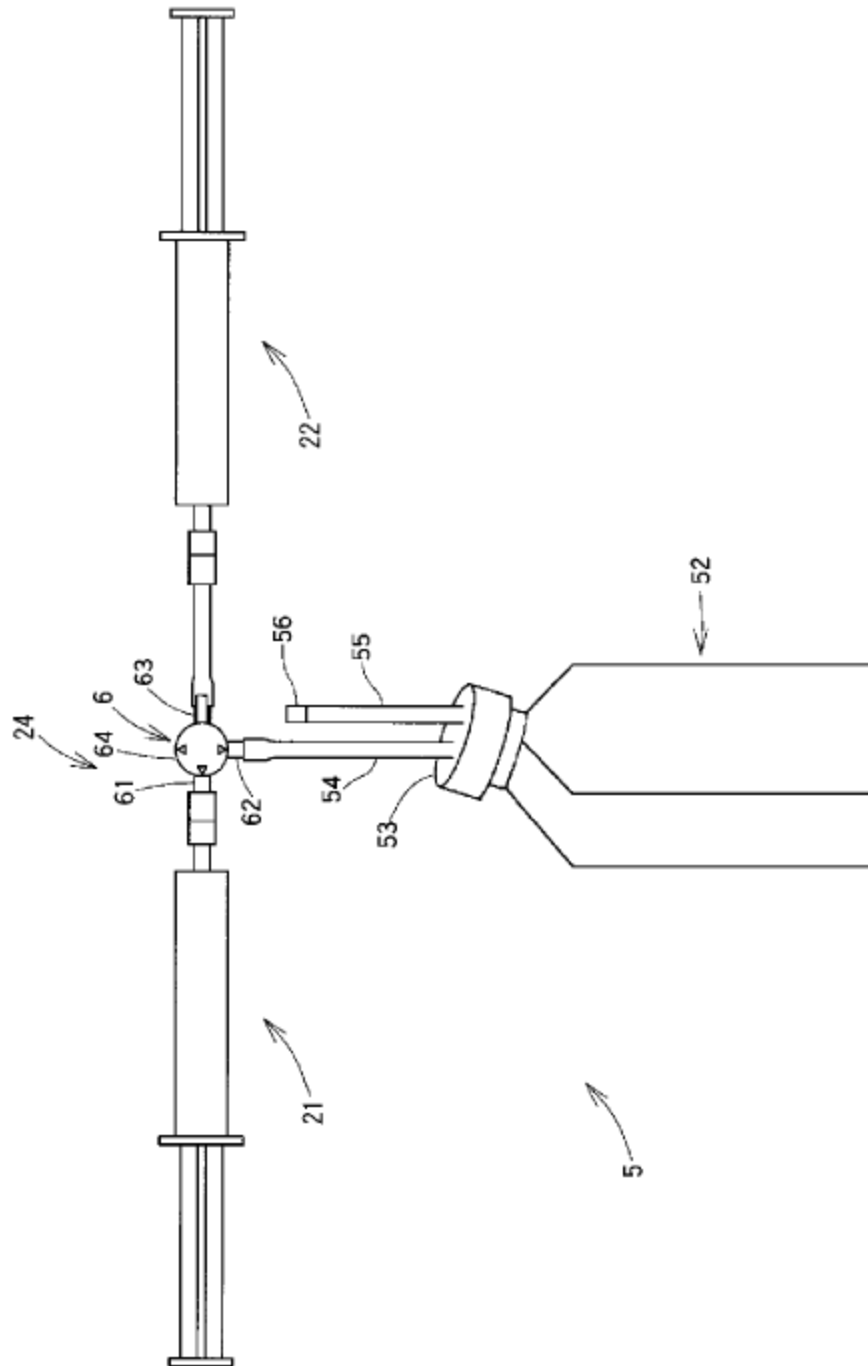


Fig. 7

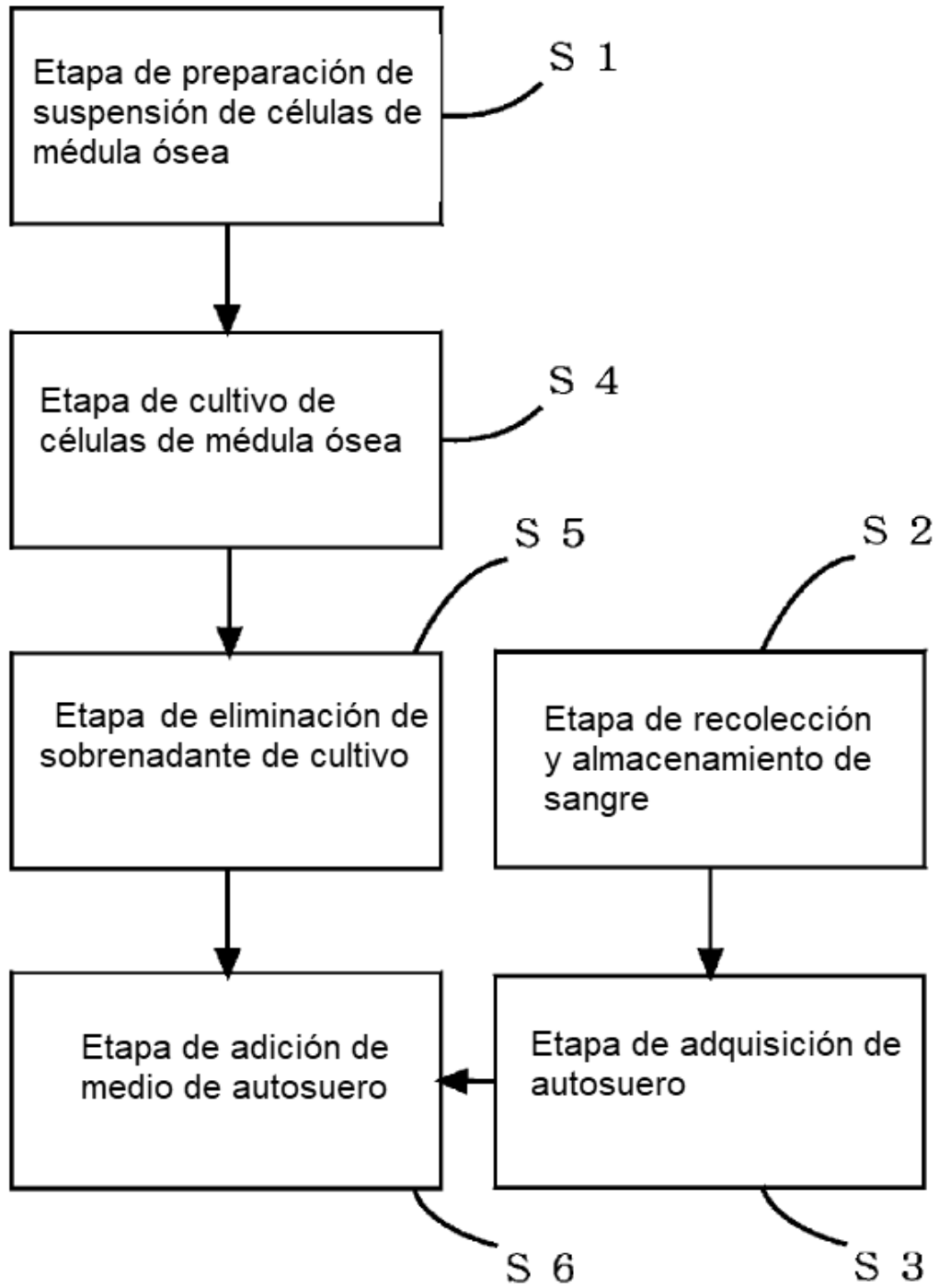


Fig. 8

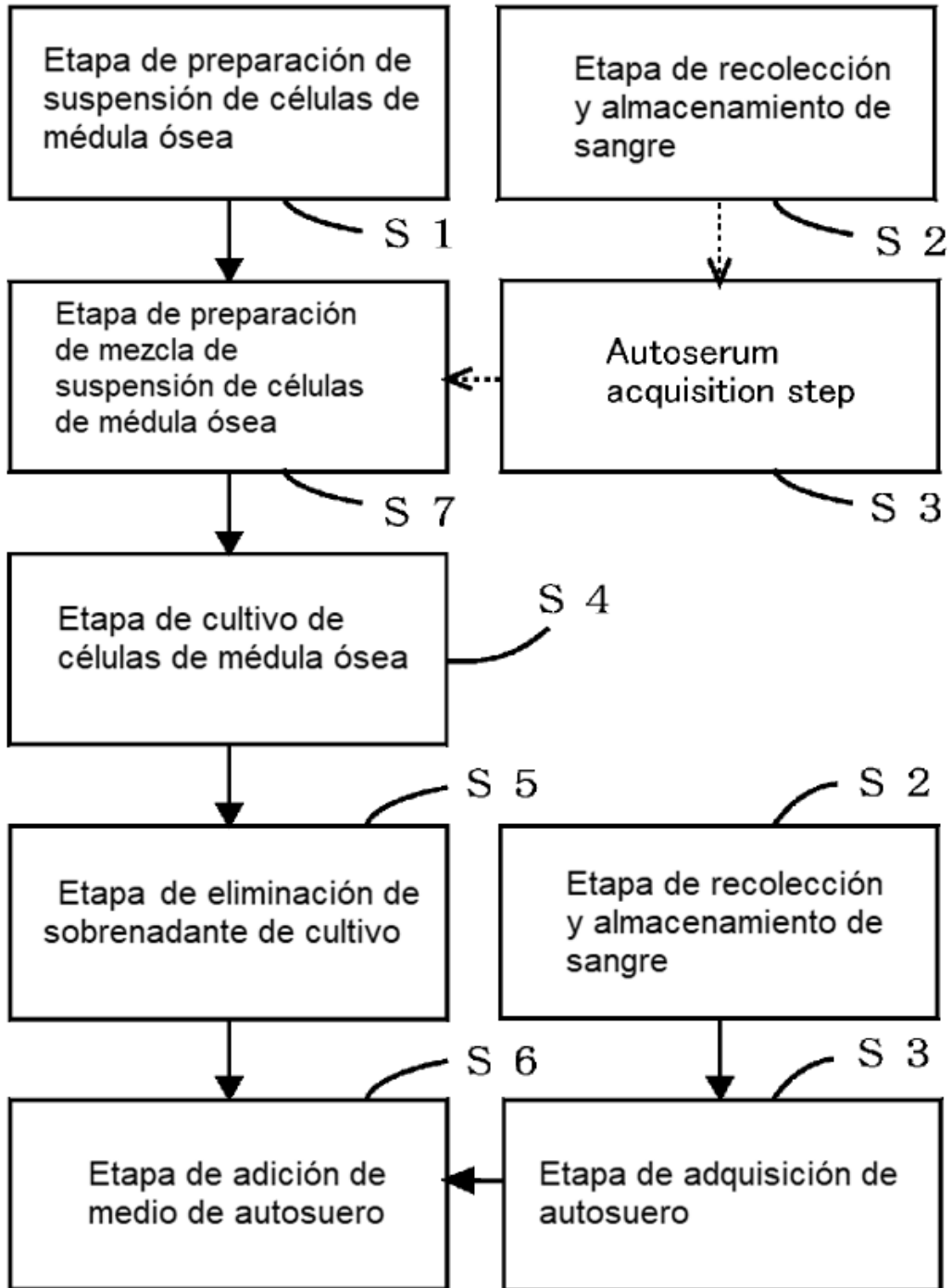


Fig. 9

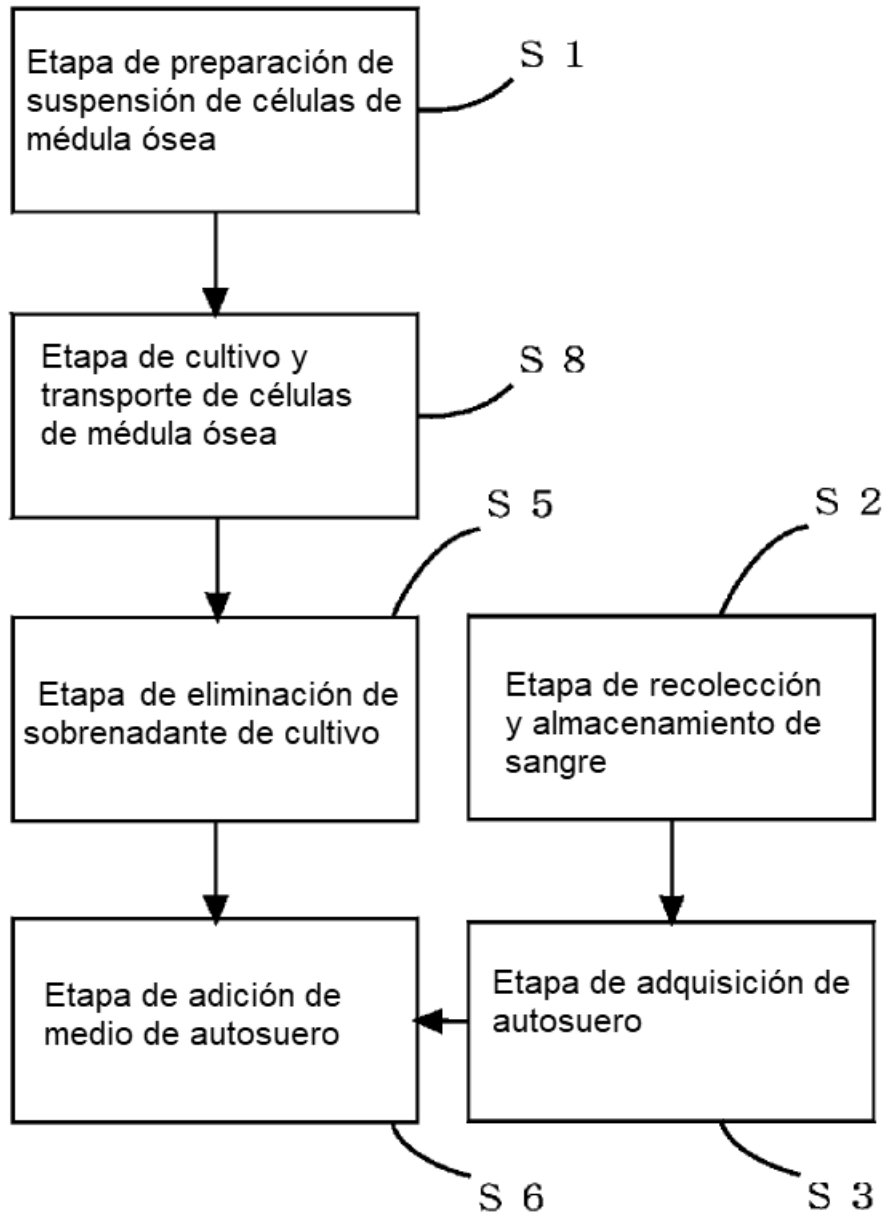


Fig. 10

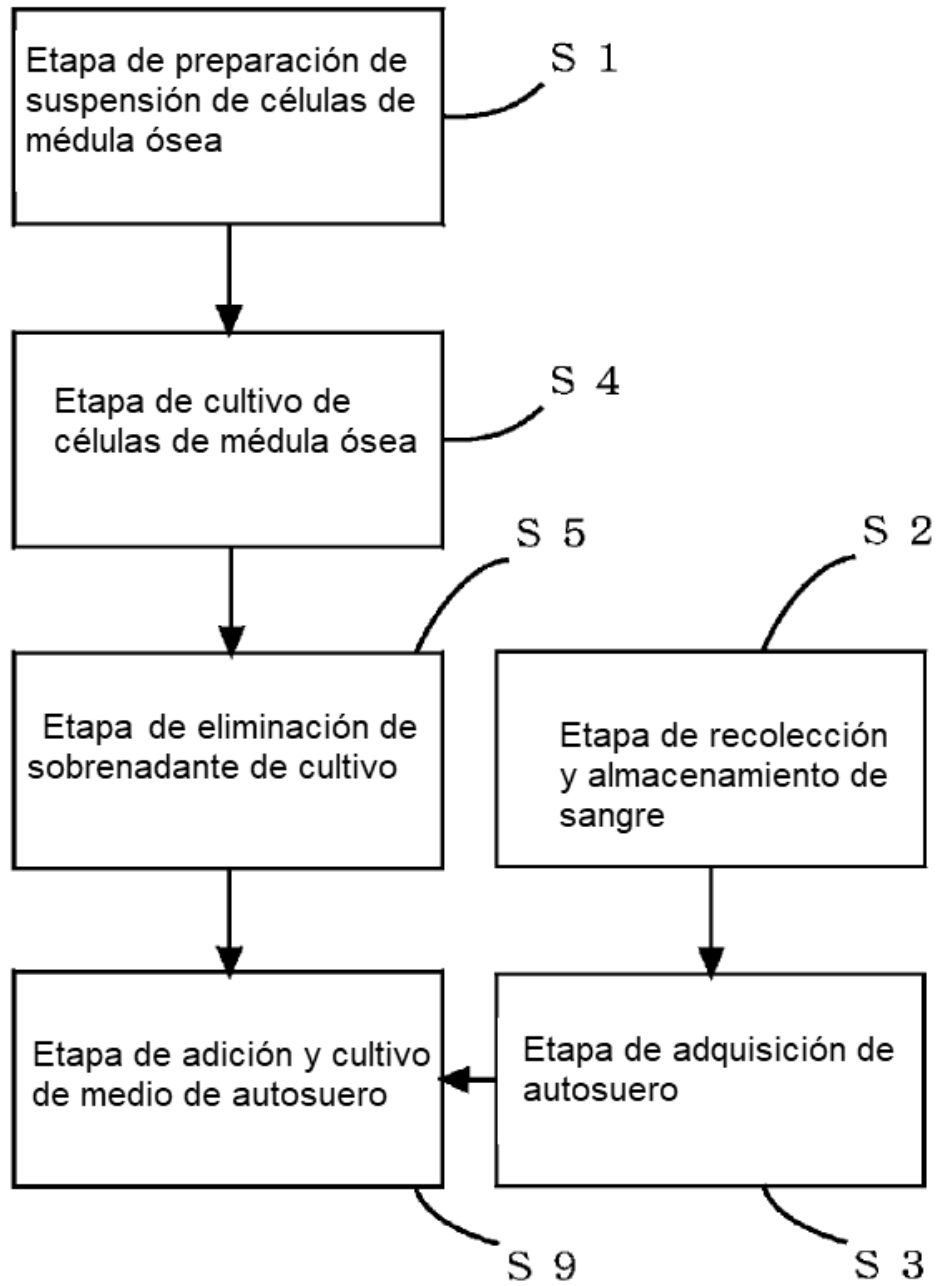


Fig. 11

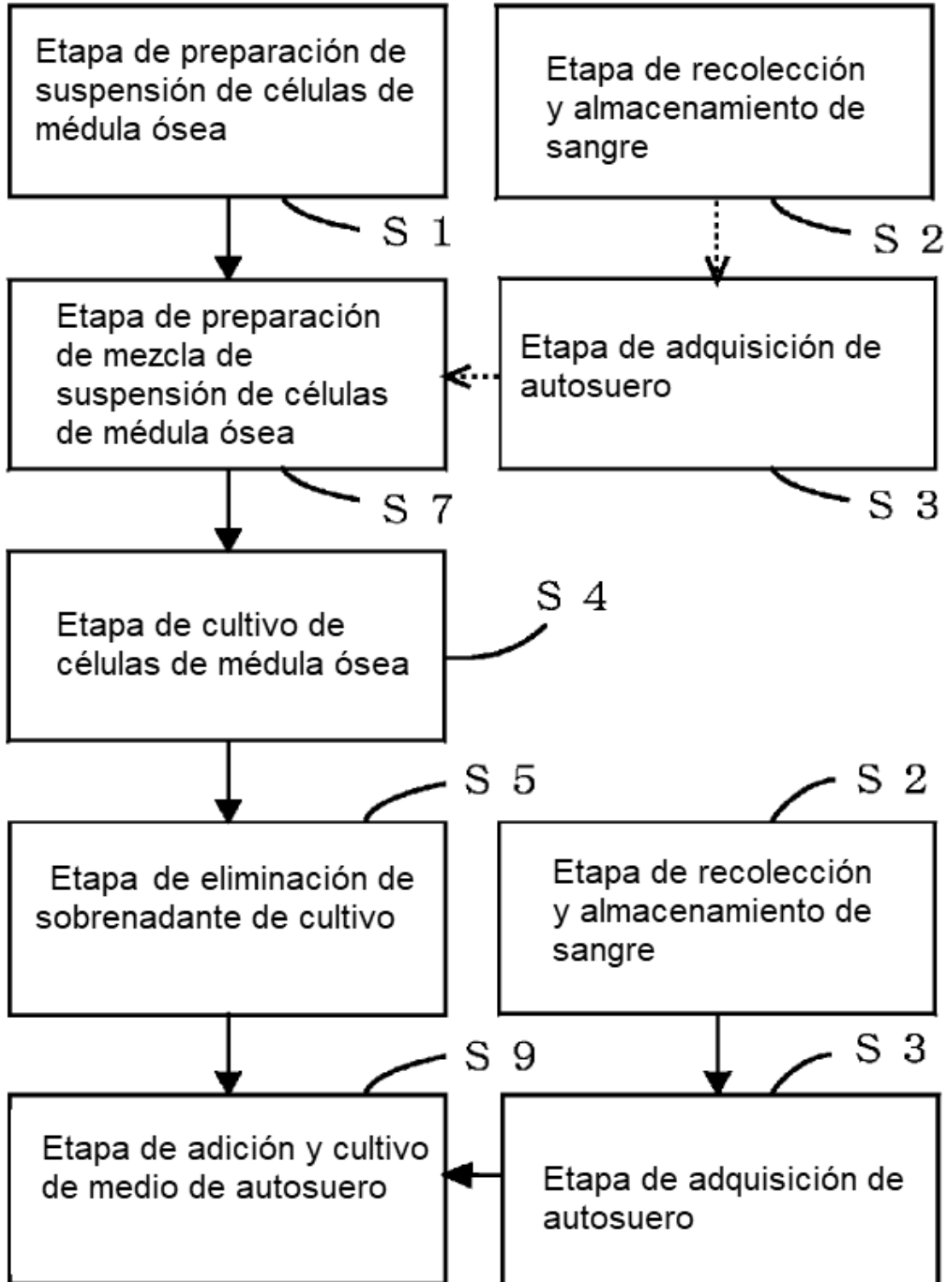




Fig. 12

