



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 689**

51 Int. Cl.:
C12N 5/0775 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05754073 .4**

96 Fecha de presentación : **25.05.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1885382**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.02.2008**

54

Título: **Procedimiento de uso de células derivadas de tejido adiposo en el tratamiento de afecciones cardiovasculares.**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.09.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.09.2011

73

Titular/es: **CYTORI THERAPEUTICS, Inc.**
3020 Callan Road
San Diego, California 92121, US

72

Inventor/es: **Fraser, John, K.;**
Hedrick, Marc, H.;
Zhu, Min;
Strem, Brian, M.;
Daniels, Eric y
Wulur, Isabella

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 364 689 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

Procedimientos de uso de células derivadas de tejido adiposo en el tratamiento de afecciones cardiovasculares

Solicitudes relacionadas

5 La presente solicitud es una solicitud continuación en parte de la Solicitud de Estados Unidos N° 10/783.957 titulada
 PROCEDIMIENTOS DE USO DE CÉLULAS DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO EN EL TRATAMIENTO DE
 AFECCIONES CARDIOVASCULARES, presentada el 20 de febrero de 2004 (que reivindica beneficio de prioridad
 de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 60/449.279 titulada PROCEDIMIENTOS DE USO DE CÉLULAS
 10 DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO EN EL TRATAMIENTO DE AFECCIONES CARDIOVASCULARES, presentada
 el 20 de febrero de 2003 y la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 60/462.911 titulada PROCEDIMIENTOS DE
 USO DE CÉLULAS DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO EN EL TRATAMIENTO DE AFECCIONES
 15 CARDIOVASCULARES, presentada el 15 de abril de 2003) y una continuación en parte de la Solicitud de Estados
 Unidos N° 10/877.822: titulada SISTEMAS Y PROCEDIMIENTOS PARA SEPARAR Y CONCENTRAR CÉLULAS
 REGENERATIVAS DE TEJIDO, presentada el 25 de junio de 2004 (que reivindica beneficio de prioridad de la
 Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 60/496.467, titulada SISTEMAS Y PROCEDIMIENTOS PARA SEPARAR
 20 CÉLULAS DE TEJIDO ADIPOSO, presentada el 20 de agosto de 2003 y la Solicitud Provisional de Estados Unidos
 N° 60/482.820, titulada SISTEMAS Y PROCEDIMIENTOS PARA SEPARAR CÉLULAS DE TEJIDO ADIPOSO,
 presentada en 2003), ambas de las cuales son continuaciones en parte de la Solicitud de Estados Unidos N°
 10/316.127, presentada el 9 de diciembre de 2002, titulada SISTEMAS Y PROCEDIMIENTOS PARA TRATAR
 PACIENTES CON CÉLULAS LIPOASPIRADAS PROCESADAS (que reivindica beneficio de prioridad de la Solicitud
 Provisional de Estados Unidos N° 60/338.856, presentada el 7 de diciembre de 2001).

Antecedentes de la invención

1. Campo de la Invención

25 La presente invención se refiere, en general a células regenerativas derivadas de tejido adiposo y más
 particularmente, a células regenerativas derivadas de tejido adiposo (por ejemplo, células progenitoras y madre
 derivadas de tejido adiposo), procedimientos de uso de células regenerativas derivadas de tejido adiposo,
 composiciones que contienen células regenerativas derivadas de tejido adiposo y sistemas para preparar y usar
 células regenerativas derivadas de tejido adiposo, que se usan para tratar enfermedades y trastornos
 cardiovasculares.

2. Descripción de la Técnica Relacionada

30 Las enfermedades y trastornos cardiovasculares son la causa principal de muerte y discapacidad en todas las
 naciones industrializadas. Solamente en los Estados Unidos, las enfermedades cardiovasculares son responsables
 de aproximadamente el 40 por ciento de la tasa de mortalidad y afectan a 58 millones de americanos (American-
 Heart-Association, 2002). Uno de los principales factores que hacen a las enfermedades cardiovasculares
 35 particularmente devastadoras es la incapacidad del corazón para repararse después de daño. Puesto que las
 células musculares cardíacas son incapaces de dividirse y repoblar áreas de daño, la pérdida de células cardíacas
 como resultado de lesión o enfermedad es en gran medida irreversible (Abbate y col., 2002; Remme, 2000).

40 De las formas disponibles de terapia, los trasplantes de corazón de ser humano a ser humano han sido las más
 eficaces en el tratamiento de enfermedades y trastornos cardiovasculares graves. De hecho, la tasa de
 supervivencia a un año y cinco años del receptor de trasplante cardíaco medio está actualmente por encima del 70
 por ciento. Desafortunadamente, sin embargo, el trasplante es una forma gravemente limitada de terapia por varias
 razones, en concreto, la escasez de donantes adecuados, el coste del procedimiento y la alta probabilidad de
 rechazo de trasplante y problemas asociados tales como infecciones, disfunción renal y cánceres relacionados con
 inmunosupresión (American-Heart-Association, 2002).

45 Una alternativa a la terapia de trasplante es el uso de medicina regenerativa para reparar y regenerar células
 musculares cardíacas dañadas. La medicina regenerativa aprovecha, de una manera dirigida clínicamente, la
 capacidad de las células madre (es decir, las células maestras no especializadas del cuerpo) para renovarse
 indefinidamente y desarrollarse a células especializadas maduras. Las células madre se encuentran en embriones
 durante las etapas tempranas del desarrollo, en tejido fetal y en algunos órganos y tejidos adultos (Pera y col.,
 2000). Se sabe que las células madre embrionarias (denominadas en lo sucesivo en el presente documento "ESC")
 50 se convierten en todas las células y tipos tisulares del cuerpo. Las ESC no solamente contienen toda la información
 genética del individuo sino que también contienen la capacidad nata de convertirse en cualquiera de las más de 200
 células y tejidos del cuerpo. Por lo tanto, estas células tienen tremendo potencial para la medicina regenerativa. Por
 ejemplo, las ESC pueden cultivarse a tejidos específicos tales como corazón, pulmón o riñón que podrían usarse
 después para reparar órganos dañados y enfermos (Assady y col., 2001; Jacobson y col., 2001; Odorico y col.,
 2001). Sin embargo, los tejidos derivados de ESC tienen limitaciones clínicas. Puesto que las ESC derivan
 55 necesariamente de otro individuo, es decir, un embrión, existe un riesgo de que el sistema inmune del receptor
 rechace el nuevo material biológico. Aunque los fármacos inmunosupresores para evitar dicho rechazo están
 disponibles, se sabe que tales fármacos bloquean respuestas inmunes deseables tales como contra infecciones

bacterianas y virus. Además, el debate ético sobre la fuente de las ESC, es decir, embriones, está bien documentado y presenta un obstáculo adicional y, quizás, insuperable para el futuro próximo.

Las células madre adultas (denominadas de forma intercambiable en los sucesivos en el presente documento "ASC") representan una alternativa al uso de ESC. Las ASC residen de forma silenciosa en muchos tejidos no embrionarios, supuestamente esperando a responder a traumatismo u otros procesos de enfermedad destructivos de modo que puedan curar el tejido dañado (Arvidsson y col., 2002; Bonner-Weir y Sharma, 2002; Clarke y Frisen, 2001; Crosby y Strain, 2001; Jiang y col., 2002a). Notablemente, las pruebas científicas emergentes indican que cada individuo porta un grupo de ASC que puede compartir con las ESC la capacidad de convertirse en muchos si no en todos los tipos de células y tejidos (Young y col., 2001; Jiang y col., 2002a; Jiang y col., 2002b; Schwartz y col., 2002). Por lo tanto, las ASC, como las ESC, tienen enorme potencial para aplicaciones clínicas de medicina regenerativa.

Se ha mostrado que las poblaciones de ASC están presentes en uno o más de médula ósea, piel, músculo, hígado y cerebro (Jiang y col., 2002b; Alison, 1998; Crosby y Strain, 2001). Sin embargo, la frecuencia de ASC en estos tejidos es baja. Por ejemplo, la frecuencia de células madre mesenquimales en médula ósea se estima entre 1 en 100.000 y 1 en 1.000.000 de células nucleadas (D'Ippolito y col., 1999; Banfi y col., 2001; Falla y col., 1993). De forma similar, la extracción de ASC de la piel implica una serie complicada de etapas de cultivo celular durante varias semanas (Toma y col., 2001) y la aplicación clínica de ASC derivadas de músculo esquelético requiere una fase de cultivo de dos o tres semanas (Hagege y col., 2003). Por lo tanto, cualquier aplicación clínica propuesta de ASC a partir de tales tejidos requiere aumentar el número de células, pureza y madurez por procedimientos de purificación celular y cultivo celular.

Aunque las etapas de cultivo celular pueden proporcionar números de células, pureza y madurez aumentados, lo hacen con un coste. Este coste puede incluir una o más de las siguientes dificultades técnicas: pérdida de función celular debido al envejecimiento celular, pérdida de poblaciones de células no madre potencialmente útiles, retardos en la aplicación potencial de células a los pacientes, coste monetario aumentado y riesgo aumentado de contaminación de células con microorganismos ambientales durante el cultivo. Recientes estudios que examinan los efectos terapéuticos de ASC derivadas de médula ósea han usado esencialmente médula ósea completa para evitar los problemas asociados con cultivo celular (Horwitz y col., 2001; Orlic y col., 2001; Stamm y col., 2003; Strauer y col., 2002). Los beneficios clínicos, sin embargo, han sido subóptimos, un resultado casi con seguridad relacionado con la limitada dosis y pureza de ASC presente de forma inherente en la médula ósea.

Recientemente, se ha demostrado que el tejido adiposo es una fuente de ASC (Zuk y col., 2001; Zuk y col., 2002). A diferencia de médula ósea, la piel, el músculo, el cerebro y el hígado, el tejido adiposo es comparativamente fácil de recoger en cantidades relativamente grandes (Commons y col., 2001; Katz y col., 2001b). Además, se ha mostrado que las ASC derivadas de tejido adiposo poseen la capacidad de generar múltiples tejidos *in vitro*, incluyendo hueso, grasa, cartílago y músculo (Ashjian y col., 2003; Mizuno y col., 2002; Zuk y col., 2001; Zuk y col., 2002). Por lo tanto, el tejido adiposo representa una fuente óptima para ASC para su uso en medicina regenerativa. Los procedimientos adecuados para recoger ASC derivadas de tejido adiposo, sin embargo, son escasos en la técnica. Los procedimientos existentes padecen varios defectos. Por ejemplo, los procedimientos existentes carecen de la capacidad para acomodar de forma óptima un dispositivo de aspiración para retirada de tejido adiposo. Los procedimientos existentes también carecen de automatización parcial o completa de la recogida de la fase de tejido adiposo a través de procesamiento de fases de tejido (Katz y col., 2001a). Los procedimientos existentes carecen además de capacidad de volumen mayor de 100 ml de tejido adiposo. Los procedimientos existentes también carecen además de un sistema parcialmente o completamente cerrado para recoger la fase de tejido adiposo a través del procesamiento de fases de tejido. Finalmente, los procedimientos existentes carecen de disponibilidad de componentes para atenuar los riesgos conjuntos de contaminación cruzada de material de una muestra a otra. En resumen, los procedimientos de la técnica anterior para recoger ASC de tejido adiposo no superan las dificultades técnicas asociadas con recoger ASC de piel, músculo, hígado y cerebro descritas anteriormente.

En consecuencia, dado el tremendo potencial terapéutico de las ASC, existe una urgente necesidad en la técnica para un dispositivo, sistema o procedimiento para recoger ASC de tejido adiposo que produzca una población de ASC con rendimiento, consistencia y/o pureza aumentados y lo haga rápidamente y de forma fiable con una necesidad no existente o reducida de manipulación después de la extracción. De forma ideal, dicho dispositivo, sistema o procedimiento produciría ASC de una manera adecuada para colocación directa en un receptor. El acceso a dicho dispositivo, sistema o procedimiento en combinación con procedimientos y composiciones que usan ASC derivadas de tejido adiposo para el tratamiento de enfermedades y trastornos cardiovasculares revolucionaría el tratamiento de tales trastornos. Dada la prevalencia de enfermedad cardiovascular y la escasez de opciones de tratamientos actuales, dicho tratamiento se necesita de forma urgente.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a células regenerativas, por ejemplo, células progenitoras y madre adultas, que pueden usarse para el tratamiento de afecciones, enfermedades y trastornos cardiovasculares. La presente invención también se refiere a sistemas y procedimientos para separar y concentrar células regenerativas de tejido, por ejemplo, tejido adiposo. La presente invención se refiere adicionalmente a composiciones de células regenerativas para aplicaciones terapéuticas relacionadas con enfermedades cardiovasculares. En consecuencia,

en una realización general, la presente invención se refiere a composiciones, procedimientos y sistemas de uso de células regenerativas derivadas de tejido que se colocan directamente en un receptor junto con los aditivos necesarios para promover, originar o apoyar un beneficio terapéutico relacionado con enfermedades cardiovasculares.

- 5 En realizaciones específicas, las células regenerativas de la presente invención pueden usarse para tratar afecciones, enfermedades y trastornos cardiovasculares basándose en, por ejemplo, su capacidad para sintetizar y secretar factores de crecimiento que estimulan la formación de nuevos vasos sanguíneos, su capacidad para sintetizar y secretar factores de crecimiento que estimulan la supervivencia celular, proliferación y/o alteración de la respuesta a lesión de otras células, su capacidad para proliferar y/o diferenciarse en células que participan directamente en la formación de nuevos vasos sanguíneos, su capacidad para injertarse en miocardio dañado y alterar la formación de cicatrices (deposición de colágeno, degradación de colágeno y reticulación), su capacidad para proliferar y diferenciarse en cardiomiocitos o células musculares de tipo cardiomiocitos capaces de contribuir a la contractilidad miocárdica, su capacidad para proliferar y diferenciarse en células de miocardio, su capacidad para mejorar la perfusión y regenerar el miocardio dañado y su capacidad para evitar la progresión de hipertrofia (remodelación) después del infarto de miocardio.

Las células regenerativas administradas al paciente cardiaco pueden comprenderse de, por ejemplo, células madre, células progenitoras o una combinación de las mismas. En ciertas realizaciones, la administración de múltiples dosis y/o tipos de células regenerativas pueden requerirse para derivar un beneficio terapéutico. Además, aditivos tales como uno o más factores de crecimiento pueden administrarse con las células regenerativas. En una realización preferida, las células regenerativas se administran con factores de crecimiento angiogénicos, arteriogénicos y/o específicos cardiacos solos o en combinación con otros aditivos. Las células regenerativas también pueden administrarse con uno o más fármacos inmunosupresores.

Las vías de administración para las células regenerativas se conocen en la técnica e incluyen administración directa de las células al sitio de beneficio pretendido. Esto puede conseguirse por inyección directa en el miocardio a través de la superficie externa del corazón (epicárdica), inyección directa en el miocardio a través de la superficie interna (endocárdica) a través de inserción de una cánula adecuada, por infusión arterial o venosa (incluyendo mecanismos de flujo retrógrado) o por otros medios desvelados en el presente documento o conocidos en la técnica tales como inyección pericárdica. Las vías de administración conocidas para un experto en la materia incluyen, pero sin limitación, intravenosa, intracoronaria, endomiocárdica, epimiocárdica, intraventricular, de seno coronario retrógrado o intravenosa.

Antes de la administración a un paciente, las células regenerativas pueden dejarse crecer en cultivo celular para, por ejemplo, promover la diferenciación hacia un fenotipo cardiaco. Antes de la administración a un paciente, las células también podrían modificarse por transferencia génica de modo que se altere la expresión de uno o más genes, por ejemplo, un gen cardiaco, en las células regenerativas modificadas.

La presente invención también se refiere a sistemas y procedimientos altamente versátiles capaces de separar y concentrar las células regenerativas, por ejemplo, células madre y progenitoras, de un tejido dado que son adecuadas para reinfusión en un sujeto. En una realización preferida, el sistema se automatiza. El sistema de la presente invención generalmente incluye uno o más de una cámara de recogida, una cámara de procesamiento, una cámara de residuos, una cámara de salida y una cámara de muestra. Las diversas cámaras se acoplan entre sí mediante uno o más conductos de modo que los fluidos que contienen material biológico puedan pasar de una cámara a otra en una ruta cerrada, estéril de fluidos/tejidos. En ciertas realizaciones, la cámara de residuos, la cámara de salida y la cámara de muestra son opcionales. En una realización, el procedimiento completo de extracción de tejido a través del procesamiento y c del dispositivo en el receptor se realizaría completo en la misma instalación, de hecho, incluso en la misma sala del paciente sometido al procedimiento.

En consecuencia, en una realización, un procedimiento para tratar un trastorno cardiovascular en un paciente incluye las etapas de: a) proporcionar un sistema de retirada de tejido; b) retirar tejido adiposo de un paciente usando el sistema de retirada de tejido, teniendo el tejido adiposo una concentración de células regenerativas; c) procesar al menos una parte del tejido adiposo para obtener una concentración de células regenerativas distinta de la concentración de células regenerativas de tejido adiposo antes del procesamiento; y d) administrar las células regenerativas a un paciente sin retirar las células regenerativas del sistema de retirada del tejido antes de administrarse al paciente.

Cualquier característica o combinación de características descritas en el presente documento están incluidas dentro del alcance de la presente invención en tanto que las características incluidas en cualquier combinación tal no sean mutuamente incoherentes como resultará evidente a partir del contexto, la presente memoria descriptiva y el conocimiento de un experto habitual en la materia. Ventajas y aspectos adicionales de la presente invención resultarán evidentes en la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una ilustración de un sistema para separar y concentrar células regenerativas de tejidos que

incluye un conjunto de filtros.

La Figura 2 es una ilustración de un sistema similar a la Figura 1 que tiene una pluralidad de conjuntos de filtros en una configuración en serie.

5 La Figura 3 es una ilustración similar a la Figura 1 que tiene una pluralidad de conjuntos de filtros en una configuración paralela.

La Figura 4 es una ilustración de un sistema para separar y concentrar células regenerativas de tejido que incluye una cámara de centrifugación.

La Figura 5 es una vista en sección de una cámara de recogida que incluye un filtro prefijado utilizado en un sistema para separar y concentrar las células regenerativas del tejido.

10 La Figura 6 es una vista en sección de una cámara de procesamiento de un sistema para separar y concentrar células regenerativas de tejido utilizando un sistema de filtración percolativo.

La Figura 7 es una vista en sección de una cámara de procesamiento de un sistema para separar y concentrar células regenerativas utilizando un dispositivo de centrifuga para concentrar las células regenerativas.

La Figura 8 es otra vista en sección de la cámara de procesamiento de la Figura 7.

15 Las Figuras 9.1, 9.2 y 9.3 ilustran un componente de decantación en uso con el sistema de la invención.

La Figura 10 es una ilustración de un sistema para separar y concentrar células regenerativas de tejido utilizando presión de vacío para mover los fluidos a través del sistema. Puede construirse un sistema de vacío aplicando una bomba de vacío o una fuente de vacío a la salida del sistema, controlado a una velocidad predeterminada para arrastrar el tejido y el fluido, usando un sistema de válvulas, salidas de aire y abrazaderas para controlar la dirección y temporización del flujo.

20

La Figura 11 es una ilustración de un sistema para separar y concentrar células regenerativas de tejido utilizando presión positiva para mover los fluidos a través del sistema. Un sistema de presión positiva usa un medio mecánico tal como una bomba peristáltica para empujar o propulsar el fluido y tejido a través del sistema a una velocidad determinada, usando válvulas, grifos de cierre, salidas de aire y abrazaderas para controlar la dirección y temporización del flujo.

25

La Figura 12A ilustra un procedimiento de filtración en el que la corriente de suministro del fluido fluye tangencialmente a los poros del filtro.

La Figura 12B ilustra un procedimiento de filtración en el que la corriente de suministro del fluido fluye perpendicularmente a los poros del filtro.

30 La Figura 13 es una ilustración de un conjunto desechable ejemplar para un sistema de la invención.

La Figura 14 es una ilustración de un componente reutilizable ejemplar para un sistema de la invención.

La Figura 15A es una ilustración de un dispositivo ejemplar de la invención montado usando el conjunto desechable de la Figura 13 y un componente reutilizable de la Figura 14.

35 La Figura 15B es un diagrama de flujo que representa etapas preprogramadas ejemplares, implementadas a través de un programa informático, que controla las realizaciones automáticas de un sistema de la presente invención. Se muestran dos parámetros de procesamiento alternativos que indican la versatilidad del sistema.

Las Figuras 16A y 16B representan la expresión de proteína VEGF (5A) y PIGF (5B) por células regenerativas derivadas de tejido adiposo cultivadas.

40 La Figura 17 representa la detección de células progenitoras endoteliales dentro de poblaciones de células regenerativas derivadas de tejido adiposo.

Las Figuras 18A y 18B representan el desarrollo *in vitro* de estructuras vasculares en ratones tanto normales (7A) como tratados con estreptozotocina (7B).

45 La Figura 19 representa el aumento de la restauración media del flujo sanguíneo en ratones con isquemia de las extremidades posteriores tratados con células regenerativas derivadas de tejido adiposo en comparación con un control negativo.

Las Figuras 20A y 20B muestran que aumentar la dosis de células regenerativas derivadas de tejido adiposo mejora la supervivencia del injerto y la angiogénesis (20A) y representa la retención de la arquitectura de tejido adiposo en muestra de ensayo histológica (20B).

La Figura 21 representa la línea temporal histológica del injerto de células regenerativas derivadas de tejido adiposo derivado de donante en el área de miocardio infartado.

5 La Figura 22 representa tinción positiva doble para cadena pesada de miosina y betagalactosidasa. Las células remarcadas muestran tanto tinción de betagalactosidasa azul, lo que demuestra su origen de células de tejido adiposo de donante, como tinción marrón que indica la expresión de la cadena pesada de la proteína de músculo cardíaco miosina. Las células que muestran tinción tanto marrón como azul (como se indica por flechas) son células derivadas de tejido adiposo que han tomado el fenotipo de células de músculo cardíaco.

La Figura 23 representa grupos de células regenerativas derivadas de tejido adiposo derivado de donante en una región de miocardio infartado después de oclusión/lesión de reperfusión en la rata.

10 La Figura 24 representa una fracción de eyección significativamente mejorada a las doce semanas después del infarto de miocardio de ratas tratadas con células regenerativas derivadas de tejido adiposo en comparación con basadas en solución salina en análisis de eco y contractilidad.

15 La Figura 25 representa contractilidad de línea basal significativamente mejorada a las doce semanas después de infarto de miocardio de ratas tratadas con células regenerativas derivadas de tejido adiposo en comparación con basadas en solución salina en análisis de eco y contractilidad.

La Figura 26 representa relajación de línea basal significativamente mejorada a las doce semanas después del infarto de miocardio de ratas tratadas con células regenerativas derivadas de tejido adiposo en comparación con las basadas en solución salina en análisis de eco y contractibilidad.

20 La Figura 27 representa cambios en los parámetros de remodelación, es decir, grosor del tabique ventricular reducido, a las doce semanas después del infarto de miocardio de ratas tratadas con células regenerativas derivadas de tejido adiposo en comparación con solución salina.

La Figura 28 representa la prevención de la progresión de dilatación ventricular como resulta evidente en el grosor del tabique ventricular reducido (sístole) a las doce semanas después del infarto de miocardio de ratas tratadas con ADC en comparación con solución salina.

25 Las Figuras 29 y 30 representan la prevención de la progresión de dilatación ventricular como resulta evidente en el grosor de la pared posterior reducido tanto en diástole (Figura 29) como en sístole (Figura 30) a las doce semanas después del infarto de miocardio de ratas tratadas con células regenerativas derivadas de tejido adiposo en comparación con solución salina.

30 La Figura 31 representa un aumento significativo de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (LVEF) en cerdos en el grupo de infusión celular (3,0 % + 6,0 %, media DT) frente al grupo control (-9,0 % ± 5,0 %, p=0,01). LVEF por cineangiografía (n=12) mostró una tendencia similar con valores de 3,7 % ± 5,0 % frente a -2,0 % ± 7,5 %, respectivamente (p=0,16).

Descripción detallada de la invención

35 La presente invención proporciona sistemas y procedimientos para tratar afecciones, enfermedades y trastornos cardiovasculares usando células regenerativas derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células madre y progenitoras. Específicamente, la presente invención demuestra que las células regenerativas derivadas de tejido adiposo de la invención (1) expresan factores de crecimiento angiogénico y arteriogénico, incluyendo PIGF, VEGF, bFGF, **IGF-II**, Eotaxina, G-CSF, GM-CSF, IL-12 p40/p70, IL-12 p70, IL-13, IL-6, IL-9, Leptina, MCP-1, M-CSF, MIG, PF-4, TIMP-1, TIMP-2, TNF- α , y Trombopoyetina, (2) comprenden células progenitoras endoteliales (EPC) que tienen una función bien establecida en la formación de vasos sanguíneos, (3) se desarrollan a vasos sanguíneos *in vitro* y (4) soportan la supervivencia del tejido isquémico *in vivo*. (2) contienen células progenitoras endoteliales (EPC) que tienen una función bien establecida en la formación de vasos sanguíneos, (3) se desarrollan a vasos sanguíneos *in vitro*. (4) soportan la supervivencia del tejido isquémico *in vivo*, (5) restauran la perfusión después de oclusión/lesión de reperfusión de las extremidades posteriores, (6) cuando se inyectan en animales después de lesión cardíaca se dirigen al corazón, (7) cuando se inyectan en animales después de una lesión cardíaca se diferencian en células que expresan marcadores coherentes con su diferenciación a miocitos cardíacos o células de tipo miocito cardíaco, (8) mejoran la perfusión después del infarto de miocardio en modelos quirúrgicos de isquemia de extremidades posteriores en ratones, (9) evitan la progresión de la remodelación y (10) mejoran la función en modelos animales pequeños y grandes de infarto de miocardio. En consecuencia, la presente divulgación demuestra que las células regenerativas de la presente invención son útiles para el tratamiento de enfermedades y trastornos cardiovasculares.

Para que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, se definen primero ciertos términos. Se exponen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

55 Como se usa en el presente documento, "células regenerativas" se refiere a cualquier célula heterogénea u homóloga obtenida usando los sistemas y procedimientos de la presente invención que provocan o contribuyen a la

regeneración completa o parcial, restauración o sustitución de estructura o función de un órgano, tejido o unidad fisiológica o sistema para proporcionar de este modo un beneficio terapéutico, estructural o cosmético. Los ejemplos de células regenerativas incluyen: células madre adultas, células endoteliales, células precursoras endoteliales, células progenitoras endoteliales, macrófagos, fibroblastos, pericitos, células de músculo liso, preadipocitos, adipocitos diferenciados o desdiferenciados, queratinocitos, células precursoras y progenitoras unipotentes y multipotentes (y sus descendientes), linfocitos, neutrófilos, histiocitos (macrófagos tisulares), células relacionadas con sistema linfático, neuronas, células precursoras neuronales y células de Schwann.

Un mecanismo por el que las células regenerativas pueden proporcionar un beneficio terapéutico, estructural o cosmético es incorporándose ellas mismas o su descendencia en tejidos o componentes tisulares de nueva generación, existentes o reparados. Por ejemplo, las ASC y/o su descendencia pueden incorporarse en el hueso, músculo u otro tejido estructural o funcional de nueva generación y provocar o contribuir de este modo a una mejora terapéutica, estructural o cosmética. De forma similar, las células endoteliales o células progenitoras o precursoras endoteliales y su descendencia pueden incorporarse en vasos sanguíneos de nueva generación, reparados o expandidos para provocar o contribuir de este modo a un beneficio terapéutico, estructural o cosmético.

Otro mecanismo por el que las células regenerativas pueden proporcionar un beneficio terapéutico, estructural o cosmético es expresando y/o secretando moléculas, por ejemplo, factores de crecimiento, que promuevan la creación, retención, restauración y/o regeneración de estructura o función de un tejido o componente de tejido dado. Por ejemplo, las células regenerativas pueden expresar y/o secretar moléculas que dan como resultado crecimiento potenciado de tejidos o células que participan después directa o indirectamente en la mejora de la estructura o función. Las células regenerativas pueden expresar y/o secretar factores de crecimiento, incluyendo, por ejemplo, Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), factor de Crecimiento Placentario (PIGF), bFGF, IGF-II, Eotaxina, G-CSF, GM-CSF, IL-12 p40/p70, IL-12 p70, IL-13, IL-6, IL-9, Leptina, MCP-1, M-CSF, MIG, PF-4, TIMP-1, TIMP-2, TGF- α , Trompoyetina y sus isoformas, que pueden realizar una o más de las siguientes funciones: estimular el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, es decir, promover la angiogénesis; mejorar el aporte de oxígeno de vasos sanguíneos pequeños preexistentes (colaterales) expandiendo su capacidad de transporte de sangre; inducir la movilización de células regenerativas de sitios distantes al sitio de lesión para mejorar de este modo la dirección y migración de tales células al sitio de lesión; estimular el crecimiento y/o promover la supervivencia de células dentro de un sitio de lesión promoviendo de este modo la retención de función o estructura; suministrar moléculas con propiedades antiapoptóticas reduciendo de este modo la probabilidad o tasa de muerte celular y pérdida permanente de función; e interactuar con células regenerativas endógenas y/u otros mecanismos fisiológicos.

Las células regenerativas pueden usarse en su forma "nativa" como está presente en o separarse y concentrarse del tejido usando los sistemas y procedimientos de la presente invención o pueden modificarse por estimulación o sensibilización con factores de crecimiento u otros modificadores de respuesta biológica, por transferencia génica (transferencia transitoria o estable), por subfraccionamiento adicional de la población resultante basándose en las propiedades físicas (por ejemplo tamaño o densidad), adherencia diferencial a un material de fase sólida, expresión de superficie celular o moléculas intracelulares, cultivo celular u otra manipulación, modificación o fraccionamiento *ex vivo* o *in vivo* como se describe adicionalmente en el presente documento. Las células regenerativas también pueden usarse en combinación con otras células o dispositivos tales como armazones sintéticos o biológicos, materiales o dispositivos que suministran factores, fármacos, agentes químicos u otros agentes que modifican o potencian las características relevantes de las células como se describe adicionalmente en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "composición de células regenerativas" se refiere a la composición de células típicamente presentes en un volumen de líquido después de que un tejido, por ejemplo, tejido adiposo, se lave y se disgregue al menos parcialmente. Por ejemplo, una composición de células regenerativas de la invención comprende múltiples tipos diferentes de células regenerativas, incluyendo ASC, células endoteliales, células precursoras endoteliales, células progenitoras endoteliales, macrófagos, fibroblastos, pericitos, células de músculo liso, preadipocitos, adipocitos diferenciados o desdiferenciados, queratinocitos, células precursoras o progenitoras unipotentes y multipotentes (y su descendencia) y linfocitos. La composición de células regenerativas también puede contener uno o más contaminantes, tales como colágeno, que pueden estar presentes en los fragmentos tisulares o colagenasa residual u otra enzima o agente empleado en, o que resulta del procedimiento de, disgregación tisular descrito en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "medicina regenerativa" se refiere a cualquier beneficio terapéutico, estructural o cosmético que deriva de la colocación, directa o indirectamente, de células regenerativas en un sujeto. Como se usa en el presente documento, la frase "afección, enfermedad o trastorno cardiovascular" pretende incluir todos los trastornos caracterizados por función cardíaca insuficiente, no deseada o anómala, por ejemplo, enfermedad cardíaca isquémica, enfermedad cardíaca hipertensiva y enfermedad cardíaca hipertensiva pulmonar, enfermedad valvular, enfermedad cardíaca congénita, cardiomiopatías tóxicas o infecciosas y cualquier afección que conduzca a insuficiencia cardíaca, por ejemplo, insuficiencia cardíaca congestiva, en un sujeto, particularmente un sujeto humano. La función cardíaca insuficiente o anómala puede ser el resultado de enfermedad, lesión y/o envejecimiento. Como fondo, una respuesta a lesión miocárdica sigue una ruta bien definida en la que algunas células mueren mientras otras entran en un estado de hibernación en el que aún no están muertas pero son disfuncionales. Esto se sigue de infiltración de células inflamatorias y una deposición de colágeno como parte de la cicatrización, todo lo cual sucede en paralelo con crecimiento interno de nuevos vasos sanguíneos y un grado de

muerte celular continuada. Como se usa en el presente documento, el término “isquemia” se refiere a cualquier isquemia tisular (por ejemplo, isquemia tisular localizada o isquemia tisular generalizada tal como en casos de choque) causada por la reducción del flujo de entrada de sangre y/o por la reducción del aporte de oxígeno y/u otros nutrientes. La expresión “isquemia miocárdica” se refiere a alteraciones circulatorias causadas por aterosclerosis coronaria y/o aporte de sangre, oxígeno y/o nutrientes inadecuado al miocardio. La expresión “infarto de miocardio” se refiere a una lesión isquémica a tejido miocárdico resultante de una falta de flujo sanguíneo. Específicamente, esta lesión resulta de un acontecimiento oclusivo (por ejemplo, trombótico o embólico) en la circulación coronaria y produce un ambiente en el que las necesidades metabólicas miocárdicas exceden el aporte de oxígeno y/o nutrientes al tejido miocárdico.

Como se usa en el presente documento, el término “angiogénesis” se refiere al procedimiento por el que se generan nuevos vasos sanguíneos a partir de vasculatura y tejido existentes (Folkman, 1995). El término “reparar” se refiere a la reformación de vasculatura y tejido dañados. El alivio de isquemia tisular depende de forma crítica de la angiogénesis. El crecimiento espontáneo de nuevos vasos sanguíneos proporciona circulación colateral en y alrededor de un área isquémica, mejora el flujo sanguíneo y alivia los síntomas causados por la isquemia. Como se usa en el presente documento, la expresión “factor angiogénico” o “proteína angiogénica” se refiere a cualquier proteína, péptido u otro agente conocido capaces de promover el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasculatura existente (“angiogénesis”). Los factores angiogénicos adecuados para su uso en la invención incluyen, pero sin limitación, Factor de Crecimiento Placentario (Luttun y col., 2002), Factor Estimulante de Colonia de Macrófagos (Aharinejad y col., 1995), Factor Estimulante de Colonia de Macrófagos y Granulocitos (Buschmann y col., 2003), Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEFG)-A, VEGF-A, VEGFB, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (Mints y col., 2002), neuropilina (Wang y col., 2003), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)-1, FGF-2(bFGF), FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6 (Bbttta y col., 2000), Angiopoyetina 1, Angiopoyetina 2 (Sundberg y col.; 2002), eritropoyetina (Ribatti y col., 2003), BMP-2, BMP-4, BMP-7 (Carano y Filvaroff, 2003), TGF-beta (Xiong y col., 2002), IGF-1 (Shigematsu y col., 1999), Osteopontina (Asou y col., 2001), Pleiotropina (Beecken y col., 2000), Activina (Lamouille y col., 2002), Endotelina-1 (Bagnato y Spinella, 2003) y combinaciones de los mismos. Los factores angiogénicos pueden actuar de forma independiente o en combinación entre sí. Cuando están en combinación, los factores angiogénicos pueden actuar de forma sinérgica, por lo que el efecto combinado de los factores es mayor que la suma de los efectos de los factores individuales tomados por separado. La expresión “factor angiogénico” o “proteína angiogénica” también abarca análogos funcionales de tales factores. Los análogos funcionales incluyen, por ejemplo, partes funcionales de los factores. Los análogos funcionales también incluyen anticuerpos antiidiotípicos que se unen a los receptores de los factores y, por lo tanto, imitan la actividad de los factores en la promoción de angiogénesis y/o reparación de tejidos. Los procedimientos para generar tales anticuerpos antiidiotípicos se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en el documento WO 97/23510.

Los factores angiogénicos usados en la presente invención pueden producirse u obtenerse a partir de cualquier fuente adecuada. Por ejemplo, los factores pueden purificarse a partir de sus fuentes nativas o producirse de forma sintética o por expresión recombinante. Los factores pueden administrarse a pacientes como una composición proteica. Como alternativa, los factores pueden administrarse en forma de un plásmido de expresión que codifica los factores. La construcción de plásmidos de expresión adecuados se conoce bien en la técnica. Los vectores adecuados para construir plásmidos de expresión incluyen, por ejemplo, vectores adenovirales, vectores retrovirales, vectores virales adenoasociados, vectores de ARN, liposomas, lípidos catiónicos, vectores y transposones lentivirales.

Como se usa en el presente documento, el término “arteriogénesis” se refiere al procedimiento de potenciar el crecimiento de arterias colaterales y/u otras arterias a partir de conexiones arteriolares preexistentes (Carmeliet, 2000; Scholz y col., 2001; Scholz y col., 2002). Más particularmente, la arteriogénesis es el reclutamiento *in situ* y expansión de arterias por proliferación de células de músculo liso y endoteliales a partir de conexiones arteriolares preexistentes que aportan sangre a tejido isquémico, tumor o sitio de inflamación. Estos vasos crecen principalmente fuera del tejido afectado y son importantes para el suministro de nutrientes al territorio isquémico, el tumor o el sitio de inflamación. La arteriogénesis es parte de la respuesta normal a isquemia miocárdica (Mills y col., 2000; Monteiro y col., 2003). Además, la técnica quirúrgica común de un injerto de derivación de la arteria coronaria (CABG) es, en efecto, no más que la creación de un vaso colateral artificial (Sergeant y col., 1997). Por lo tanto, los procedimientos que potencian la arteriogénesis después de un infarto mejorarán el flujo sanguíneo a tejido isquémico dando como resultado una reducción de la muerte celular y una reducción del tamaño del infarto. Estas mejoras darán como resultado función cardíaca mejorada y beneficio terapéutico.

Como se usa en el presente documento, “célula madre” se refiere a una célula regenerativa multipotente con el potencial para diferenciarse en una diversidad de otros tipos celulares, que realizan una o más funciones específicas y tienen la capacidad de autorrenovarse. Algunas de las células madres desveladas en el presente documento pueden ser multipotentes.

Como se usa en el presente documento “célula progenitora” se refiere a una célula regenerativa multipotente con el potencial para diferenciarse en más de un tipo celular y que tiene capacidad limitada o nula para autorrenovarse. “Célula progenitora”, como se usa en el presente documento, también se refiere a una célula unipotente con el potencial para diferenciarse en solo un tipo de célula sencillo, que realiza una o más funciones específicas y tiene una capacidad limitada o nula para autorrenovarse. En particular, como se usa en el presente documento, “célula

progenitora endotelial” se refiere a una célula multipotente o unipotente con el potencial para diferenciarse en células endoteliales vasculares.

5 Como se usa en el presente documento “célula precursora” se refiere a una célula regenerativa unipotente con el potencial para diferenciarse en un tipo celular. Las células precursoras y su descendencia pueden conservar capacidad proliferativa extensiva, por ejemplo, linfocitos y células endoteliales, que pueden proliferar en condiciones apropiadas.

10 Como se usa en el presente documento, “número de células madre” o “frecuencia de células madre” se refiere al número de colonias observadas en un ensayo clonogénico en el que las células derivadas de tejido adiposo (ADC), se siembran en placas a una densidad celular baja (<10.000 células/pocillo) y se cultivan en medio de crecimiento
15 después de lo cual los cultivos se tiñen con hematoxilina y las colonias de más de 50 células se cuentan como UFC-F. La frecuencia de células madre se calcula como el número de UFC-F observado por 100 células nucleadas sembradas en placas (por ejemplo; 15 colonias contadas en una placa iniciada con 1.000 células regenerativas nucleadas da una frecuencia de células madre de 1,5 %). El número de células madre se calcula como la frecuencia de células madre multiplicada por el número total de células ADC nucleadas obtenido. Un alto porcentaje (~100 %) de UFC-F crecidas a partir de células regenerativas expresan la molécula de superficie celular CD105 que también se expresa por células madre derivadas de médula ósea (Barry y col., 1999). CD105 también se expresa por células madre derivadas de tejido adiposo (Zuk y col., 2002).

20 Como se usa en el presente documento, la expresión “tejido adiposo” se refiere a grasa que incluye el tejido conectivo que almacena grasa. El tejido adiposo contiene múltiples tipos celulares regenerativos, incluyendo ASC y células progenitoras y precursoras endoteliales.

25 Como se usa en el presente documento la expresión “unidad de tejido adiposo” se refiere a una cantidad discreta o medible de tejido adiposo. Una unidad de tejido adiposo puede medirse determinando el peso y/o el volumen de la unidad. Basándose en los datos identificados anteriormente, una unidad de lipoaspirado procesado, según se retira de un paciente, tiene un componente celular en el que al menos 0,1 % del componente celular es células madre; es decir, tiene una frecuencia de células madre, determinada como se ha descrito anteriormente, de al menos 0,1 %. En referencia a la divulgación del presente documento, una unidad de tejido adiposo puede referirse a la cantidad completa de tejido adiposo retirada de un paciente o una cantidad que es menor que la cantidad completa de tejido
30 adiposo retirada de un paciente. Por lo tanto, una unidad de tejido adiposo puede combinarse con otra unidad de tejido adiposo para formar una unidad de tejido adiposo que tiene un peso o volumen que es la suma de las unidades individuales.

35 Como se usa en el presente documento, el término “parte” se refiere a una cantidad de un material que es menor que un todo. Una parte menor se refiere a una cantidad menor del 50 % y una parte principal se refiere a una cantidad mayor del 50 %. Por lo tanto, una unidad de tejido adiposo que es menor que la cantidad completa de tejido adiposo retirada de un paciente es una parte del tejido adiposo retirado.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión “lipoaspirado procesado” se refiere a tejido adiposo que se ha procesado para separar el componente celular activo (por ejemplo, el componente que contiene regenerativas) a partir de los adipocitos maduros y tejido conectivo. Esta fracción se denomina en el presente documento “células derivadas de tejido adiposo” o “ADC”. Típicamente, ADC se refiere al sedimento de células regenerativas obtenido por lavado y separación y concentración de las células de tejido adiposo. El sedimento se obtiene típicamente centrifugando una suspensión de células de modo que las células se agreguen en el fondo de una cámara de centrífuga o un concentrador celular.

45 Como se usa en el presente documento, los términos “administrar”, “introducir”, “suministrar”, “colocación” y “trasplante” se usan de forma intercambiable en el presente documento y se refieren a la colocación de las células regenerativas de la invención en un sujeto por un procedimiento o vía que da como resultado al menos localización parcial de las células regenerativas en un sitio deseado. Las células regenerativas pueden administrarse por cualquier ruta apropiada que da como resultado suministro a una localización deseada en el sujeto en la que al menos una parte de las células o componentes de las células siguen siendo viables. El periodo de viabilidad de las
50 células después de la administración a un sujeto puede ser desde unas pocas horas, por ejemplo, veinticuatro horas, hasta varios días, hasta tanto como varios años.

Como se usa en el presente documento, el término “tratar” incluye reducir o aliviar al menos un efecto adverso o síntoma de un trastorno o enfermedad.

55 Como se usa en el presente documento, “dosis terapéuticamente eficaz de células regenerativas” se refiere a una cantidad de células regenerativas que es suficiente para proporcionar un efecto clínico beneficioso o deseado. Dicha dosis podría administrarse en una o más administraciones. Sin embargo, la determinación precisa de lo que se consideraría una dosis eficaz puede basarse en factores individuales para cada paciente, incluyendo, pero sin limitación, la edad, talla del paciente, tipo o alcance de la enfermedad, etapa de la enfermedad, vía de

administración de las células regenerativas, tipo y alcance de la terapia complementaria usada, proceso de la enfermedad en curso y tipo de tratamiento deseado (por ejemplo, tratamiento agresivo frente a convencional).

Como se usa en el presente documento el término "sujeto" incluye animales de sangre caliente, preferentemente mamíferos, incluyendo seres humanos. En una realización preferida, el sujeto es un primate. En una realización aún más preferida, el sujeto es un ser humano.

Como se ha expuesto anteriormente en el presente documento, las células regenerativas, por ejemplo, células madre y progenitoras pueden recogerse de una amplia diversidad de tejidos. El sistema de la presente invención puede usarse para todos los tejidos tales. El tejido adiposo, sin embargo, es una fuente especialmente rica de células regenerativas. En consecuencia, el sistema de la presente invención se ilustra en el presente documento usando tejido adiposo como una fuente de células regenerativas solamente con ejemplo y sin limitación.

El tejido adiposo puede obtenerse por cualquier procedimiento conocido para un experto en la materia. Por ejemplo, el tejido adiposo puede retirarse de un paciente por liposucción (asistida por jeringa o electricidad) o por lipectomía, por ejemplo, lipoplastia asistida por succión, lipoplastia asistida por ultrasonidos y lipectomía de escisión o combinaciones de las mismas. El tejido adiposo se retira y se recoge y puede procesarse de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de un sistema de la invención descrito en el presente documento. La cantidad de tejido recogido depende de numerosos factores, incluyendo el índice de masa corporal y la edad del donante, el momento disponible para recogida, la disponibilidad de sitios de recogida de tejido adiposo accesibles, medicaciones y afecciones simultáneas y preexistentes (tales como terapia anticoagulante) y el propósito clínico para el que se recoge el tejido. Por ejemplo, el porcentaje de células regenerativas de 100 ml de tejido adiposo extraído de un individuo delgado es mayor que el extraído de un donante obeso (Tabla 1). Esto refleja probablemente un efecto de dilución del contenido graso aumentado en el individuo obeso. Por lo tanto, puede ser deseable, de acuerdo con un aspecto de la invención, obtener mayores cantidades de tejido de donantes con sobrepeso en comparación con las cantidades que podrían retirarse de pacientes más delgados. Esta observación también indica que la utilidad de la presente invención no está limitada a individuos con grandes cantidades de tejido adiposo.

Tabla 1: Efecto del Índice de Masa Corporal sobre la Producción de Células y Tejido

| Estado de Índice de Masa Corporal | Cantidad de Tejido Obtenido (g) | Producción de Células Regenerativas Total (x 10 ⁷) |
|-----------------------------------|---------------------------------|--|
| Normal | 641±142 | 2,1±0,4 |
| Obeso | 1,225±173 | 2,4±0,5 |
| p valor | 0,03 | 0,6 |

Después de que se haya procesado el tejido adiposo, las células regenerativas resultantes están sustancialmente sin adipocitos maduros y tejido conectivo. Por ejemplo, las células regenerativas resultantes pueden estar sustancialmente sin colágeno y componentes de matriz extracelular pero pueden comprender fibroblastos que están presentes en tejido conectivo. En consecuencia, el sistema de la presente invención genera una pluralidad heterogénea de células regenerativas derivadas de tejido adiposo que pueden usarse para investigación y/o fines terapéuticos. En una realización preferida, las células son adecuadas para colocación o reinfusión dentro del cuerpo de un receptor. En otras realizaciones, las células pueden usarse para investigación, por ejemplo, las células pueden usarse para establecer líneas de células madre o progenitoras que pueden sobrevivir durante periodos prolongados de tiempo y pueden usarse para estudios adicionales.

Se hará ahora referencia en detalle a la realización actualmente preferida de la invención, ejemplos de la cual se ilustran en los dibujos adjuntos. Siempre que sea posible, se usan los mismos números de referencia o similares en los dibujos y la descripción para referirse a las mismas o similares partes. Debería observarse que los dibujos están en forma simplificada y no están en escala precisa. En referencia a la divulgación del presente documento, para fines de conveniencia y claridad solamente, expresiones direccionales, tales como, parte superior, parte inferior, izquierda, derecha, arriba, abajo, sobre, por encima, debajo, por debajo, parte posterior, parte frontal, distal y proximal se usan con respecto a los dibujos adjuntos. No debería interpretarse que tales términos direccionales limitan el alcance de la invención de ninguna manera.

Aunque la divulgación del presente documento se refiere a ciertas realizaciones ilustradas, debe entenderse que estas realizaciones se presentan como ejemplo y no como limitación. La intención de la siguiente descripción detallada, aunque analiza realizaciones ejemplares, debe interpretarse que abarca todas las modificaciones, alternativas equivalentes de las realizaciones que puedan quedar dentro del espíritu y alcance de la invención según se define por las reivindicaciones adjuntas. La presente invención puede utilizarse junto con diversos procedimientos médicos que se usan convencionalmente en la técnica.

En referencia ahora a las Figuras, un sistema 10 de la presente invención generalmente está comprendido por una o

más de una cámara de recogida de tejidos 20, una cámara de procesamiento 30, una cámara de residuos 40, una cámara de salida 50 y una cámara de muestra 60. Las diversas cámaras están acopladas entre sí mediante uno o más conductos 12 de modo que los fluidos que contienen material biológico pueden pasar de una cámara a otra manteniendo a su vez una ruta de tejidos/fluidos estéril cerrada. Los conductos pueden comprender cuerpos rígidos o flexibles denominados de forma intercambiable en el presente documento lúmenes y tubos, respectivamente. En ciertas realizaciones, los conductos están en forma de tubos flexibles, tal como tubos de polietileno usados convencionalmente en situaciones clínicas, silicona o cualquier otro material conocido en la técnica. Los conductos 12 pueden variar en tamaño dependiendo de si se desea el paso de fluido o tejido. Los conductos 12 pueden también variar en tamaño dependiendo de la cantidad de tejido o fluido que se circula a través del sistema. Por ejemplo, para el paso de fluido, los conductos pueden tener un diámetro que varía de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 1,91 centímetros y para el paso del tejido los conductos pueden tener un diámetro que varía de 0,79 a 1,91 centímetros. Generalmente el tamaño de los conductos se selecciona para equilibrar el volumen que los conductos pueden acomodar y el tiempo requerido para transportar el tejido o los fluidos a través de dichos conductos. En realizaciones automáticas del sistema, los anteriores parámetros, es decir, volumen y tiempo para transporte, deben identificarse de modo que las señales apropiadas puedan transmitirse al dispositivo de procesamiento del sistema. Esto permite al dispositivo mover volúmenes precisos de líquido y tejido de una cámara a otra. Los tubos flexibles usados deberían ser capaces de soportar presión negativa para reducir la probabilidad de colapso. Los tubos flexibles usados deberían también ser capaces de soportar presión positiva que se genera, por ejemplo, por una bomba de desplazamiento positivo, que puede usarse en el sistema.

Todas las cámaras del sistema deben estar comprendidas de uno o más orificios, por ejemplo, salida 22 de orificios de entrada 21, que aceptan conexiones de tubos de succión, IV y jeringa convencionales. Los orificios pueden ser un orificio sellado tal como un orificio de acceso de aguja de jeringa cerrado con tabique de goma 51. Los orificios de entrada pueden estar acoplados a una o más cánulas (no mostradas) mediante conductos. Por ejemplo, un orificio de entrada de tejido 21 puede estar acoplado a una cánula de liposucción de uso único integrada y el conducto puede ser un tubo flexible. Los conductos se posicionan generalmente para proporcionar pasajes para el fluido de una cámara del sistema a otra. Para este fin, los conductos y orificios pueden estar acoplados a, por ejemplo, un dispositivo de succión (no mostrado) que puede manejarse manual o automáticamente. El dispositivo de succión puede, por ejemplo, ser una jeringa o una bomba eléctrica. El dispositivo de succión debería ser capaz de proporcionar suficiente presión negativa para aspirar el tejido de un paciente. Generalmente, cualquier dispositivo de succión adecuado conocido para un experto en la materia, por ejemplo, un cirujano, puede usarse.

Los conductos 12 pueden comprender adicionalmente una o más abrazaderas (no mostrado) para controlar el flujo de material a través de diversos componentes del sistema. Las abrazaderas son útiles para mantener la esterilidad del sistema sellando de forma eficaz diferentes regiones del sistema. Como alternativa, los conductos 12 pueden comprender una o más válvulas 14 que controlan el flujo de material a través del sistema. Las válvulas 14 se identifican como círculos abiertos en las Figuras. En realizaciones preferidas, las válvulas pueden ser válvulas de constricción electromecánica. En otra realización, las válvulas pueden ser válvulas neumáticas. En otras realizaciones más, las válvulas pueden ser válvulas hidráulicas o válvulas mecánicas. Tales válvulas se activan preferentemente por un sistema de control que puede acoplarse a palancas. Las palancas pueden manipularse manualmente de modo que se activen las palancas. En realizaciones automáticas, el sistema de control puede acoplarse a las palancas así como a un dispositivo de procesamiento que puede activar las válvulas en condiciones de activación predeterminadas. En ciertas realizaciones automatizadas, la activación de las válvulas puede estar parcialmente automatizada y parcialmente sujeta a las preferencias del usuario de modo que el procedimiento pueda optimizarse. En otras realizaciones más, ciertas válvulas pueden activarse manualmente y otras automáticamente a través del dispositivo de procesamiento. Las válvulas 14 pueden usarse también junto con una o más bombas, por ejemplo, bombas peristálticas 34 o bombas de desplazamiento positivo (no mostradas). Los conductos 12 y/o las válvulas 14 también pueden estar comprendidas de sensores 29, por ejemplo, sensores ópticos, sensores ultrasónicos, sensores de presión u otras formas de controles conocidas en la técnica que son capaces de distinguir entre los diversos componentes fluidos y niveles de fluidos que fluyen a través del sistema. En una realización preferida, los sensores 29 pueden ser sensores ópticos.

El sistema también puede incluir una pluralidad de filtros 36. En ciertas realizaciones, los filtros pueden estar dentro de una cámara del sistema 28. Diferentes cámaras dentro del sistema pueden estar comprendidas de diferentes filtros. Los filtros son eficaces para separar las células regenerativas, por ejemplo, células madre y/o células progenitoras, de células no deseables y agentes de disgregación que pueden usarse de acuerdo con el sistema. En una realización, un conjunto de filtros 36 incluye un dispositivo de filtración de fibra hueca. En otra realización, un conjunto de filtros 36 incluye un dispositivo de filtración percolativa, que puede o no usarse con un procedimiento de sedimentación. En una realización adicional, el conjunto de filtros 36 comprende un dispositivo de centrifugación, que puede o no usarse con un dispositivo y procedimiento de decantación. En otra realización más, el sistema comprende una combinación de estos dispositivos de filtración. Las funciones de nitración de la presente invención pueden ser dobles, retirando algunos filtros de la concentración final tales como colágeno, lípido libre, adipocitos libres y colagenasa residual y usándose otros filtros para concentrar el producto final. Los filtros del sistema pueden estar comprendidos de una pluralidad de poros que varían en diámetros y/o longitud de 20 a 800 μm . En una realización preferida, la cámara de recogida 20 tiene un filtro prefijado 28 con una pluralidad de poros que varían de 80 a 400 μm . En otra realización preferida, la cámara de recogida 20 tiene un filtro prefijado 28 con una pluralidad de

poros de 265 µm. En otras realizaciones, los filtros pueden ser desmontables y/o desechables.

El sistema también puede estar comprendido de uno más dispositivos de control de la temperatura (no mostrados) que se posicionan para ajustar la temperatura del material contenido dentro de una o más cámaras del sistema. El dispositivo de control de la temperatura puede ser un calefactor, un refrigerador o ambos, es decir, puede ser capaz de cambiar entre un calefactor y un refrigerador. El dispositivo de temperatura puede ajustar la temperatura de cualquiera de los materiales que pasan a través del sistema, incluyendo el tejido, los agentes de disgregación, los agentes de resuspensión, los agentes de aclarado, los agentes de lavado o los aditivos. Por ejemplo, el calentamiento del tejido adiposo facilita la disgregación mientras que el enfriamiento de la producción de células regenerativas es deseable para mantener la viabilidad. Además, si se necesitan reactivos precalentados para un procesamiento tisular óptimo, el papel del dispositivo de temperatura sería mantener la temperatura predeterminada en lugar de aumentar o reducir la temperatura.

Para mantener una ruta de fluido/tejidos estéril cerrada, todos los orificios y válvulas deben comprender un cierre que mantenga la configuración sellada del sistema. El cierre puede ser una membrana que sea impermeable a fluidos, aire y otros contaminantes o puede ser cualquier otro cierre adecuado conocido en la técnica. Además, todos los orificios del sistema pueden diseñarse de modo que puedan incorporar jeringas, agujas u otros dispositivos para retirar los materiales en las cámaras sin comprometer la esterilidad del sistema.

Como se expone en el presente documento, el tejido puede extraerse de un paciente mediante cualquier procedimiento reconocido en la técnica. El tejido aspirado puede extraerse antes de colocarse en el sistema para procesamiento. El tejido aspirado típicamente se transfiere a la cámara de recogida 20 a través de los conductos 12 mediante un orificio de entrada sellado, tal como un orificio de acceso de aguja de jeringa cerrado con tabique de goma (no mostrado en la cámara de recogida). Como alternativa, la etapa de extracción de tejido puede ser parte del sistema. Por ejemplo, la cámara de recogida 20 puede estar comprendida de una línea de vacío 11 que facilita la retirada del tejido usando una cánula convencional insertada en el paciente. De este modo, en esta realización, el sistema completo está unido al paciente. El tejido puede introducirse en la cámara de recogida 20 a través de un orificio de entrada 21 mediante un conducto tal como 12a que son parte de una ruta estéril cerrada. La cámara de recogida 20 puede estar comprendida de una pluralidad de recipientes o cilindros flexibles o rígidos o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la cámara de recogida 20 puede estar comprendida de uno o más recipientes rígidos de diversos tamaños. La cámara de recogida 20 también puede estar comprendida de una o más bolsas flexibles. En dichos sistemas, la bolsa se proporciona preferentemente con un soporte, tal como un marco interno o externo que ayuda a reducir la probabilidad de que la bolsa colapse tras la aplicación de succión a la bolsa. La cámara de recogida 20 se ajusta su tamaño para retener la cantidad requerida de solución salina para lavar de forma apropiada y disgregar el tejido antes de la etapa de lavado y concentración del procedimiento realizado en la cámara de procesamiento 30. Preferentemente, el volumen de tejido o fluido presente en la cámara de recogida 20 puede determinarse fácilmente con el ojo desnudo. Por ejemplo, para obtener células regenerativas de tejido adiposo, una cámara de recogida adecuada tiene la capacidad de retener 800 ml de lipoaspirado y 1200 ml de solución salina. En consecuencia, en una realización, la cámara de recogida 20 tiene una capacidad de al menos 2 litros. En otra realización, para separar y concentrar glóbulos rojos de la sangre, la cámara de recogida 20 tiene una capacidad de al menos 1,5 litros. Generalmente, el tamaño de la cámara de recogida 20 variará dependiendo del tipo y cantidad de tejido recogido del paciente. La cámara de recogida 20 puede seleccionarse por tamaño para retener desde aproximadamente 5 ml hasta aproximadamente 2 litros de tejido. Para volúmenes de tejido menores, por ejemplo, de 5 ml a 100 ml, el tejido puede acumularse en una jeringa antes de transferirlo a la cámara de recogida 20.

La cámara de recogida 20 puede construirse usando cualquier material biocompatible adecuado que pueda esterilizarse. En una realización preferida, la cámara de recogida 20 se construye de material disponible que cumple los requisitos de biocompatibilidad para el contacto intravascular como se describe en el patrón ISO 10993. Por ejemplo, puede usarse policarbonato acrílico o ABS. La ruta fluida de la cámara de recogida 20 es preferentemente sin pirógenos, es decir, adecuada para uso de sangre sin peligro de transmisión de enfermedades. En una realización, la cámara de recogida 20 se construye de un material que permite al usuario determinar visualmente el volumen aproximado de tejido presente en la cámara. En otras realizaciones, el volumen de tejido y/o fluido de la cámara de recogida 20 se determina por sensores automatizados 29. La cámara de recogida 20 se diseña preferentemente de modo que en una realización automática, el sistema pueda determinar el volumen de tejido y/o fluido dentro de la cámara con un grado razonable de precisión. En una realización preferida, el sistema percibe el volumen dentro de la cámara de recogida con una precisión de más o menos quince por ciento.

En una realización en particular proporcionada solamente como ejemplo, la cámara de recogida 20 está en forma de una cámara rígida, por ejemplo, una cámara construida de un policarbonato de uso médico que contiene un filtro prefijado aproximadamente cónico 28 de poliéster de uso médico con un tamaño de malla de 265 µm (véase Figura 5). El depósito de recogida de tejido rígido puede tener un tamaño de aproximadamente 20 centímetros de alto y aproximadamente 12,70 centímetros de diámetro, el grosor de la pared puede ser de aproximadamente 0,32 centímetros. Se puede acceder al interior del cilindro a través, por ejemplo, de uno o más orificios para los tubos de succión, uno o más orificios con tubos para conexión a través de tecnología de ensamblaje estéril y/o uno o más orificios para acceso de perforación con aguja a través de un tabique de goma. El filtro prefijado 28 en el interior de la cámara de recogida 20 se estructura preferentemente para conservar tejido adiposo y pasar tejido no adiposo a medida que, por ejemplo, los tejidos se retiran del paciente. De forma más específica, el filtro 28 puede permitir el

paso de lípido libre, sangre y solución salina, reteniendo a su vez fragmentos de tejido adiposo durante, o en otra realización después de, la recogida inicial del tejido adiposo. A este respecto, el filtro 28 incluye una pluralidad de poros, del mismo o diferentes tamaños, pero que varían en tamaño de aproximadamente 20 μm a 5 mm. En una realización preferida, el filtro 28 incluye una pluralidad de poros de 400 μm . En una realización preferida, el filtro 28 es una malla de poliéster de uso médico de aproximadamente 200 μm de grosor con un tamaño de poro de aproximadamente 265 μm y aproximadamente 47 % de área abierta. Este material retiene el tejido durante el aclarado pero permite que las células salgan a través de la malla después de la disgregación del tejido. De este modo, cuando los tejidos se aspiran del paciente, el tejido no adiposo puede separarse del tejido adiposo. La misma funcionalidad podría conseguirse con diferentes materiales, tamaño de malla y el número y tipo de orificios. Por ejemplo, los tamaños de poro de malla menores de 100 μm o de hasta varios miles de micrómetros conseguirían el mismo fin de permitir el pase de solución salina y células sanguíneas conservando a su vez agregados y fragmentos de tejido adiposo. De forma similar, el mismo fin podría conseguirse mediante el uso de un material de plástico rígido alternativo o mediante muchas otras modificaciones que se conocerían para los expertos en la materia.

El sistema 10 también puede estar comprendido de una o más fuentes de solución 22. La fuente de solución puede comprender una fuente de solución de lavado 23 y una fuente de agente de disgregación de tejido 24, tal como colagenasa. La cámara de recogida 20 está comprendida de rutas de fluido cerradas que permiten añadir las soluciones o agentes de lavado y disgregación al tejido de una manera aséptica.

Los depósitos para la solución de lavado 23 y los agentes de disgregación 24 puede ser cualquier depósito adecuado que pueda retener sus contenidos de una manera estéril, por ejemplo, una bolsa colapsable, tal como una bolsa de IV usada en situaciones clínicas. Estos depósitos pueden tener conductos 12, tales como conducto 12e, acoplados a la cámara de recogida 20 de modo que la solución de lavado y el agente de disgregación puedan suministrarse al interior de la cámara de recogida 20. La solución de lavado y el agente de disgregación pueden suministrarse al interior de la cámara de recogida 20 a través de cualquier manera reconocida en la técnica, incluyendo presión de gravedad sencilla aplicada al exterior de los depósitos para la solución salina 23 y/o los agentes de disgregación 24 o colocando una bomba de desplazamiento positivo en los conductos, por ejemplo, conducto 12d en la Figura 4. En las realizaciones automáticas, el dispositivo de procesamiento del sistema calcula diversos parámetros, por ejemplo, el volumen de solución salina y tiempo o número de ciclos requeridos para el lavado así como la concentración o cantidad de agente de disgregación y el tiempo requerido para la disgregación basándose en información inicialmente introducida por el usuario (por ejemplo, volumen de tejido que se procesa). Como alternativa, las cantidades, tiempos, etc. pueden manipularse manualmente por el usuario.

El tejido y/o fluido dentro de la cámara de recogida debería mantenerse a una temperatura que varía de 30 grados Celsius a 40 grados Celsius. En una realización preferida, la temperatura de la suspensión dentro de la cámara de recogida se mantiene a 37 grados Celsius. En ciertas realizaciones, si el procedimiento quirúrgico o la aplicación terapéutica necesitan retardarse, el tejido seleccionado puede almacenarse en la cámara de recogida para un uso posterior. El tejido puede almacenarse a o aproximadamente a temperatura ambiente o a aproximadamente 4 grados centígrados durante hasta 96 horas.

La solución de lavado puede ser cualquier solución conocida para un experto en la materia, incluyendo solución salina o cualquier otra solución de electrolitos tamponada o sin tamponar. Los tipos de tejido que se procesan dictarán los tipos o combinaciones de soluciones de lavado usadas. Típicamente, la solución de lavado, tal como solución salina, entra en la cámara de recogida 20 después de que el tejido adiposo se haya retirado del paciente y colocado en la cámara de recogida. Sin embargo, la solución de lavado puede suministrarse en la cámara de recogida 20 antes de que se extraiga el tejido adiposo, o puede suministrarse en la cámara de recogida 20 simultáneamente con el tejido adiposo. En la cámara de recogida 20, la solución de lavado y el tejido adiposo extraído pueden mezclarse por cualquier medio incluyendo los procedimientos descritos posteriormente.

Por ejemplo, el tejido puede lavarse por agitación (que maximiza la viabilidad celular y minimiza la cantidad de lípido libre liberado). En una realización, el tejido se agita rotando la cámara de recogida 20 completa a través de un arco de diversos grados (por ejemplo, a través de un arco de aproximadamente 45 grados a aproximadamente 90 grados) a diversas velocidades, por ejemplo, aproximadamente 30 revoluciones por minuto. En otras realizaciones, el tejido se agita rotando la cámara de recogida completa 20, en las que la cámara de recogida 20 está comprendida de una o más palas o protrusiones unidas de forma rígida a una superficie interior de la cámara de recogida a través de un arco de diversos grados (por ejemplo, a través de un arco de aproximadamente 45 grados a aproximadamente 90 grados) a diversas velocidades, por ejemplo, aproximadamente 30 revoluciones por minuto. La rotación de la cámara de recogida 20 descrita anteriormente puede conseguirse por un mecanismo de impulso unido a o en las proximidades de la cámara de recogida 20. El mecanismo de impulso puede ser una simple cinta o engranaje u otro mecanismo de impulso conocido en la técnica. La velocidad de la rotación puede ser, por ejemplo, 30 revoluciones por minuto. Generalmente, se ha descubierto que mayores velocidades generan volúmenes mayores de lípidos libres y pueden no ser óptimas.

En otras realizaciones, el tejido se agita colocando un eje rotatorio 25 dentro de la cámara de recogida 20, en las que el eje rotatorio está comprendido de una o más palas 25a o protrusiones unidas de forma rígida al eje rotatorio 25 que pasan a través de la mezcla a medida que se rota el eje. En ciertas realizaciones, el eje rotatorio 25 con palas 25a unidas de forma rígida puede reposar en el fondo de la cámara de recogida 20. Esto puede conseguirse,

por ejemplo, colocando el dispositivo de tipo pala en un campo magnético giratorio (por ejemplo, agitador magnético). Como alternativa, la agitación del tejido puede conseguirse usando un agitador sencillo conocido en la técnica, es decir un dispositivo que aplica agitación arriba y abajo sin rotación. El tejido también puede lavarse usando cualquier otro medio reconocido en la técnica incluyendo balanceo, agitación, inversión, etc.

5 Después de una cantidad deseada de ciclos de lavado, puede suministrarse un agente de disgregación de tejido a la cámara de recogida 20 para separar las células regenerativas de los componentes de tejido adiposo restantes. Este agente de disgregación puede ser cualquier agente de disgregación conocido para un experto en la materia. Los agentes de disgregación que pueden usarse incluyen proteasas neutras, colagenasa, tripsina, lipasa, hialuronidasa, desoxirribonucleasa, miembros de la familia de mezcla de enzimas Blendzyme, por ejemplo, Liberasa H1, pepsina, energía ultrasónica u otra física, láseres, microondas, otros dispositivos mecánicos y/o combinaciones de los mismos. Un agente de disgregación preferido de la invención es colagenasa. Los agentes de disgregación pueden añadirse con otras soluciones. Por ejemplo, solución salina, tal como solución salina suministrada a partir de una fuente de solución salina 23 como se ha descrito anteriormente, puede añadirse al tejido adiposo junto con o justo después de la adición de colagenasa. En una realización, el tejido adiposo lavado se mezcla con una solución de enzima que contiene colagenasa a o aproximadamente a 37 °C durante aproximadamente 20-60 minutos. En otras realizaciones, una concentración mayor de colagenasa o agente similar puede añadirse para reducir el tiempo de digestión. El tejido adiposo lavado y el agente de disgregación de tejido pueden después agitarse de manera similar a los procedimientos de agitación descritos anteriormente, hasta que se disgrega el tejido adiposo lavado. Por ejemplo, el tejido adiposo lavado y el agente de disgregación tisular puede agitarse rotando la cámara de recogida completa a través de un arco de aproximadamente 90 grados, teniendo un eje que contiene una o más palas que pasan a través de la solución a medida que el eje se rota y/o rotando la cámara de recogida completa que contiene palas o proyecciones en la superficie interior de la cámara de recogida.

Dependiendo del fin para el que se usarán las células derivadas de tejido adiposo, el tejido adiposo puede estar parcialmente disgregado o completamente disgregado. Por ejemplo, en realizaciones en las que las células derivadas de tejido adiposo deben combinarse con una unidad de tejido adiposo, puede ser deseable disgregar parcialmente el tejido adiposo recogido, retirar una parte del tejido adiposo disgregado parcialmente y después continuar disgregando la parte restante de tejido adiposo que queda en la cámara de recogida. Como alternativa, una parte del tejido adiposo lavado puede retirarse y apartarse en un depósito de muestras antes de cualquier digestión. En otra realización, el tejido adiposo recogido se disgrega parcialmente a células concentradas antes de reintroducirse en el paciente. En una realización, el tejido adiposo se mezcla con un agente de disgregación de tejido durante un periodo de tiempo generalmente menor de aproximadamente 20 minutos. Una parte del tejido disgregado parcialmente puede después retirarse de la cámara de recogida y el tejido disgregado parcialmente restante puede disgregarse adicionalmente mezclando el tejido adiposo con un agente disgregante de tejido durante otros 40 minutos. Cuando las células derivadas de tejido adiposo deben usarse como una población esencialmente pura de células regenerativas, el tejido adiposo puede disgregarse completamente.

Después de la digestión, se permite que reposen el tejido y la solución de agente disgregante durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que los componentes flotantes y no flotantes de la solución se diferencien dentro de la cámara de recogida. Típicamente, el tiempo varía de aproximadamente 15 segundos a varios minutos pero pueden implementarse otros tiempos en realizaciones modificadas. La capa flotante está comprendida de las células regenerativas que requieren lavado y concentración adicional. La capa no flotante comprende sangre, colágeno, lípidos y otros componentes celulares no regenerativos del tejido. La capa no flotante debe retirarse a la cámara de residuos.

En consecuencia, la cámara de recogida 20 está comprendida preferentemente de un orificio de salida 22 en el punto más inferior de la cámara de modo que la sangre y otros componentes no flotantes del tejido puedan drenarse a uno o más depósitos de residuos 40 mediante uno o más conductos 12. La cámara de recogida 20 está generalmente en (o puede colocarse en) una posición vertical de modo que los orificios de salida 22 se localicen en el fondo de la cámara de recogida. El drenaje puede ser pasivo o activo. Por ejemplo, los componentes no flotantes descritos anteriormente podrían drenarse usando gravedad, aplicando presión positiva o negativa, mediante el uso de bombas 34 o mediante el uso de salidas de aire 32. En realizaciones automáticas, el dispositivo de procesamiento puede señalar ciertas válvulas y/o bombas para drenar la capa no flotante de la cámara de recogida 20. Las realizaciones automáticas también pueden estar comprendidas de sensores 29 que pueden detectar cuando la interfaz entre los líquidos flotantes y no flotantes se ha alcanzado. Las realizaciones automáticas también pueden estar comprendidas de un sensor 29, por ejemplo, un sensor óptico, que puede ser capaz de detectar un cambio en la refracción de la luz del efluente que está fluyendo en el conducto que conduce fuera de la cámara de recogida. El cambio apropiado en la refracción de la luz puede señalar la presencia de la capa flotante en los conductos de salida que indica que la capa no flotante se ha drenado. El sensor 29 puede después señalar el dispositivo de procesamiento para proceder con la siguiente etapa.

En ciertas realizaciones sin embargo, el tejido puede procesarse para recuperar el componente de células no regenerativas del tejido. Por ejemplo, en ciertas aplicaciones terapéuticas o de investigación, pueden desearse colágeno, proteínas, componentes de la matriz o del estroma, lípidos, adipocitos u otros componentes del tejido. En tales realizaciones, es la capa flotante que comprende las células regenerativas la que debe retirarse como se ha descrito anteriormente a la cámara de residuos. La capa no flotante se conserva después en el sistema para

procesamiento adicional según se requiera.

Una vez que se ha retirado la capa no flotante, la capa flotante que comprende las células regenerativas puede lavarse una o más veces para retirar contaminantes residuales. En consecuencia, la cámara de recogida 20 típicamente incluye uno o más orificios 21 para permitir que la solución de lavado se suministre al interior de la cámara y uno o más orificios 22 para permitir que los residuos y otros materiales se dirijan fuera de la cámara de recogida 20. Por ejemplo, la cámara de recogida puede incluir uno o más orificios de entrada sellados como se ha descrito en el presente documento. La cámara de recogida 20 también puede incluir uno o más tapones (no mostrados), tal como un tapón superior y un tapón inferior para asegurar adicionalmente que el sistema sigue siendo estéril mientras se suministra la solución de lavado a la cámara de recogida y/o se transportan fuera los residuos. Los orificios 21 pueden proporcionarse en los tapones de la cámara de recogida o en una pared lateral de la cámara de recogida.

El procedimiento de lavado con solución de lavado fresca puede repetirse hasta que el contenido residual de contaminantes no flotantes en la solución alcance un nivel predeterminado. En otras palabras, el material restante en la cámara de recogida 20, que comprende el material flotante de la mezcla descrita anteriormente, incluyendo fragmentos de tejido adiposo, puede lavarse una o más veces adicionales hasta que la cantidad de material no deseado se reduce a un nivel predeterminado deseado. Un procedimiento para determinar el punto final del lavado es medir la cantidad de glóbulos rojos en la solución del tejido. Esto puede conseguirse midiendo la luz absorbida en la longitud de onda 540 nm. En una realización preferida, se considera aceptable un intervalo entre aproximadamente 0,546 y aproximadamente 0,842.

Durante el lavado y/o disgregación, pueden añadirse uno o más aditivos a los diversos depósitos según se necesite para mejorar los resultados. Algunos ejemplos de aditivos incluyen agentes que optimizan el lavado y la disgregación, aditivos que potencian la viabilidad de la población de células activas durante el procesamiento, agentes antimicrobianos (por ejemplo antibióticos), aditivos que lisan adipocitos y/o glóbulos rojos o aditivos que enriquecen las poblaciones celulares de interés (por adherencia diferencial a restos de fase sólida o para promover de otro modo la reducción sustancial o enriquecimiento de poblaciones celulares). Otros posibles aditivos incluyen los que promueven la recuperación y viabilidad de células regenerativas (por ejemplo, inhibidores de caspasa) o que reducen la probabilidad de la reacción adversa en infusión o emplazamiento (por ejemplo, inhibidores de reagregación de células o tejido conectivo).

Después de que haya pasado un tiempo de reposo suficiente, la fracción no flotante de la mezcla resultante de fragmentos de tejido adiposo lavados y agentes de disgregación de tejidos contendrán células regenerativas, por ejemplo, células madre y otras células progenitoras derivadas de tejido adiposo. Como se ha analizado en el presente documento, la fracción no flotante que contiene las células regenerativas se transferirá a la cámara de procesamiento 30 en la que las células regenerativas de interés, tales como las células madre derivadas de tejido adiposo, se separarán de otras células y materiales presentes en la fracción no flotante de la mezcla. Esta fracción no flotante se denomina en el presente documento la composición de células regenerativas y comprende múltiples tipos diferentes de células, incluyendo células madre, células progenitoras, células precursoras endoteliales, adipocitos y otras células regenerativas descritas en el presente documento. La composición de células regenerativas también puede contener uno o más contaminantes, tales como colágeno y otras proteínas de tejido conectivo y fragmentos de las mismas, que estaban presentes en los fragmentos de tejido adiposo o colágeno residual del procedimiento de disgregación de tejidos.

La cámara de procesamiento 30 de la invención se posiciona preferentemente dentro del sistema de modo que la composición de células regenerativas se mueve de la cámara de recogida 20 a la cámara de procesamiento 30 mediante el tubo 12, las válvulas 14 y la bomba 34 de una manera estéril. Se ajusta el tamaño de la cámara de procesamiento para acomodar mezclas de tejido/fluido que varían de 10 ml a 1,2 l. En una realización preferida, se ajusta el tamaño de la cámara de procesamiento para acomodar 800 ml. En ciertas realizaciones, la composición de células regenerativas completa de la cámara de recogida 20 se dirige a la cámara de procesamiento 30. Sin embargo, en otras realizaciones, una parte de la composición de células regenerativas se dirige a la cámara de procesamiento 30 y otra parte se dirige a una región diferente del sistema, por ejemplo, la cámara de muestra 60; para recombinarse con células procesadas en la cámara de procesamiento 30 en un momento posterior.

La cámara de procesamiento 30 puede construirse usando cualquier material biocompatible adecuado que pueda esterilizarse. En una realización preferida, la cámara de procesamiento 30 está construida de material desechable que cumple los requisitos de biocompatibilidad para contacto intravascular, como se describe en el patrón ISO 10993. Por ejemplo, pueden usarse policarbonato, acrílico, ABS, vinil acetato de etileno o copolímeros de estireno-butadieno (SBC). En otra realización, la ruta fluida de la cámara de procesamiento desechable es sin pirógenos. La cámara de procesamiento puede estar en forma de una bolsa de plástico, tal como las usadas convencionalmente en el procesamiento de sangre en los bancos de sangre; o en otras realizaciones, puede ser estructuralmente rígida (Figura 6). En una realización, la cámara de procesamiento 30 puede ser similar a la cámara de procesamiento desvelada en la Solicitud de Estados Unidos del mismo solicitante N° 10/316.127, presentada el 7 de diciembre de 2001 y la Solicitud de Estados Unidos N° 10/325.728 presentada el 20 de diciembre de 2002.

La cámara de procesamiento 30 puede construirse de cualquier manera adecuada para separar y concentrar las

células, incluyendo filtración y centrifugación y/o combinaciones de las mismas. En ciertas realizaciones, la composición de células regenerativas de la cámara de recogida 20 se introduce en la cámara de procesamiento 30 en la que la composición puede filtrarse para separar y/o concentrar una población de células regenerativas particular. La filtración de células es un procedimiento para separar componentes particulares y células de otros componentes o tipos diferentes de células. Por ejemplo, la composición de células regenerativas de la invención comprende múltiples tipos diferentes de células, incluyendo células madre, células progenitoras y adipocitos, así como uno o más contaminantes, tales como colágeno, que estaba presente en los fragmentos de tejido adiposo, o colagenasa residual del procedimiento de disgregación tisular. Los filtros 36 presentes en la cámara de procesamiento 30 pueden permitir la separación y concentración de una subpoblación particular de células regenerativas, por ejemplo, células madre o células progenitoras endoteliales, etc.

Algunas variables que están asociadas con filtración de células de un líquido incluyen, pero sin limitación, tamaño del poro del medio de filtro, geometría (forma) del poro, área de superficie del filtro, dirección del flujo de la solución que se filtra, presión transmembrana, dilución de la población de células particular, tamaño y forma de las partículas así como tamaño de las células y viabilidad de las células. De acuerdo con la divulgación del presente documento, las células particulares que se desean separar o filtrar son típicamente células madre derivadas de tejido adiposo. Sin embargo, en ciertas realizaciones, las células particulares pueden incluir células progenitoras derivadas de tejido adiposo, tales como células precursoras endoteliales, solas o en combinación con las células madre.

La composición de células regenerativas puede dirigirse a través de un conjunto de filtros, tal como conjunto de filtros 36. En ciertas realizaciones, el conjunto de filtros 36 comprende una pluralidad de filtros que se estructuran para realizar diferentes funciones y separar la composición de células regenerativas en distintas partes o componentes. Por ejemplo, uno de los filtros puede configurarse para separar colágeno de la composición de células regenerativas, uno de los filtros puede configurarse para separar adipocitos y/o componentes lipídicos de la composición de células regenerativas y uno de los filtros puede configurarse para separar enzimas residuales, tales como el agente de disgregación de tejidos, de la composición de células regenerativas. En ciertas realizaciones, uno de los filtros es capaz de realizar dos funciones, tales como separar colágeno y el agente de disgregación de tejidos de la composición. La pluralidad de filtros se disponen típicamente en serie; sin embargo, al menos una parte de los filtros puede disponerse en paralelo también. Una disposición en serie de los filtros del conjunto de filtros 36 se muestra en la Figura 2. Una disposición paralela de los filtros del conjunto de filtros 36 se muestra en la Figura 3.

En una realización, el conjunto de filtros 36 comprende un primer filtro, un segundo filtro y un tercer filtro. El primer filtro se configura para retirar partículas de colágeno presentes en la composición de células regenerativas. Estas partículas de colágeno son aproximadamente típicamente de 0,1 micrómetros de diámetro y pueden ser de hasta 20 micrómetros de largo. Las partículas de colágeno pueden ser de diversos tamaños dependiendo de la digestión. También pueden ser fibrillas, lo que significa que tienen giros y vueltas. Cualquiera de los filtros descritos en el presente documento puede prepararse a partir de polietersulfona, poliéster, PTFE, polipropileno, PVDF o posiblemente celulosa. Existen dos posibilidades para filtrar el colágeno. Una es intentar retirar las partículas mayores primero, dejando las células atravesar, lo que requeriría por ejemplo un filtro probablemente en el intervalo de 10 micrómetros. El segundo procedimiento es usar un tamaño de filtro menor, tal como 4,5 micrómetros, con la intención de que el colágeno se digiera bien, de modo que atrape las células y deje pasar el colágeno. Esto requeriría un medio para hacer flotar las células de vuelta fuera del filtro. También puede existir la posibilidad de implementar un filtro que atraería y retendría las fibras de colágeno.

El segundo filtro se configura para retirar los adipocitos inmaduros libres que no son flotantes en la composición de células regenerativas. En una realización, el segundo filtro puede construirse de poliéster y tener un tamaño de poro entre aproximadamente 30 y aproximadamente 50 micrómetros con un tamaño de poro preferido de aproximadamente 40 micrómetros. Aunque conocido como un segundo filtro, la colocación de un dispositivo tal puede ser en una primera, en lugar de segunda, posición para facilitar una retirada inicial de células y partículas mayores. El tercer filtro se configura para retirar la colagenasa no usada o residual u otro agente de disgregación de tejido presente en la composición. En una implementación preferida, la colagenasa puede degenerar a lo largo del tiempo. En una realización, el tercer filtro comprende una pluralidad de poros que tienen un diámetro o longitud menor de 1 μm . En ciertas realizaciones, los poros pueden tener diámetros que son menores de 1 μm . En otras realizaciones, los poros tienen diámetros entre 10 μm y 5 micrómetros. En ciertas realizaciones, el tercer filtro puede configurarse para concentrar la población de células regenerativas en un volumen pequeño de solución salina u otra solución de lavado, como se ha analizado en el presente documento. Como se prefiere en la actualidad, solamente el filtro final es la unidad de fibra hueca, no es necesario que ninguno de los filtros sea del tipo de fibra hueca. La unidad de fibra hueca se usa para el filtro final en una implementación preferida debido que es la más eficaz para retirar la colagenasa con el efecto perjudicial más pequeño para las células regenerativas. En una realización en la que el dispositivo es una colección de artículos disponibles para la venta, los tres filtros están en alojamientos separados. Es factible tener el primer y segundo filtros combinados en un alojamiento si se usa una unidad de fibra hueca para el tercer filtro. Si el filtro final no es una preparación de fibra hueca entonces los tres filtros pueden contenerse en un alojamiento. Los filtros del conjunto de filtros 36 pueden localizarse en la cámara de procesamiento 30 o pueden proporcionarse como componentes separados de la cámara de procesamiento 30. Además, los filtros del conjunto de filtros 36 pueden proporcionarse en cámaras de procesamiento múltiples o en una disposición intercalada. En ciertas realizaciones, los conductos o tubos pueden actuar como una cámara o

cámaras de procesamiento. La cámara de procesamiento puede reducirse en tamaño de modo que se convierta en el volumen interior de los conductos que conectan los filtros. Este tipo de sistema funcionará correctamente si se ajusta el tamaño del volumen de solución de tejido de forma apropiada. De este modo, los conductos pueden actuar como la cámara de procesamiento conteniendo el fluido con células a medida que se pasa a través de los filtros.

5 Puede tenerse cuidado de minimizar el volumen de los conductos de modo que las células/tejido no se pierdan innecesariamente en el procedimiento de llenado y ejecución del sistema.

En referencia a la realización anteriormente descrita, la composición de células regenerativas, que contiene las células lavadas y colágeno residual, adipocitos y/o agentes de disgregación de tejido no digerido, puede dirigirse a través del primer filtro para retirar al menos una parte de y preferentemente y sustancialmente todas las partículas de colágeno de la composición de modo que estén presentes menos partículas de colágeno, y preferentemente ninguna, en la solución filtrada. La composición de células regenerativas filtrada que contiene los adipocitos y/o agente de disgregación de tejido no digerido, puede dirigirse después a través del segundo filtro para retirar al menos una parte de y preferentemente sustancialmente todos los adipocitos libres de la composición de células regenerativas filtrada. Posteriormente, la composición de células regenerativas filtrada dos veces, que contiene el agente de disgregación de tejido no digerido, puede dirigirse a través del tercer filtro, tal como un dispositivo de filtración de fibra hueca, como se ha analizado en el presente documento, para retirar o reducir el agente de disgregación de tejido no digerido de la composición de células regenerativas.

La composición de células regenerativas filtrada tres veces (es decir, la composición que permanece después de haberse pasado a través del primer, segundo y tercer filtros) puede después dirigirse a múltiples salidas, que pueden incluir una parte de la cámara de procesamiento 30 que comprende múltiples salidas. Estas salidas pueden servir para mantener la presión necesaria, así como para proporcionar conexiones mediante conductos a otros depósitos que pueden incluir la cámara de recogida 20, la cámara de salida 50 y/o el depósito de residuos 40.

En una realización, un filtro del conjunto de filtros 36 comprende un miembro de filtración de fibra hueca. O, en otras palabras, el filtro comprende una colección de tubos huecos formados con los medios de filtro. Los ejemplos de medios de filtro que pueden usarse con el sistema desvelado 10 incluyen polisulfona, polietersulfona o un material de éster mezclado y similares. Estas fibras huecas o tubos huecos de medios de filtro pueden estar contenidos en un cartucho cilíndrico del conjunto de filtros 36. Los tubos individuales o fibras de medios de filtro típicamente tienen un diámetro interior que varía de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1 mm con un valor preferido de aproximadamente 0,5 mm. El diámetro y longitud de un cartucho cilíndrico adecuado determinará el número de tubos individuales de medio de filtro que puede colocarse dentro del cartucho. Un ejemplo de un cartucho de filtro de fibra hueca adecuado es el Filtro de Flujo Tangencial FiberFlo®, n° de catálogo M-C-050-K (Minntech, Minneapolis, Minnesota). Los tamaños de poro de los medios de filtro pueden variar de aproximadamente 10 kilo Dalton y aproximadamente 5 micrómetros con un tamaño de poro preferido de aproximadamente 0,5 micrómetros.

En el filtro de fibra hueca, cada tubo hueco tiene un cuerpo con un primer extremo, un segundo extremo y un lumen localizado en el cuerpo y que se extiende entre el primer extremo y el segundo extremo. El cuerpo de cada tubo hueco incluye una pluralidad de poros. Los poros generalmente están orientados en el cuerpo de modo que se filtre una composición de células regenerativas fluyendo a través del lumen del cuerpo y los productos a filtrar pasan tangencialmente a través de los poros, como se muestra en la Figura 12A. En otras palabras, las partículas más pequeñas en el líquido pasan tangencialmente a través de los poros en relación con el flujo del fluido a través del lumen del cuerpo. La composición con las células regenerativas pasa a través del lumen de cada tubo hueco cuando la composición se filtra. Preferentemente, el flujo de la composición es tangencial a los poros del cuerpo de cada tubo hueco.

Usando un flujo tangencial de fluido, la eficacia de filtración de las células madre puede potenciarse en relación con otras técnicas de filtración. Por ejemplo, de acuerdo con algunas técnicas de filtración, los poros de los medios de filtro se colocan de tal manera que el filtro se oriente perpendicular al flujo del fluido de modo que los medios de filtro bloqueen la ruta del fluido que se filtra, como se ilustra en la Figura 12B. En este tipo de filtración, las partículas que se separan por filtración de la composición de células regenerativas, por ejemplo las células madre, tienden a acumularse en un lateral del filtro y bloquean el flujo del fluido a través de los poros. Este bloqueo puede reducir la eficacia del filtro. Además, las células se comprimen constantemente por la presión del flujo del fluido así como por el peso de las células que se acumulan en el lado corriente arriba del filtro. Esto puede conducir a una lisis aumentada de las células madre. Por lo tanto, en dichas técnicas de filtración en las que el flujo de fluido es paralelo a la orientación de los poros en el filtro, tanto las células grandes como las partículas pequeñas pueden dirigirse de forma indeseable contra los medios de filtro a medida que el fluido pasa a través de los poros. En consecuencia, productos mayores en el líquido tales como células pueden bloquear los poros, reduciendo de este modo el efecto de filtrado y aumentando una aparición de ruptura celular o lesión.

Por el contrario, en la configuración de fibra hueca del presente sistema 10, el fluido que se filtra fluye dentro del lumen del tubo hueco. La parte del fluido que tiene la capacidad de pasar a través de los poros del cuerpo del filtro lo hace con la ayuda de la presión positiva del fluido en el interior del cuerpo así como una presión negativa que se aplica en el exterior del cuerpo. En esta realización, las células típicamente no están sometidas a la presión del flujo del fluido o al peso de otras células y por lo tanto, las fuerzas de cizallamiento sobre las células madre se reducen. De este modo, la eficiencia y eficacia de la filtración puede mejorarse por la reducción en las tasas de obstrucción y

la reducción en la lisis de células regenerativas. Debido al tamaño de la solución salina y las moléculas proteicas no deseadas, durante la filtración, estas moléculas y otros componentes pequeños pasan a través de los poros de los cuerpos de los tubos huecos hacia el exterior de los tubos huecos y se dirigen al depósito de residuos 40. En una realización, la filtración se potencia por generación de un vacío en el exterior de los medios de filtro de tubo hueco.

5 Debido al tamaño de las células regenerativas, por ejemplo, células madre o células progenitoras, estas células típicamente no pueden pasar a través de los poros del cuerpo y por lo tanto permanecen en el interior del filtro de tubo hueco (por ejemplo, en los lúmenes de los tubos) y se dirigen hacia atrás a la cámara de procesamiento 30 mediante un conducto entre el filtro y la cámara de procesamiento o a la cámara de salida 50.

10 En una realización específica, el filtro de fibra hueca tiene un tamaño de poro de aproximadamente 0,05 micrómetros y contiene aproximadamente 550 cm² de área de superficie de medios de filtro. Un tubo de medio individual típicamente tiene un diámetro de aproximadamente 0,5 mm. En el procesamiento de 130 ml de la composición de células regenerativas, aproximadamente 120 ml de solución salina adicional pueden añadirse a la composición. El tiempo de procesamiento o filtrado puede ser de aproximadamente 8 minutos. El diferencial de las presiones en ambos lados del cuerpo del tubo de fibra hueca (por ejemplo, la presión dentro del lumen del cuerpo y fuera del

15 cuerpo) se considera la presión transmembrana. La presión transmembrana puede variar de aproximadamente 133 Pa a aproximadamente 66,5 kPa con una presión preferida de aproximadamente 26,60 kPa. La recuperación y viabilidad de células nucleadas media usando filtración de fibra hueca puede ser de aproximadamente el 80 % de células viables.

20 La cantidad de colagenasa que típicamente se retira en un sistema tal equivale a una reducción logarítmica de tres. Por ejemplo si la concentración inicial de colagenasa en la composición de células regenerativas que se transfiere desde la cámara de recogida a la cámara de procesamiento es de 0,078 U/ml la concentración de colagenasa de la composición de células regenerativas final sería de 0,00078 U/ml. La colagenasa se retira en el filtro de fibra hueca y el filtro de fibra hueca corresponde al tercer filtro analizado anteriormente.

25 Las cámaras de procesamiento que ilustran uno o más procedimientos de filtración de células descritos anteriormente se muestran en las figuras, particularmente en las Figuras 1-3. Con referencia a las Figuras 1-3, entre la cámara de procesamiento 30 y la cámara de filtrado del conjunto de filtros 36, puede proporcionarse una bomba, tal como una bomba 34. Además, pueden proporcionarse sensores de presión y salidas de aire, tales como salida de aire 32 y sensor de presión 39, en línea con la cámara de procesamiento 30 y el conjunto de filtros 36. También pueden proporcionarse adaptadores para la cámara de salida 50. Estos componentes opcionales (por ejemplo, la

30 bomba 34, la salida de aire 32, el sensor de presión 39 y los adaptadores para la cámara de salida 50) pueden proporcionarse entre la cámara de procesamiento 30 y el conjunto de filtros 36 de modo que el líquido contenido en la cámara de procesamiento 30 pueda fluir a uno o más de estos componentes opcionales antes de fluir a través del conjunto de filtros 36. Por ejemplo, el líquido puede fluir a través de la bomba 34 antes de pasarse al conjunto de filtros 36. O, el líquido puede pasar a través del sensor de presión 39 antes de pasar a través del conjunto de filtros

35 para obtener una presión de líquido antes del filtro en el sistema. En ciertas situaciones, uno o más de estos componentes también puede proporcionarse como un elemento de la cámara de procesamiento 30, tal como la salida de aire 32 como se ilustra en la Figura 6. En la realización ilustrada, el sensor de presión 39 está en línea para determinar la presión de la composición de células regenerativas que se genera por la bomba 34 a medida que entra en la cámara de filtrado del conjunto de filtros 36. Esta construcción puede facilitar el control de la presión transmembrana a través de la membrana de filtro. Puede añadirse solución salina adicional u otro tampón y solución de lavado a la composición de células regenerativas para ayudar en la retirada de proteínas no deseadas a medida que la composición se filtra a través del conjunto de filtros 36. Este lavado repetido puede realizarse múltiples veces para mejorar la pureza de las células regenerativas. En ciertas realizaciones, la solución salina puede añadirse en cualquier etapa que se considere necesaria para mejorar la filtración.

45 En una realización específica, que se proporciona como ejemplo pero sin limitación, las proteínas no deseadas y solución salina u otra solución de lavado se retiran de la siguiente manera: la composición con las células regenerativas, así como colágeno y partículas o fragmentos de tejido conectivo, adipocitos y colagenasa, circula a través de una serie de filtros hasta que se consigue un volumen mínimo. El volumen mínimo es una función del volumen retenido total del sistema y alguna constante predeterminada. El volumen retenido es el volumen de líquido

50 que está contenido en los tubos y conductos si todas las cámaras de procesamiento están vacías. En una realización, el volumen mínimo es 15 ml. Cuando se alcanza el volumen mínimo, se introduce un volumen predeterminado de solución de lavado en el sistema para mezclarse con la composición de células regenerativas. Esta mezcla de solución de lavado y la composición de células regenerativas circula después a través de los filtros hasta que se alcanza de nuevo un volumen mínimo. Este ciclo puede repetirse múltiples veces para mejorar la pureza de las células regenerativas o, en otras palabras, aumentar la relación de células regenerativas en la

55 composición con los otros materiales en la composición. Véase Figuras 10 y 11.

Después de haberse determinado que la composición de células regenerativas se ha limpiado de proteínas no deseadas y concentrado lo suficiente (en realizaciones ejemplares, pueden usarse concentraciones mínimas dentro de un intervalo de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 1×10^7 células/ml y, en una realización preferida la concentración mínima puede ser de aproximadamente 1×10^7 células/ml), una cámara de salida 50, tal como una

60 bolsa de salida, puede conectarse a un orificio de salida de la cámara de procesamiento 30 y/o el conjunto de filtros 36, dependiendo de la realización específica. Una salida de aire, tal como la salida de aire 32, puede después

abrirse para facilitar la salida de las células regenerativas concentradas. En una implementación, esta determinación de cuando se ha alcanzado una concentración mínima se realiza empíricamente después de haberse realizado experimentos y haberse programado en los controles electrónicos del dispositivo. La determinación puede ser una entrada en el procedimiento de lo que se desea producir, es decir, cuantas células madre/progenitoras se desean o intervalo de concentración celular. Basándose en datos científicos, se necesita obtener y colocarse en el sistema una cantidad predefinida de tejido adiposo para conseguir el rendimiento deseado. Con la salida de aire 32 abierta, una bomba, tal como la bomba 34, puede actuar para transferir las células regenerativas concentradas a la bolsa de salida. En una realización, la bolsa de salida 50 es similar a una bolsa de sangre vacía que tiene un tubo con un adaptador en un extremo. De un modo estéril, el adaptador en la bolsa de salida puede estar unido al orificio de salida y las células regenerativas concentradas pueden transferirse a la bolsa de salida.

Como se ilustra en las Figuras 1-3, una bomba de vacío 26 puede proporcionarse en el sistema 10 para cambiar la presión en el sistema, entre otras cosas. Por ejemplo, la bomba de vacío 26 puede acoplarse a la cámara de recogida 20 mediante un conducto, tal como un conducto 12b, para provocar un descenso en la presión dentro de la cámara de recogida 20. La bomba de vacío 26 también puede acoplarse a la cámara de procesamiento 30 por medio de un conducto, tal como conducto 12g. Con respecto al manejo de la bomba de vacío 26 en relación con la bomba 34, pueden implementarse dos fuentes o bombas de vacío separadas o puede implementarse una sola usando válvulas que dirigen la presión de vacío a los diferentes conductos que la necesitan en puntos específicos en el procedimiento. Además, la bomba de vacío 26 puede acoplarse al depósito de residuos 40 mediante un conducto, tal como conducto 12f.

Con referencia a las Figuras 10 y 11, la presión generada por la bomba de vacío 26 puede usarse para dirigir el flujo de los fluidos, incluyendo las células regenerativas, a través de los conductos 12. Esta presión puede proporcionarse en múltiples direcciones, por ejemplo, mediante control automático o manual de la posición de una o más válvulas 14 en el sistema 10. El sistema 10 puede prepararse para actuar de forma apropiada con el uso de presión positiva o a través del uso de presión negativa, o combinaciones de las mismas. Por ejemplo, las células regenerativas pueden arrastrarse a través del primer y segundo filtro descritos anteriormente a un depósito de laterales suaves que se conecta al tercer filtro. El depósito de laterales suaves puede estar conectado en línea (en serie) por delante del tercer filtro. La cámara de salida final puede ser un depósito de laterales suaves que está en el otro lado del tercer filtro (por ejemplo, en el lado corriente abajo). En esta realización, la presión se usa para mover las células regenerativas de un depósito de laterales suaves a un segundo depósito de laterales suaves a través del filtro.

En otra realización del sistema 10, la filtración de las células madre y/o células progenitoras derivadas de tejido adiposo puede conseguirse usando una combinación de filtración percolativa y sedimentación. Por ejemplo, un sistema tal usa solución salina que se pasa a través de una composición de células regenerativas de tejido (por ejemplo, la composición que contiene las células madre y/o células progenitoras derivadas de tejido adiposo) y después a través de un filtro. Algunas de las variables que se asocian con filtración percolativa de células a partir de una composición de células regenerativas incluyen, pero sin limitación, tamaño de poro del medio de filtro, geometría o forma del poro, área de superficie del filtro, dirección de flujo de la composición de células regenerativas que se filtra, caudal de la solución salina infundida, presión transmembrana, dilución de la población de células, tamaño y viabilidad de las células.

En una realización del sistema 10, la cámara de procesamiento 30 usa un conjunto de filtros 36 que implementa filtración percolativa y sedimentación para separar y concentrar las células regenerativas. Como ejemplo y no como limitación, la cámara de procesamiento 30 se define como un cuerpo generalmente cilíndrico que tiene una pared lateral 30a, una superficie superior 30b y una superficie interior 30c, como se muestra en la Figura 6. Se proporciona una salida de aire estéril 32 en la superficie superior 30b.

En la realización de la Figura 6, la cámara de procesamiento 30 se muestra incluyendo un conjunto de filtros 36, que incluye dos filtros, tales como filtro de poro grande 36a y filtro de poro pequeño 36b. Los tamaños de poro de los filtros 36a y 36b típicamente están en un intervalo entre aproximadamente $0,05 \mu\text{m}$ y aproximadamente $10 \mu\text{m}$. El filtro de poro grande 36a puede comprender poros con un diámetro de aproximadamente $5 \mu\text{m}$ y el filtro de poro pequeño 36b puede comprender poros con un diámetro de aproximadamente $1-3 \mu\text{m}$. En una realización, los filtros tienen un área de superficie de aproximadamente 785 mm^2 . Los filtros 36a y 36b dividen un interior de la cámara de procesamiento 30 para incluir una primera cámara 37a, una segunda cámara 37b y una tercera cámara 37c. Como se muestra en la Figura 6, la primera cámara 37a se localiza entre la segunda cámara 37b y la tercera cámara 37c. Además, la primera cámara 37a se muestra como la región de la cámara de procesamiento 30 que tiene un orificio de entrada 31 y un orificio de salida 31b. La cámara de procesamiento 30 incluye una pluralidad de orificios que proporcionan vías de comunicación desde un exterior de la cámara de procesamiento 30 al interior de la cámara de procesamiento 30, tales como orificios 31a, 31b y 31c. Los orificios 31a, 31b y 31c, se ilustran como dispuestos en la pared lateral 30a de un cuerpo de la cámara de procesamiento 30. Sin embargo, los orificios 31a, 31b y 31c pueden posicionarse en otras regiones también. El orificio 31a se ilustra como un orificio de entrada de muestra, que se construye para acoplarse a un conducto de modo que una composición que contiene células regenerativas pueda pasar al interior de la cámara de procesamiento 30. El orificio 31b se ilustra como un orificio de salida construido para acoplarse a un conducto de modo que las células concentradas y separadas puedan retirarse del interior de la cámara de procesamiento 30. El orificio 31c se ilustra como un orificio de entrada construido para acoplarse a un conducto para el suministro de una solución de lavado fresca, tal como solución salina en el interior de la cámara de

procesamiento 30.

En uso, las células regenerativas pueden introducirse en la cámara central 37a mediante el orificio de entrada 31a. La solución salina u otro tampón se introduce en la cámara inferior 37b a través del orificio de entrada 31c. La solución salina puede dirigirse a través de la composición de células regenerativas en la cámara 37a a una velocidad de aproximadamente 10 ml/min. El caudal de la solución salina es tal que contrarresta la fuerza de la gravedad. El flujo de solución salina proporciona a las células en la cámara la capacidad de separarse basándose en la densidad de las células. Típicamente, a medida que la solución salina se presiona a través de la composición las células mayores en la composición se asentarán en el fondo de la cámara central 37a y las proteínas y células menores se transportarán a través del segundo filtro 36b hacia la cámara superior 37c. Este filtrado se consigue ajustando el caudal de la solución salina de modo que las células mayores se hacen rotar en el sitio, lo que permite a las partículas más pequeñas liberarse y transportarse con la solución salina. La salida de aire 32 estéril está incluida en la cámara 30 para asegurar que el gradiente de presión correcto se mantiene en las tres cámaras dentro de la unidad de procesamiento. La cámara superior 37c puede comprender un medio absorbente 33. El propósito de los medios absorbentes es atrapar las proteínas no deseadas en la solución para asegurar que no cruzan el medio de filtro de vuelta hacia la solución de procesamiento si, por ejemplo, se reduce el caudal de solución salina. Un medio absorbente puede ser un tipo de material de filtro que es absorbente o atrae materiales o componentes para separarlos por filtrado. Puede añadirse un orificio de salida sobre el filtro superior para ayudar a quitar los residuos. Otra realización de esto puede ser aplicar un vacío suave desde la parte superior para ayudar a arrastrar los residuos. Pueden implementarse medios absorbentes cuando, como en la realización ilustrada, los caudales son relativamente pequeños. La solución salina y las proteínas en exceso se transportan después a un depósito de residuos.

Cuando las células mayores (por ejemplo, las células madre y/o células progenitoras derivadas de tejido adiposo) se han separado lo suficiente de células más pequeñas y proteínas, la composición que contiene las células separadas puede concentrarse, como se ha analizado en el presente documento. La composición puede concentrarse adicionalmente después de haberse retirado de la cámara 37a a través de el orificio de salida 31b o mientras está en la cámara 37a. En una realización, la concentración de células en la composición se aumenta de la siguiente manera. Después de que las células se hayan separado lo suficiente, los filtros, tales como filtros 36a y 36b, pueden moverse uno hacia el otro. Este movimiento tiene el efecto de reducir el volumen entre los dos filtros (por ejemplo, el volumen de la cámara 37a). También puede proporcionarse un miembro que vibra en conexión con la cámara de procesamiento 30 para facilitar la concentración de las células en la composición. En una realización, el miembro que vibra puede acoplarse al filtro 36b (por ejemplo, el filtro de poro pequeño). La vibración puede reducir la frecuencia de células atrapadas en los filtros. La reducción en el volumen de la composición permite que la solución salina en exceso se retire como residuos y las células se concentren en un volumen más pequeño.

En otra realización, la concentración de las células regeneradoras se consigue de la siguiente manera. Después de que las células se han separado lo suficiente, la composición de células regenerativas puede transferirse a otra cámara (no mostrada) que usa la gravedad para separar por filtrado la solución salina en exceso. En una realización preferida, la sedimentación puede producirse al mismo tiempo que la percolación. Esta sedimentación puede conseguirse introduciendo la composición sobre un filtro que tiene un tamaño de poro que varía de aproximadamente 10 kD a aproximadamente 2 micrómetros. En una realización, un filtro adecuado tiene un tamaño de poro de aproximadamente 1 micrómetro. La fuerza de la gravedad permitirá que la solución salina y las partículas más pequeñas pasen a través del filtro mientras se evita que las células en la composición fluyan a través del filtro. Después de que se haya obtenido la concentración deseada de células y después de que se hayan retirado las partículas más pequeñas filtradas de debajo del filtro, la composición de células regenerativas puede agitarse para retirar las células del filtro y, posteriormente, las células regenerativas concentradas pueden transferirse a la bolsa de salida. Las partículas más pequeñas pueden quitarse como residuos a través de una salida.

En una realización particular, la composición de células regenerativas de la cámara de recogida 20 se transporta a la cámara de procesamiento 30 en la que la composición puede centrifugarse para separar y concentrar las células regenerativas. Los principios de la centrifugación se conocen bien en la técnica y no se repetirán en el presente documento en aras de la brevedad. En el presente documento se utilizan dispositivos de centrifugación, componentes y parámetros reconocidos en la técnica convencionales. Un ejemplo de cámara de procesamiento para su uso como parte de un dispositivo de centrifuga se muestra en las Figuras 7 y 8. Típicamente, un dispositivo de centrifuga provoca que una cámara de centrifuga (tal como la mostrada en la Figura 7) gire alrededor de un eje para aumentar de este modo la fuerza sobre las células en la solución para que sea mayor que la de la gravedad. Los materiales más densos o más pesados en la solución típicamente se sedimentan en un extremo de la cámara de centrifuga, es decir, una cámara de salida 50 de la Figura 7, para formar un sedimento de células regenerativas. El sedimento puede después resuspenderse para obtener una solución con una concentración deseada de células y/o un volumen deseado de células y medio. La cámara de procesamiento mostrada en la Figura 7 se construye para separar y concentrar células usando fuerzas gravitacionales y centrífugas. Específicamente, durante la centrifugación, la fuerza centrífuga dirige a los componentes más densos de la composición de las células regenerativas, por ejemplo, las células regenerativas, hacia los extremos más exteriores de la cámara de centrifuga. A medida que la cámara de centrifuga se ralentiza y con el tiempo se detiene, la fuerza gravitacional ayuda a las células regenerativas a mantenerse en los extremos más exteriores de la cámara de centrifuga y formar un sedimento celular. En consecuencia, los componentes no deseados de la composición de células regenerativas, es

decir, los residuos, pueden retirarse sin alterar el sedimento celular.

En otra realización más de la invención, la cámara de procesamiento puede estar comprendida de un concentrador celular en forma de un filtro de membrana giratorio. En una realización adicional del procedimiento de centrifugación, también puede aplicarse decantación centrífuga. En esta realización, las células pueden separarse basándose en la tasa de sedimentación celular individual de modo que la fuerza direccional (por ejemplo, hacia fuera) aplicada por centrifugación provoca que las células y los solutos sedimenten a diferentes velocidades. En la decantación, la velocidad de sedimentación de la población de células diana se ve enfrentada a un caudal opuesto (por ejemplo, hacia dentro) aplicado por bombeo de solución en la dirección opuesta a la fuerza centrífuga. El contraflujo se ajusta de modo que las células y partículas dentro de la solución se separan. Se ha aplicado decantación en muchos casos de separación de células (Inoue, Carsten y col. 1981; Hayner, Braun y col. 1984; Noga 1999) y los principios y prácticas usados para optimizar los parámetros de flujo y centrifugación pueden aplicarse en el presente documento a la luz de la presente divulgación por un experto en la materia.

La Figura 9 ilustra principios asociados con una implementación de decantación de acuerdo con la presente invención. La realización de decantación puede ser similar a una implementación de centrifugación en tanto que se aplica una fuerza a la solución usando un rotor giratorio. Algunas de las variables que se asocian con la presente separación por decantación realizada incluyen, pero sin limitación, el tamaño y forma de la cámara giratoria, el diámetro del rotor, la velocidad del rotor, el diámetro de los tubos de contraflujo, el caudal del contraflujo, así como el tamaño y densidad de las partículas y células que van a retirarse de la solución. Como en la centrifugación, las células regenerativas pueden separarse basándose en densidades celulares individuales.

En una realización la composición de células regenerativas, por ejemplo, la solución que contiene las células regenerativas y la colagenasa, se introduce en una cámara de un rotor giratorio, como se muestra en la Figura 9.1. Después de añadirse la solución a la cámara se añade solución salina adicional a la cámara a un caudal predeterminado. El caudal de la solución salina puede determinarse como una función de la velocidad del rotor, el diámetro de las células y la constante de cámara que se ha establecido empíricamente. El caudal se controlará por ejemplo con un dispositivo similar a una bomba IV. Un propósito de la solución salina adicional es proporcionar una condición dentro de la cámara de rotor en la que las partículas mayores se moverán a un extremo de la cámara y las partículas más pequeñas se moverán al otro, como se ilustra en la Figura 9.2. El flujo se ajusta de modo que, en esta aplicación, las partículas más pequeñas salgan de la cámara y se muevan a un depósito de residuos, como se muestra en la Figura 9.3. Este movimiento da como resultado que la solución en la cámara del rotor tenga una población sustancialmente homogénea de células, tal como células madre. Después de que se haya determinado que las células madre se han separado del resto de los artículos en la solución (habiéndose retirado los lípidos libres y las proteínas no deseadas de la cámara), se detiene el contraflujo. Las células dentro de la cámara formarán entonces un sedimento concentrado en la pared exterior de la cámara. El contraflujo se invierte y el sedimento celular se transfiere a la bolsa de salida.

Como se ha expuesto anteriormente en el presente documento, la cámara de procesamiento 30 o la cámara de salida 50 puede incluir uno o más orificios, por ejemplo, orificios 51 ó 52. Uno más de estos orificios puede diseñarse para transportar las células regenerativas obtenidas usando cualquier combinación de procedimientos descritos anteriormente o un parte de los mismos, mediante conductos a otros dispositivos quirúrgicos, dispositivos de cultivo celular, dispositivos de marinamiento celular, dispositivos de terapia génica o dispositivos de purificación. Estos orificios también pueden diseñarse para transportar las células regenerativas mediante conductos a cámaras adicionales o depósitos dentro del sistema o con parte de otro sistema para los mismos fines descritos anteriormente. Los orificios y conductos también pueden usarse para añadir uno o más aditivos, por ejemplo, factores de crecimiento, fluidos de re-suspensión, reactivos de cultivo celular, reactivos de expansión celular, reactivos de conservación celular o reactivos de modificación celular que incluyen agentes que transfieren genes a las células. Los orificios y conductos también pueden usarse para transportar las células regenerativas a otras dianas tales como materiales de implante (por ejemplo, fragmentos de hueso o armazones) así como otros implantes y dispositivos quirúrgicos.

El procesamiento adicional de las células también puede iniciarse mediante la re-configuración de las interconexiones de los conjuntos disponibles del sistema existente, la reprogramación del dispositivo de procesamiento del sistema existente, proporcionando depósitos diferentes o adicionales y/o cámaras para el sistema existente, transportando las células a uno o más sistemas o dispositivos adicionales y/o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el sistema puede reconfigurarse por cualquiera de los medios descritos anteriormente de modo que las células regenerativas obtenidas usando el sistema pueden ser objeto de uno o más de los siguientes: expansión celular (de uno o más tipos celulares regenerativos) y mantenimiento celular (incluyendo aclarado en lámina de las células y cambio de medio); sub-cultivos; sembrado de células; transfección transitoria (incluyendo siembra de células transfectadas de aporte a granel); recogida (incluyendo recogida enzimática, no enzimática y recogida por raspado mecánico); medición de viabilidad celular; siembra en placas de las células (por ejemplo, en placas de microtitulación, incluyendo tomando células de pocillos individuales para expansión, expansión de células en pocillos frescos); exploración de alto rendimiento; aplicaciones de terapia celular; aplicaciones de terapia génica; aplicaciones de ingeniería tisular; aplicaciones de proteínas terapéuticas; aplicaciones de vacunas virales; recogida de células regenerativas o sobrenadante para creación de un banco o exploración, medición de crecimiento celular, lisis, inoculación, infección o inducción; generación de líneas celulares (incluyendo células de hibridoma); cultivo de

células para estudios de permeabilidad, cultivo de células para estudios de permeabilidad; células para estudios de resistencia viral y ARNi; células para estudios de animales transgénicos y knock-out; estudios de purificación de afinidad; aplicaciones de biología estructural; desarrollo de ensayos y aplicaciones de ingeniería proteica.

5 Por ejemplo, si la expansión de una población de células regenerativas se requiere para un aplicación particular, podría usarse un enfoque usando condiciones de cultivo para expandir preferentemente la población mientras que otras poblaciones se mantienen (y por tanto se reducen por dilución con las células seleccionadas crecientes) o se pierden debido a ausencia de las condiciones de crecimiento requeridas. Sekiya y col. han descrito condiciones que podrían emplearse a este respecto para células madre derivadas de médula ósea (Sekiya y col., 2002). Este enfoque (con o sin adherencia diferencial al plástico de cultivo tisular) podría aplicarse a una realización adicional de la presente invención. En esta realización el sedimento de células regenerativas final se retira de la cámara de salida y se coloca en un segundo sistema que proporciona el componente de cultivo celular. Este podría estar en forma de un incubador de cultivo tisular de laboratorio convencional o un dispositivo de estilo biorreactor tal como el que se describe en Tsao y col., Patente de Estados Unidos N° 6.001.642 o por Armstrong y col., Patente de Estados Unidos N° 6.238.908. En una realización alternativa, la expansión celular o el componente de cultivo celular podrían añadirse al sistema existente, por ejemplo, en la cámara de salida, permitiendo la adherencia a corto plazo y/o cultivo celular de las poblaciones de células derivadas de tejido adiposo. Esta realización alternativa permitiría la integración del cultivo celular y/o componente de expansión celular al sistema y eliminaría la necesidad de retirar las células de este sistema y su colocación en otro.

20 Durante el procesamiento, uno o más aditivos pueden añadirse a o proporcionarse con las diversas cámaras o depósitos según se requiera para mejorar los resultados. Estos aditivos también pueden proporcionarse como parte de otro sistema asociado con el sistema existente o separado del sistema existente. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los aditivos se añaden o proporcionan sin la necesidad de retirar las células regenerativas del sistema. En otras realizaciones, los aditivos se añaden o proporcionan conectando un nuevo depósito o cámara que comprende los aditivos en un orificio no usado del sistema de una manera estéril. En otras realizaciones más, los aditivos se añaden o proporcionan en un segundo sistema o dispositivo que no está conectado con el sistema de la presente invención. Algunos ejemplos de aditivos incluyen agentes que optimizan el lavado y la disgregación, aditivos que potencian la viabilidad de la población de células activas durante el procesamiento, agentes antimicrobianos (por ejemplo antibióticos), aditivos que lisan adipocitos y/o glóbulos rojos o aditivos que enriquecen con respecto a poblaciones celulares de interés (por adherencia diferencial a restos de fase sólida o para promover de otro modo la reducción sustancial o enriquecimiento de poblaciones celulares) como se describe en el presente documento.

35 Por ejemplo, para obtener una población de células regenerativas homogéneas, puede emplearse cualquier procedimiento adecuado para separar y concentrar el tipo de células regenerativas particulares, tal como el uso de anticuerpos específicos de célula que reconocen y se unen a antígenos presentes en, por ejemplo, células madre o células progenitoras, por ejemplo, células precursoras endoteliales. Estos incluyen tanto selección positiva (seleccionar las células diana) como selección negativa (retirada selectiva de células no deseadas) o combinaciones de las mismas. También pueden usarse marcadores intracelulares tales como enzimas en la selección usando moléculas con fluorescencia cuando actúan sobre ellas enzimas específicas. Además, podría insertarse un material de fase sólida con propiedades adhesivas seleccionadas para permitir la adherencia diferencial y/o elución de una población particular de células regenerativas dentro del sedimento de células final en la cámara de salida del sistema.

45 Una realización alternativa de este enfoque de adherencia diferencial incluiría el uso de anticuerpos y/o combinaciones de anticuerpos que reconocen moléculas de superficie expresadas diferencialmente en células regenerativas diana y células no deseadas. La selección basándose en la expresión de marcadores de superficie celular específicos (o combinaciones de los mismos) es otra técnica aplicada de forma habitual en la que los anticuerpos se unen (directa o indirectamente) a una estructura de fase sólida (Geiselhart y col., 1996; Formanek y col., 1998; Graepler y col., 1998; Kobari y col., 2001; Mohr y col., 2001).

50 En otra realización el sedimento celular podría resuspenderse, estratificarse sobre (o debajo de) un material fluido formado en un gradiente de densidad continuo o discontinuo y colocarse en una centrifuga para separación de poblaciones celulares basándose en la densidad celular. En una realización similar también pueden emplearse enfoques de flujo continuo tales como aféresis (Smith, 1997) y decantación (con o sin contracorriente) (Lasch y col., 2000) (Ito y Shinomiya, 2001).

55 Otros ejemplos de aditivos pueden incluir componentes biológicos o estructurales adicionales, tales como factores de diferenciación celular, promotores de crecimiento, agentes inmunosupresores, dispositivos médicos o cualquier combinación de los mismos, como se ha analizado en el presente documento. Por ejemplo, pueden añadirse otras células (por ejemplo cardiosferas), tejidos (por ejemplo tejido cardiaco), fragmentos tisulares, factores de crecimiento tales como VEGF y otros factores de crecimiento angiogénico o arteriogénico conocidos, compuestos biológicamente activos o inertes (por ejemplo, cardiogenol C), armazones reabsorbibles u otros aditivos pretendidos para mejorar el suministro, eficacia, tolerancia o función de la población de células regenerativas.

60 La población de células regenerativas también puede modificarse por inserción de ADN (por ejemplo que codifica las

proteínas Id, la familia de proteínas WNT, proteínas de señalización por ejemplo, la familia de proteínas RXR y gp130 y/o factores de crecimiento, por ejemplo, IGF-1) o por colocación en un sistema de cultivo celular (como se describe en el presente documento o conocido en la técnica) de modo que cambie, mejore o complemente la función de las células regenerativas para derivación de un propósito estructural o terapéutico. Por ejemplo, podría usarse ingeniería genética para adaptar la tasa de estimulación de las células regenerativas que se diferencian en miocitos cardiacos o células de tipo miocito cardiaco antes de la reinfusión en el paciente para asegurar una frecuencia de latidos óptima.

Las técnicas de transferencia génica para células madre se conocen por los expertos en la materia, como se desvela en (Morizono y col., 2003; Mosca y col., 2000) y pueden incluir técnicas de transfección viral, y más específicamente, técnicas de transferencia génica de virus adenoasociados, como se desvela en (Walther y Stein, 2000) y (Athanasopoulos y col., 2000). También pueden realizarse técnicas no basadas en virus como se desvela en (Muramatsu y col., 1998). También podría añadirse un gen que codifique uno o más factores de diferenciación celular, por ejemplo, un factor o factores de crecimiento o una citocina o citocinas. Se desvelan ejemplos de diversos agentes de diferenciación celular en (Gimble y col., 1995; Lennon y col., 1995; Majumdar y col., 1998; Caplan y Goldberg, 1999; Ohgushi y Caplan, 1999; Pittenger y col., 1999; Caplan y Bruder, 2001; Fukuda, 2001; Worster y col., 2001; Zuk y col., 2001). También podrían añadirse genes que codifican factores o agentes anti-apoptóticos o anti-necróticos. La adición del gen (o combinación de genes) podría ser cualquier tecnología conocida en la materia incluyendo pero sin limitación transducción adenoviral, "pistolas génicas", transducción mediada por liposomas y transducción mediada por retrovirus o lentivirus, plásmido, virus adeno-asociado. Estas células regenerativas podrían después implantarse junto con un material excipiente que porta un vehiculo de suministro génico capaz de liberar y/o presentar genes a las células a lo largo del tiempo de modo que la transducción pueda continuar o iniciarse *in situ*.

Cuando las células y/o el tejido que contiene las células se administran a un paciente distinto del paciente del que se obtuvieron las células y/o el tejido; uno o más agentes inmunosupresores pueden administrarse al paciente que recibe las células y/o tejido para reducir y preferentemente evitar el rechazo del trasplante. Como se usa en el presente documento, la expresión "fármaco o agente inmunosupresor" pretende incluir agentes farmacéuticos que inhiben o interfieren con la función inmune normal. Los ejemplos de agentes inmunosupresores adecuados con los procedimientos desvelados en el presente documento incluyen agentes que inhiben la rutas de coestimulación de linfocitos T/linfocitos B, tales como agentes que interfieren con el acoplamiento de linfocitos T y linfocitos B mediante las rutas de CTLA4 y B7, como se desvela en la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20020182211. Un agente inmunosupresor preferido es ciclosporina A. Otros ejemplos incluyen mofetil de miofenilato, rapamicina y globulina anti-timocitos. En una realización, el fármaco inmunosupresor se administra con al menos otro agente terapéutico. El fármaco inmunosupresor se administra en una formulación que es compatible con la vía de administración y se administra a un sujeto a una dosificación suficiente para conseguir el efecto terapéutico deseado. En otra realización, el fármaco inmunosupresor se administra de forma transitoria durante un tiempo suficiente para inducir tolerancia a las células regenerativas de la invención.

En estas realizaciones, las células regenerativas pueden ponerse en contacto, combinarse, mezclarse o añadirse a los aditivos a través de cualquier forma reconocida en la técnica, incluyendo dispositivos tales como dispositivos de agitación y procedimientos asociados descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede usarse balanceo, inversión, rodillos móviles o pulsados por compresión.

En otro aspecto, la población celular podría colocarse en el receptor y rodearse de una envoltura plástica reabsorbible u otros materiales y componentes relacionados tales como los fabricados por MacroPore Biosurgery, Inc. (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 6.269.716; 5.919.234; 6.673.362; 6.635.064; 6.653.146; 6.391.059; 6.343.531; 6.280.473).

En todas las realizaciones anteriores, al menos una parte de las células regenerativas separadas y concentradas pueden crioconservarse, como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 10/242.094, titulada CONSERVACIÓN DE CÉLULAS NO EMBRIONARIAS DE TEJIDOS NO HEMATOPOYÉTICOS, presentada el 12 de septiembre de 2002, que reivindica beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos 60/322.070 presentada el 14 de septiembre de 2001, que es de cesión común.

Al final del procesamiento, las células regenerativas pueden recuperarse manualmente de la cámara de salida. Las células pueden cargarse en un dispositivo de suministro, tal como una jeringa, para su colocación en el receptor por vía subcutánea, intramuscular u otra técnica que permita el suministro de las células al sitio diana dentro del paciente. En otras palabras, las células pueden situarse dentro del paciente por cualquier medio conocido para los expertos en la materia. Las realizaciones preferidas incluyen colocación por aguja o catéter o por implantación quirúrgica directa. En otras realizaciones, las células pueden transportarse automáticamente a una cámara de salida que puede estar en forma de un depósito, jeringa o catéter etc., que puede usarse para situar las células en el paciente. El contenedor también puede usarse para almacenar las células para un uso posterior o para crioconservación. Todos los procedimientos de recuperación se realizan de una manera estéril. La realización de implantación quirúrgica, las células podrían aplicarse junto con aditivos tales como matriz preformada o almacén como se ha descrito en el presente documento.

En realizaciones preferidas de la invención (por ejemplo, la realización mostrada en la Figura 4), el sistema es automático. En otra realización, el sistema tiene componentes tanto automáticos como manuales. El sistema puede estar comprendido de uno o más componentes desechables conectados o montados en un componente o módulo de soporte físico reutilizable. Los sistemas automáticos de la invención proporcionan presentaciones en pantalla (véase Figura 16) que impulsan el funcionamiento apropiado del sistema. Los sistemas automáticos también proporcionan una pantalla que proporciona el estado del procedimiento y/o las instrucciones etapa a etapa con respecto a la preparación apropiada de los componentes desechables del sistema. La pantalla también indica problemas o fallos en el sistema si se producen y proporciona directrices de "resolución de problemas" si fuera apropiado. En una realización, la pantalla es una pantalla de interfaz de usuario que permite al usuario introducir parámetros en el sistema a través, por ejemplo, de una pantalla táctil.

Los sistemas parcial y completamente automáticos pueden incluir un dispositivo de procesamiento (por ejemplo, microprocesador u ordenador personal) y programas informáticos asociados que proporcionan el control lógico para que el sistema funcione y automatizar una o más etapas del procedimiento basándose en la aportación del usuario. En ciertas realizaciones, uno o más aspectos del sistema pueden ser programables por el usuario mediante software que reside en el dispositivo de procesamiento. El dispositivo de procesamiento puede tener uno o más programas informáticos pre-programados en la Memoria de Sólo Lectura (ROM). Por ejemplo, el dispositivo de procesamiento puede tener software pre-programado adaptado para procesar sangre, otro programa para procesar tejido adiposo para obtener volúmenes pequeños de células regenerativas y otro programa para procesar tejido adiposo para obtener mayores volúmenes de células regenerativas. El dispositivo de procesamiento también puede tener software pre-programado que proporciona al usuario parámetros apropiados para optimizar el procedimiento basándose en el aporte del usuario de información relevante tal como la cantidad de células regenerativas, el tipo de tejido que se procesa, el tipo de manipulación post-procesamiento requerida, el tipo de replicación terapéutica, etc.

El software también puede permitir la automatización de etapas tales como el control de la entrada y salida de fluidos y tejidos a través de rutas de tubos particulares mediante el control de bombas y válvulas del sistema; controlar la secuencia apropiada y/o dirección de activación; detectar bloqueos con sensores de presión; mezclar mecanismos, medir la cantidad de tejido y/o fluido a mover a través de una ruta particular usando mecanismos volumétricos; mantener las temperaturas de los diversos componentes usando dispositivos de control de la temperatura, e integrar el procedimiento de separación y concentración con mecanismos de temporización y software. El dispositivo de procesamiento también puede controlar las velocidades de la centrífuga basándose en el tipo de tejido que se procesa y/o la población o subpoblación celular que se recoge y los tipos de procedimientos a realizar (por ejemplo, mejora del tejido usando tejido adiposo aumentado con células regenerativas o procesamiento de células para aplicaciones de reparación de hueso usando injertos de hueso revestido con células regenerativas). El dispositivo de procesamiento también puede incluir puertos serie o paralelos convencionales u otros medios para comunicarse con otros ordenadores o redes. En consecuencia, el dispositivo de procesamiento puede ser una unidad independiente o estar asociado con uno o más dispositivos adicionales para los procedimientos de procesamiento adicionales descritos en el presente documento.

El software puede permitir la recogida automática de "datos de ejecución" incluyendo, por ejemplo, los números de lote de los componentes desechables, las mediciones de temperatura y volumen, los parámetros de volumen tisular y número de células, la dosis de enzima aplicada, el tiempo de incubación, la identidad del operador, la fecha y la hora, la identidad del paciente, etc. En una realización preferida del dispositivo se integraría un sistema de reconocimiento de caracteres, tal como un sistema lector de código de barras para permitir la entrada de datos de estas variables (por ejemplo número de lote de conjunto disponible y fecha de caducidad, número de lote y fecha de caducidad de la colagenasa, identificadores de paciente/muestra, etc.) en el dispositivo de procesamiento como parte de la documentación del procesamiento. Esto reduciría la posibilidad de errores de entrada de datos. Un sistema de lectura de código de barras tal podría fácilmente incorporarse en el dispositivo de procesamiento usando un USB u otro puerto de interfaz y sistema conocido en la técnica. De esta manera el dispositivo proporcionaría control integrado de la entrada de datos y documentación del procedimiento. Un informe impreso de estos parámetros sería parte de los parámetros definidos por el usuario de una operación programada del sistema. Naturalmente esto requeriría la integración de un componente de impresión (hardware y controlador) o controlador de impresora en software más un conector de salida de interfaz para una impresora (por ejemplo un puerto USB) en el hardware del dispositivo.

En ciertas realizaciones, el sistema es un sistema completamente automático. Por ejemplo, el usuario puede seleccionar inicialmente la cantidad de tejido a procesar, unir el sistema al paciente y el sistema puede aspirar automáticamente el tejido requerido y separar y concentrar las células regenerativas en una secuencia ininterrumpida sin intervención adicional del usuario. El usuario también puede introducir la cantidad de células regenerativas requeridas y permitir que el sistema aspire la cantidad requerida de tejido y procese el tejido. Un sistema completamente automático también incluye un sistema que es capaz de reconfigurarse basándose en varios (por ejemplo, dos o más) parámetros introducidos por el usuario, por ejemplo, número de ciclos de lavado, velocidad de centrifugación etc. El sistema también puede ejecutarse en un modo semi-automático durante el cual el sistema atraviesa ciertas etapas sin intervención del usuario pero requiere la intervención del usuario antes de que puedan producirse ciertos procedimientos. En otras realizaciones, el sistema es un sistema integrado sencillo que presenta instrucciones para guiar al usuario para realizar operaciones predeterminadas en momentos predeterminados. Por ejemplo, el dispositivo de procesamiento puede guiar a los usuarios a través de las etapas necesarias para la

inserción apropiada de los tubos, cámaras y otros componentes del sistema. En consecuencia, el usuario puede asegurarse de que se está realizando la secuencia de operaciones apropiada. Un sistema tal puede requerir adicionalmente confirmación de cada etapa operativa por el usuario para evitar una activación o terminación de etapas involuntaria en el procedimiento. En una realización adicional, el sistema puede iniciar ensayos automáticos para confirmar la correcta inserción de los tubos, cámaras, ausencia de bloqueos, etc. En otra realización más, el sistema de la presente invención puede programarse para realizar múltiples procedimientos de separación y concentración a través de control automático del flujo de tejido a través del sistema. Esta característica puede ser importante, por ejemplo, durante la cirugía en un paciente en el que el tejido que de otro modo se perdería se recoge en el sistema y las células regenerativas del tejido se separan y concentran y se devuelven al paciente.

Como se ha expuesto anteriormente, los componentes del sistema pueden ser desechables (denominados en el presente documento "conjunto (o conjuntos desechables)", de modo que partes del sistema puedan desecharse después de solamente un uso. Esta implementación puede ayudar a asegurar que cualquier superficie que entre en contacto con el tejido del paciente se desechará de forma apropiada después de usarse. Un conjunto desechable ejemplar se ilustra en la Figura 13. En una realización preferida, los componentes desechables del sistema se pre-esterilizan y empaquetan de modo que puedan utilizarse "tal cual" que son fáciles de usar y fáciles de cargar y que eliminan la necesidad de muchas conexiones de tubos y organización compleja de conexiones de tubos. Tales componentes desechables son relativamente baratos de fabricar y por lo tanto no crean un gasto sustancial debido a su desecho. En una realización, el sistema desechable (preferido en el presente documento de forma intercambiable a "conjunto o conjuntos" desechables) comprende, consiste esencialmente en o consiste en la cámara de recogida 20, la cámara de procesamiento 30, la cámara de residuos 40, la cámara de salida 50, los conjuntos de filtros 36, la bolsa de muestras 60 y los conductos asociados 12 o tubos. En realizaciones preferidas de los conjuntos desechables del sistema, la cámara de recogida 20 y la cámara de procesamiento 30 se conectan mediante conductos 12 que se alojan en un marco rígido. La red de sellado rotatoria (Figuras 7 y 8) de una cámara de procesamiento 30 también puede alojarse en el mismo marco rígido. En otra realización preferida, las diversas cámaras y depósitos del conjunto desechable están comprendidos por las interfaces necesarias que son capaces de comunicarse con el dispositivo de procesamiento del sistema de modo que las bombas, válvulas, sensores y otros dispositivos que automatizan el sistema se activan o desactivan de forma apropiada según sea necesario sin intervención del usuario. Las interfaces también reducen el tiempo y la experiencia requeridos para preparar el sistema y también reducen los errores indicando cómo preparar de forma apropiada el sistema y alertando al usuario en el caso de una preparación errónea.

La mayoría de los conjuntos desechables de la invención tendrán muchos elementos comunes. Sin embargo, el experto en la materia reconocerá que diferentes aplicaciones del sistema pueden requerir componentes adicionales que pueden ser parte de los conjuntos disponibles. En consecuencia, los conjuntos desechables pueden comprender adicionalmente una o más agujas o jeringas adecuadas para obtener tejido adiposo o de otro tipo del paciente y devolver células regenerativas al paciente. El tipo, número y diversidad de las agujas y jeringas incluidas dependerá del tipo y cantidad de tejido que se procese. Los conjuntos desechables pueden comprender adicionalmente uno o más depósitos rígidos o flexibles para retener los fluidos de lavado y otros reactivos de procesamiento usados en el sistema. Por ejemplo, los conjuntos desechables pueden comprender depósitos para retener solución salina, enzimas y cualquier otro fluido de tratamiento o reemplazo requeridos para el procedimiento. Además, pueden proporcionarse soluciones de lavado, fluidos de resuspensión, aditivos, agentes o materiales de trasplante adecuados con los conjuntos desechables para su uso junto con los sistemas y procedimientos de la invención.

Cualquier combinación de los componentes, equipamiento o materiales del sistema descritos en el presente documento o requeridos de otro modo para realizar la práctica de la invención pueden proporcionarse en forma de un kit. Por ejemplo, un kit de la invención puede incluir, por ejemplo, la aguja de longitud y calibre óptimos para la liposucción basada en jeringa y jeringas estériles que contienen el medio de filtro preferido que permite el procesamiento de pequeñas volúmenes de tejido. Otro equipamiento y materiales ejemplares que pueden usarse con la invención y también pueden incluirse con los kits de la invención se enumeran en las Tablas II y III.

La Tabla II a continuación identifica ejemplos de materiales que pueden usarse para obtener células regenerativas de tejido adiposo de acuerdo con los sistemas y procedimientos de la presente invención:

Tabla II

| Descripción | Proveedor | Cantidad | Nota |
|--------------------------|------------------|-------------------|----------------------------------|
| Jeringa de 10 ml | Becton Dickinson | Según se requiera | Opcional, usado para liposucción |
| Aguja de punta roma 14GA | | Según se requiera | Opcional, usado para liposucción |

(cont.)

| Descripción | Proveedor | Cantidad | Nota |
|--|---------------|-------------------|--|
| Envase de sangre sencillo (600 ml) | Baxter Fenwal | 1 | Bolsa de procesamiento de células principal; la bolsa tiene un adaptador de punta en línea y dos orificios de punta libres |
| Envase de transferencia con acoplador (150 ml) | Baxter Fenwal | 1 | Conjunto de bolsas Quad |
| Envase de transferencia con acoplador (1 l) | Baxter Fenwal | 1 | Bolsa de residuos |
| Acoplador de sitio de muestra | Baxter Fenwal | 2 | |
| Solución salina al 0,9 % (para inyección) | Baxter Fenwal | 1 | |
| Aguja aguda 14GA | Monoject | Según se requiera | Para añadir tejido de liposucción a la bolsa |
| Aguja aguda 20GA | Monoject | 3 | Para añadir colagenasa y retirar células PLA |
| Filtro Sterflip de 0,2 µm | Millipore | 1 | Para filtrar la colagenasa |
| Grapas de sellado de aluminio Teruflex | Terumo | 4 | ME*ACS121 para sellado temporal de los tubos |
| Almohadilla de preparación de povidona yodo | Triadine | Según se requiera | 10-3201 |
| Liberasa H1 Colagenasa | Roche | | Véase nota de procedimiento 1 |
| Obleas de TSCD | Terumo | 2 | 1 SC*W017 para su uso con soldador de tubos estériles TSCD |

La Tabla III, a continuación, identifica equipamiento que puede usarse con los sistemas y procedimientos desvelados en el presente documento.

Tabla III

| Descripción | Proveedor | Cantidad | Nota |
|---|-------------------|----------|-------------------------|
| Centrífuga de conjunto fácil Sorvall Legend T | Fisher Scientific | 1 | 75-004-367 |
| Rotor | Kendro/Sorvall | 1 | Rotor TTH-750 |
| Cubos de rotor | Kenrolsorvall | 4 | Cubos redondos 75006441 |
| Adaptador para bolsas de 150 ml | Kendro/Sorvall | 4 | 00511 |
| Extractor de plasma | Baxter Fenwal | 1 | 4R4414 |
| Sellador de tubo | Zebra | 1 | Modelo 1060 |
| Soldador de tubos estériles TSCD | Terumo | 1 | 3ME*SC201AD |
| Agitador térmico LabLine | LabLine | 1 | 4637 |

(cont.)

| Descripción | Proveedor | Cantidad | Nota |
|--|-----------|----------|--|
| Pinza de tipo hemostat plástica "desechable" | Davron | 3 | |
| Conjuntos de bolsas de equilibrio | | 2 | Bolsas rellenas de agua usadas para equilibrar la centrifuga |
| Cámara de puntas de peligro biológico | | 1 | |
| Cámara de residuos de peligro biológico | | 1 | |

El componente reutilizable del sistema comprende, consiste esencialmente en o consiste en el mecanismo de agitación para la cámara de recogida, la bomba y los sensores variados que activan válvulas y controles de bomba, el motor de centrifuga, el marco rotatorio del motor de centrifuga, la pantalla de interfaz de usuario y los puertos USB, un dispositivo de engranaje o acoplamiento o configuración para conectar el conjunto desechable de modo que el conjunto desechable se una de forma segura y funciona en conjunto con el componente de hardware reutilizable y otros dispositivos asociados. Un componente reutilizable ejemplar se ilustra en la Figura 14. En realizaciones preferidas, el componente reutilizable incluye un medio para separar y concentrar las células regenerativas de la composición de células regenerativas, por ejemplo, una centrifuga rotatoria. En esta realización, el componente reutilizable se diseña para conectarse a y funcionar en conjunto con una parte de la cámara de procesamiento (que comprende una cámara de centrifuga) del conjunto desechable como se muestra en la Figura 15A. Se entiende que los medios para separar y concentrar las células regenerativas en el componente reutilizable no se limita a una centrifuga rotatoria sino que también puede incluir cualquier otra configuración descrita en el presente documento, incluyendo un filtro de membrana rotatorio. El componente reutilizable también puede alojar el dispositivo de procesamiento descrito en el presente documento que contiene software preprogramado para llevar a cabo varios procedimientos de procesamiento de tejido diferentes y activar de forma selectiva las diversas bombas y válvulas del sistema en consecuencia. El procesador también puede incluir capacidad de almacenamiento de datos para almacenar información del donante/paciente, información de procesamiento o recogida y otros datos para descargar posteriormente o compilar. El componente reutilizable puede usarse con una diversidad de conjuntos desechables. El conjunto desechable se conecta al componente reutilizable a través, por ejemplo, de un dispositivo de engranaje o configuración para conectar el conjunto desechable de modo que el conjunto desechable se une de forma segura y funciona en conjunto con el componente de hardware reutilizable de una manera que el dispositivo de procesamiento presente en el componente reutilizable pueda controlar, es decir, enviar y recibir señales de y hacia los diversos componentes del conjunto desechable así como diversos componentes del componente reutilizable y otros dispositivos y sistemas asociados.

En una realización, un sistema desechable para su uso en el sistema está comprendido por una cámara de recogida 20 que puede contener aproximadamente 800 ml de tejido; una cámara de procesamiento 30 que puede procesar la composición de células regenerativas generada por aproximadamente 800 ml de tejido lavado y digerido en la cámara de recogida 20; una cámara de salida 50 que puede acomodar al menos 0,5 ml de células regenerativas; y un depósito de residuos 40 que puede contener aproximadamente 10 l de residuos. En esta realización, el dispositivo de hardware no es mayor de 60,96 cm de longitud x 45,72 cm de ancho x 91,44 cm de alto. Pueden construirse dimensiones alternativas de los diversos componentes de los conjuntos desechables así como del dispositivo de hardware según se requiera y se pretende que estén abarcadas por la presente invención sin limitación.

Los componentes desechables del sistema son fáciles de colocar en el dispositivo. Una ilustración de un conjunto desechable utilizado montado junto con un componente reutilizable correspondiente se ilustra en la Figura 15A. El sistema se diseña preferentemente de modo que pueda detectar un componente desechable cargado de forma inapropiada. Por ejemplo, los componentes de cada conjunto desechable pueden tener marcas de guía de color para alinear e insertar de forma apropiada los tubos, cámaras, etc. en lugares apropiados en el sistema. En realizaciones adicionales, el sistema desvelado en el presente documento es una unidad portátil. Por ejemplo, la unidad portátil también puede ser capaz de moverse de una localización en la que se ha producido recogida de tejido adiposo a otra localización para recogida de tejido adiposo. En ciertas implementaciones, la unidad portátil es adecuada para recoger y procesar el tejido adiposo a la cabecera de un paciente. De este modo, una unidad portátil puede ser parte de un sistema que pueda moverse de paciente a paciente. En consecuencia, la unidad portátil puede tener ruedas que se bloquean y, por lo tanto, puede colocarse y usarse fácilmente en una localización conveniente en una posición estable y segura durante el procedimiento. En otras realizaciones, la unidad portátil se diseña para preparación y funcionamiento en una superficie plana tal como una mesa. La unidad portátil también puede incluirse en una unidad de alojamiento. La unidad portátil puede estar comprendida adicionalmente por

perchas, ganchos, etiquetas, escalas y otros dispositivos para ayudar en el procedimiento. Todos los componentes reutilizables descritos en el presente documento del sistema tales como la centrífuga, dispositivo de procesamiento, pantalla de presentación pueden montarse en la unidad portátil del sistema.

5 Realizaciones manuales alternativas para obtener células regenerativas también están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, en una realización, el tejido adiposo puede procesarse usando cualquier combinación de los componentes del sistema, equipo y/o materiales descritos en el presente documento.

10 Una realización manual del sistema de la invención puede practicarse de acuerdo con las siguientes etapas e información, que se proporcionan como ejemplo y no como limitación. En primer lugar, se recoge tejido adiposo de un paciente. Se abre una línea de recuperación tejido, o acoplador de sitio de recogida de muestras, y se inserta una jeringa de 10 ml a través de la cánula roma. La cánula roma se reemplaza con una aguja relativamente aguda (14 G). El sitio de recogida de muestras se frota con yodo. El tejido adiposo se inyecta en la bolsa de 600 ml a través del sitio de recogida de muestras. La jeringa y la aguja se descartan después en una cámara de puntas. Estas etapas se repiten para colocar suficiente tejido en la bolsa. El tejido suficiente se determina caso por caso basándose en los aspectos concretos del paciente y la aplicación.

15 En segundo lugar, se lava el tejido adiposo aspirado. Se cuelga una bolsa de solución salina precalentada (37 °C) sobre la superficie de trabajo. Se coloca una pinza hemostat azul en el tubo entre la bolsa de 600 ml y la punta. La pinza se cierra para sellar el tubo. La punta de en la bolsa de 600 ml se usa para entrar en la bolsa de solución salina (en esta situación usar la aguja en la bolsa de 600 ml para entrar en la bolsa de solución salina a través del tabique de goma, frotar el tabique con yodo antes de la inserción de la aguja). La pinza azul se libera y se permite que entren aproximadamente 150 ml de solución salina en la bolsa de 600 ml. La pinza azul se cierra cuando ha entrado el volumen deseado de solución salina en la bolsa de 600 ml. La bolsa de 600 ml se invierte 10-15 veces durante aproximadamente 15 segundos. Se aplica una segunda pinza azul al tubo que conduce desde la bolsa de residuos de 3 l a la punta. La punta en la bolsa de 3 l se usa para entrar en la bolsa de 600 ml. La bolsa de 600 ml se cuelga invertida sobre la superficie de trabajo y se permite que se asiente durante aproximadamente un minuto. La pinza azul que conduce a la bolsa de 3 l se libera. Se permite que el fluido residual fluya hacia la bolsa de 3 l. Se aplica la pinza azul para detener el flujo antes de que el tejido entre en el tubo. Se baja la bolsa de 600 ml a la superficie de trabajo. Estas etapas se repiten dos veces más. Si el residuo de solución salina aún aparece notablemente rojo, se indica un tercer ciclo adicional. Se usa un sellador por calor para sellar el tubo entre la bolsa de residuos de 3 l y la bolsa de 600 ml. El sellado se realiza aproximadamente en el punto intermedio del tubo. La bolsa de residuos de 3 l se retira y se descarta. La bolsa de 600 ml se devuelve a la superficie de trabajo.

20 En tercer lugar, se digiere el tejido adiposo lavado. La pinza azul del tubo entre la solución salina y la bolsa de 600 ml se libera para permitir que entren aproximadamente 150 ml de solución salina a la bolsa de 600 ml. El sitio de toma de muestras en la bolsa de 600 ml se frota con yodo. Se inyecta colagenasa a través del sitio de toma de muestras a la bolsa de 600 ml. La colagenasa se prepara descongelando un frasco de colagenasa en un baño de agua a 37 °C o equivalente distinto de microondas. Se inserta una jeringa de 1 ml con una aguja de 22 G en el frasco. La colagenasa se retira a la aguja. La aguja se retira y se reemplaza con un filtro de 0,2 µm y una segunda aguja de 22 G. La colagenasa se expulsa después de la jeringa a través del filtro de 0,2 µm y la aguja. La digestión del tejido adiposo se realiza en una concentración de colagenasa final de 0,1-0,2 unidades de Wunsch/ml. La placa térmica se coloca en el agitador. Durante este tiempo, la bolsa de solución salina, cuando aún está unida, se sitúa en el lateral del agitador. Se tiene cuidado para asegurar que el tubo que conduce a la bolsa de solución salina se sitúa de tal manera que no se queda atrapado en el agitador cuando esté en movimiento. El controlador de placa térmica se ajusta a 37 °C. La bolsa de 600 ml se coloca sobre el agitador. El agitador se ajusta al máximo. Se observa la bolsa para asegurar que esté estable y se permite que se balancee durante aproximadamente 1 hora (55 ± 10 min).

40 En cuarto lugar, se recupera la composición de células regenerativas. La bolsa se retira del agitador. Se aplica una pinza azul al tubo cerrado que conducía previamente a la bolsa de residuos. El dispositivo de conexión estéril se usa para unir el conjunto de bolsas quad (preparado previamente de acuerdo con las siguientes instrucciones) al tubo que estaba unido previamente a la bolsa de residuos. El envase quad puede verse como dos envases quad ligados. Identificar el tubo dividiéndolo en dos envases, doblar el tubo sobre sí mismo y deslizar un aro de metal sobre el tubo plegado (sobre ambos trozos de tubo). Deslizar el aro hacia abajo aproximadamente 1,27 cm. El codo formado en la curva actúa para sellar el tubo. Usar un hemostat para apretar parcialmente el aro cerrado. El aro no se aprieta de forma demasiado estrecha debido a que el aro necesitará retirarse durante el procesamiento. La bolsa de 600 ml se cuelga invertida sobre la superficie de trabajo y se permite que se asiente durante aproximadamente 3 minutos. La pinza azul en el tubo que conduce al conjunto de quad se libera para drenar la fracción celular (bajo la capa de grasa amarillo/naranja) en el conjunto de quad. Se tiene cuidado para evitar que la capa de grasa entre en el tubo. Durante este procedimiento, el tubo puede apretarse manualmente para ralentizar el flujo a medida que la capa de grasa se acerca al tubo. El tubo que conduce al conjunto de bolsas quad se cierra después con una pinza azul, la bolsa de 600 ml se devuelve a la superficie de trabajo y se cuelga la bolsa de solución salina. La pinza azul en el tubo entre la solución salina y la bolsa de 600 ml se libera para permitir que entren aproximadamente 150 ml de solución salina en la bolsa de 600 ml. La bolsa de 600 ml se invierte aproximadamente 10-15 veces durante aproximadamente 15 segundos. La bolsa de 600 ml se cuelga después invertida sobre la superficie de trabajo y se permite que se asiente

durante aproximadamente 3-5 minutos. La pinza azul en el tubo que conduce al conjunto de quad se libera y se drena la fracción celular (la capa bajo la capa de grasa amarilla/ naranja) en el conjunto de quad. Se tiene cuidado para evitar que la capa de grasa entre en el tubo. Por ejemplo, puede ralentizarse el flujo a medida que la capa de grasa se acerca al tubo bloqueando el tubo manualmente. El tubo que conduce al conjunto de bolsas quad se cierra con una pinza azul. El tubo que conduce desde el conjunto de quad a la bolsa de 600 ml se sella por calor. La bolsa de 600 ml después se retira y se descarta.

En quinto lugar, la composición de células regenerativas se lava. Se coloca una grapa metálica en el tubo entre las dos bolsas completas para sellar el tubo. Se coloca el conjunto de quad en equilibrio. Se añade agua a un segundo conjunto de quad "de simulación" para equilibrar el conjunto de quad. El conjunto de quad y el conjunto de equilibrado se colocan en cubos opuestos de la centrífuga. Para el filtro hueco, las células se lavan y se colocan en la bolsa y se sella el tubo entre la bolsa y el conjunto de filtro de fibra hueca descrito anteriormente. Usando una bomba peristáltica, el fluido se pasa a través del conjunto de filtros y el concentrado de células se recoge en una bolsa en el extremo corriente abajo. Se tiene cuidado para asegurar que las bolsas del conjunto de quad no se comprimen y están en posición vertical. La centrífuga se realiza a 400 x g durante 10 minutos. El conjunto de quad se retira de la centrífuga y se coloca en el extractor de plasma. Se tiene cuidado para colocar las bolsas en el extractor de modo que el tubo duro en la parte superior de la bolsa esté solamente en la parte superior de la placa de soporte. Si la bolsa está demasiado alta, se retendrá demasiada solución salina, si está demasiado baja el tubo interferirá con la capacidad de la placa frontal para cerrarse y de nuevo se retendrá demasiada solución salina. Se aplica una pinza azul a cada una de las líneas que conducen desde el conjunto de quad lleno al vacío. Los aros metálicos y pinzas azules se retiran para permitir que el sobrenadante fluya al conjunto de quad vacío. Se extrae tanta solución salina como sea posible, pero se tiene cuidado de no desalojar el sedimento celular. El tubo que llega a cada una de las bolsas que contiene sobrenadante se sella por calor. Las bolsas de residuos que contienen el sobrenadante se retiran. Se aplican pinzas azules a los tubos que conducen a cada una de las bolsas de conjunto quad que contienen células. Las bolsas se sacan del extractor de plasma. Se usa un dispositivo de conexión estéril para conectar el tubo que conduce al envase quad a la bolsa solución salina. La pinza azul que conduce a una de las bolsas de conjunto quad se retira para permitir que fluyan aproximadamente 150 ml de solución salina a la bolsa y después la pinza se vuelve a aplicar para detener el flujo de solución salina. La bolsa de conjunto quad llena se invierte después aproximadamente 10-15 veces durante aproximadamente 15 segundos. La pinza azul que conduce a la bolsa de conjunto quad vacía se retira después y todos los contenidos de la bolsa llena se drenan a la bolsa vacía. La pinza de aro metálico se vuelve a aplicar para sellar el tubo entre las dos bolsas de conjunto quad. El tubo se sella después por calor y se retira la bolsa de solución salina. La bolsa de conjunto quad llena se invierte después aproximadamente 10-15 durante aproximadamente 15 segundos. Se coloca otro conjunto de quad de simulación y se vuelve a equilibrar con el conjunto de quad de células. Las bolsas del conjunto quad (una llena, una vacía) se coloca después en la centrifugadora de modo que las bolsas de conjunto quad no se compriman y estén en posición vertical.

La centrífuga se hace funcionar a aproximadamente 400 x g durante 10 minutos. El conjunto de quad se retira después de la centrífuga y se coloca con cuidado en el extractor de plasma de tal modo que el tubo duro en la parte superior de la bolsa está solamente en la parte superior de la placa de soporte. Si la bolsa es demasiado alta se retendrá demasiada solución salina, si está demasiado baja el tubo interferirá con la capacidad de la placa frontal para cerrarse y de nuevo se retendrá demasiada solución salina. El aro metálico se retira para extraer todo el sobrenadante de la bolsa llena en la bolsa vacía teniendo cuidado de no desalojar el sedimento de células regenerativas. Los tubos entre las bolsas se sellan y se retira y descarta la bolsa (de residuos) llena. Después se inserta un nuevo acoplador de sitio de toma de muestras en la bolsa restante. Las células del sedimento celular se resuspenden después en la solución salina residual (si la hubiera) para obtener una concentración de células regenerativas. La resuspensión puede realizarse por manipulación suave de la bolsa (por ejemplo, exprimir y frotar).

Un ejemplo particular del sistema que incorpora la presente invención se muestra en la Figura 4. La Figura 4 ilustra un sistema automático y procedimiento para separar y concentrar células regenerativas de tejido, por ejemplo, tejido adiposo, adecuadas para reinfusión dentro de un paciente. En ciertas realizaciones del sistema mostrado en la Figura 4, el sistema incluye adicionalmente una etapa automática para aspirar una cantidad dada de tejido del paciente. El sistema mostrado en la Figura 4 está comprendido por el conjunto desechable mostrado en la Figura 13 que se conecta al componente reutilizable del sistema mostrado en la Figura 14 para llegar a una realización automática del sistema mostrado en la Figura 15A. El conjunto desechable se conecta al componente reutilizable a través, por ejemplo, de un dispositivo de engranaje o acoplamiento o configuración, que conecta el conjunto desechable con el componente reutilizable de modo que el conjunto desechable se una de forma segura y se asocie con el componente de hardware reutilizable de una manera que el dispositivo de procesamiento presente en el componente reutilizable pueda controlar y con el que pueda funcionar en conjunto, es decir, enviar y recibir señales a y desde los diversos componentes del conjunto desechable así como diversos componentes del componente reutilizable y otros dispositivos y sistemas asociados.

El usuario puede conectar el conjunto desechable al componente reutilizable, introducir ciertos parámetros usando el interfaz del usuario, por ejemplo, el volumen de tejido a recoger, unir el sistema al paciente y el sistema automáticamente realiza todas las etapas mostradas en la Figura 4 en una secuencia ininterrumpida usando parámetros preprogramados y/o introducidos por el usuario. Una secuencia tal se ilustra en la Figura 15B. Como alternativa, el tejido puede aspirarse manualmente del paciente por el usuario y transportarse al sistema para su

procesamiento, es decir, separación y concentración de células regenerativas.

Específicamente, como se muestra en la Figura 4, el tejido, por ejemplo, tejido adiposo puede retirarse del paciente usando el conducto 12 e introducirse en la cámara de recogida 20. Una ilustración detallada de la cámara de recogida de la Figura 4 se muestra en la Figura 5. Como se ilustra en la Figura 5, la cámara de recogida 20 puede estar comprendida de una línea de vacío 11 que facilita la retirada del tejido usando una cánula convencional. El usuario puede introducir el volumen estimado de tejido dirigido a la cámara de recogida 20 en este punto. El tejido se introduce en la cámara de recogida 20 a través de un orificio de entrada 21 que es parte de una ruta de fluido cerrada que permite al tejido, solución salina y otros agentes añadirse al tejido de una manera aséptica. Un sensor óptico del sistema, por ejemplo, sensor 29, puede detectar cuando el volumen de tejido introducido por el usuario está presente en la cámara de recogida 20. En ciertas realizaciones, si está presente menos tejido en la cámara de recogida que el introducido por el usuario, el usuario tendrá la opción de comenzar a procesar el volumen de tejido que está presente en la cámara de recogida 20. En ciertas realizaciones, una parte del tejido retirado del paciente puede dirigirse a la cámara de muestras 60 a través del uso de una bomba, por ejemplo, una bomba peristáltica, mediante un conducto, que puede activarse mediante entrada del usuario utilizando las interfaces de usuario.

Un sensor 29 puede señalar el dispositivo de procesamiento presente en el componente reutilizable para activar las etapas necesarias para lavar y disgregar el tejido. Por ejemplo, el dispositivo de procesamiento puede introducir un volumen prefijado de agente de lavado basándose en el volumen de tejido recogido usando válvulas y bombas automáticas. Este ciclo puede repetirse en la cámara de recogida hasta que el sensor óptico determine que el líquido efluente es suficientemente transparente y desprovisto de material no deseado. Por ejemplo, un sensor óptico 29 junto con el conducto que conduce fuera de la cámara de recogida 12b o 12d puede detectar que los materiales no deseados se han retirado y puede señalar para que el dispositivo de procesamiento cierre las válvulas requeridas e inicie la siguiente etapa.

A continuación, el dispositivo de procesamiento puede introducir una cantidad preprogramada de agente de disgregación basándose en el volumen de tejido recogido. El dispositivo de procesamiento también puede activar la agitación del tejido en la cámara de recogida durante un periodo prefijado de tiempo basándose en el volumen inicial de tejido recogido o basándose en la entrada de usuario. En la realización mostrada en la Figura 4, una vez que el agente de disgregación, por ejemplo, colagenasa, se añade a la cámara de recogida 20 a través de la fuente de colagenasa 24, el motor en la cámara de recogida 20 se activa mediante el dispositivo de procesamiento. El motor activa el eje rotatorio 25 que está comprendido por un agitador magnético y un dispositivo de tipo pala en el que una o más palas 25a están unidas de forma rígida al cartucho de filtro 27 de un filtro prefijado a la cámara de recogida 28. Las palas agitan en presencia del agente de disgregación de modo que las células regenerativas se separan del tejido.

Se permite que la solución en la cámara de recogida 20 se asiente durante un periodo prefijado de tiempo. Se permite que la parte flotante de la solución ascienda hasta la parte superior de la solución. Una vez que ha pasado el periodo de tiempo prefijado, las válvulas y bombas necesarias se activan por el dispositivo de procesamiento para retirar la parte no flotante a la cámara de residuos 40. La transferencia a la cámara de residuos 40 continua hasta que un sensor 29 a lo largo del conducto que conduce a la cámara de recogida 12b o 12d puede detectar que la fracción flotante de la solución está a punto de transferirse a la cámara de residuos 30. Por ejemplo, un sensor 29 a lo largo del conducto que conduce a la cámara de recogida 12b o 12d puede detectar que los materiales no deseados se han retirado y puede señalar al dispositivo de procesamiento para que cierre las válvulas requeridas.

En este momento la fracción no flotante de la solución, es decir, la composición de células regenerativas, se mueve a la cámara de procesamiento 30. Esto se consigue a través del uso de las válvulas necesarias y las bombas peristálticas. En ciertas realizaciones, antes de la transferencia de la composición de células regenerativas a la cámara de procesamiento 30, puede añadirse un volumen adicional de solución salina a la fracción flotante de la solución que permanece en la cámara de recogida 20. Puede repetirse otro ciclo de lavado. Después de este ciclo, se permite que la solución se asiente y la fracción no flotante (que contiene las células regenerativas) se transporte a la cámara de procesamiento 30 y la fracción flotante se drene a la cámara de residuos 40. El ciclo de lavado adicional se usa para optimizar la transferencia de todas las células regenerativas separadas a la cámara de procesamiento 30.

Una vez que la composición de células regenerativas se transporta a la cámara de procesamiento 30 por medio de los conductos 12, la composición puede someterse a una o más etapas de lavado adicionales antes del comienzo de la fase de concentración. Esto asegura la retirada de contaminantes residuales y residuos de la cámara de recogida 20. De forma similar, posteriormente a la etapa de concentración, la composición de células regenerativas puede someterse a una o más etapas de lavado adicionales para retirar los contaminantes residuales. Pueden retirarse los materiales no deseados de la cámara de procesamiento 30 a la cámara de residuos 40 de la misma manera, es decir, control de válvulas y bombas mediante señales desde el dispositivo de procesamiento, como se ha descrito anteriormente.

Las diversas realizaciones de la cámara de procesamiento 30 mostrada en la Figura 4, se describen en detalle a continuación. La cámara de procesamiento 30 mostrada en la Figura 4 está en forma de una cámara de centrifuga. Una ilustración detallada de la cámara de procesamiento de la Figura 4 se muestra en las Figuras 7 y 8. Una cámara

de procesamiento tal 30 está comprendida generalmente por una red de sellado rotatoria 30.1 que comprende un alojamiento exterior 30.2, uno o más sellos 30.3, uno o más soportes 30.4 y un punto de unión 30.6 para conectar la cámara de procesamiento al dispositivo de centrifuga presente en el componente reutilizable del sistema; una o más rutas fluidas 30.5 en forma de conductos que se extienden desde el sello rotatorio y que terminan en una cámara de centrifuga en cada extremo que está en forma de una cámara de salida 50 alojada en un marco 53 estando comprendido el marco por uno o más orificios 52 y una o más palancas para reposicionar manualmente la cámara de salida 50.

La red de sellado rotatoria 30.1 está incluida para asegurar que las rutas fluidas de la cámara de procesamiento pueden mantenerse en una condición estéril. Además, puede accederse a las rutas de fluido de la cámara de procesamiento de una manera estéril (por ejemplo, para añadir agentes o solución de lavado) en cualquier momento, incluso cuando la cámara de centrifuga de la cámara de procesamiento está girando.

La red de sellado rotatoria 30.1 mostrada en las Figuras 7 y 8 incluye un eje rotatorio comprendido por dos o más soportes 30.4, tres o más sellos de reborde 30.3 y un alojamiento exterior 30.2. En esta realización, los soportes 30.4 comprenden adicionalmente un eje exterior e interior (no mostrados) denominados en el presente documento canales. Estos canales pueden separarse por esferas pulidas de precisión. Los canales y esferas que comprenden los soportes están preferentemente fabricados con material adecuado para contacto con fluido corporal o están revestidos con material adecuado para contacto con fluido corporal. En una realización preferida, los canales y esferas están fabricados usando, por ejemplo, nitruro de silicón o circonita. Además, en esta realización, los tres sellos de reborde están comprendidos por un canal en forma de "U" circular (no mostrado) así como un muelle circular (no mostrado). El canal en forma de "U" circular está preferentemente fabricado usando material flexible de modo que se forma un punto de unión a prueba de filtraciones con el eje rotatorio de la red de sellado rotatoria 30.1. Adicionalmente, los sellados de reborde se orientan preferentemente de una manera tal que la presión de la composición de células regenerativas que fluye a través de la cámara de procesamiento provoque que el conjunto de sellos estrechen su unión con el eje rotatorio por medio de tensión aumentada. Los sellos pueden asegurarse en su posición por medio de una o más grapas circulares (no mostradas) que son capaces de extender y/o colapsar según se requiera para engranar con una ranura en el alojamiento exterior 30.2 de la red de sellado rotatoria 30.1. El calor generado por o cerca de la red de sellado rotatoria 30.1 debe controlarse para evitar la lisis de las células en la solución que se está moviendo a través del paso. Esto puede conseguirse mediante, por ejemplo, selección de un material duro para construir el eje rotatorio, puliendo el área del eje rotatorio que entra en contacto con los sellos y minimizando el contacto entre el eje rotatorio y el sello.

En otra realización la red de sellado rotatoria 30.1 está comprendida por un sello de goma sencillo 30.3 y una junta de aire (no mostrada). Este sello y junta proporcionan una ruta sinuosa para cualquier materia biológica que pudiera comprometer la esterilidad del sistema. En otra realización la red de sello rotatoria 30.1 está comprendida por múltiples sellos cargados en muelles 30.3 que aíslan las rutas de fluido individuales. Los sellos 30.3 están fabricados por un material que puede esterilizarse así como sellar el eje rotatorio sin lubricante. En otra realización la red de sello rotatoria 30.1 está comprendida por un par de discos de cerámica (no mostrados) que crean las diferentes rutas de fluido y que pueden soportar la rotación del sistema y no provocar lisis celular. En otra realización la ruta de fluido es flexible y se permite que se enrolle y desenrolle con respecto a la cámara de procesamiento. Esto se consigue haciendo que la ruta de fluido flexible rote una revolución por cada dos revoluciones de la cámara de procesamiento 30. Esto elimina la necesidad de un sello rotatorio completamente.

La composición de células regenerativas se bombea desde la cámara de recogida 20 por una ruta fluida a través del eje de rotación de la red de sello rotatoria 30.1 y después se divide en un mínimo de dos rutas fluidas 30.5 cada una de las cuales irradia hacia fuera desde el eje central de la cámara de procesamiento 30 y termina cerca de los extremos exteriores de la cámara de procesamiento 30, es decir, dentro de las cámaras de centrifuga que alojan las cámaras de salida 50 (Figura 7 y 8). En consecuencia, en una realización preferida, la cámara de procesamiento 30 está comprendida por dos o más cámaras de salida 50 como se muestra en las Figuras 7 y 8. Estas cámaras de salida 50 están situadas de modo que estén en una orientación durante el procesamiento 30.7 y en otra orientación para la recuperación de células regenerativas concentradas 30.8. Por ejemplo, los cambios de producción están inclinados en un ángulo durante el procesamiento y otro ángulo para la recuperación de células. El ángulo de recuperación de células es más vertical que el ángulo de procesamiento. Las dos posiciones de la cámara de salida 50 pueden manipularse manualmente a través de una palanca 53 que protruye fuera de la cámara de procesamiento 30. Las células regenerativas pueden recuperarse manualmente desde las cámaras de salida 50 cuando están en la orientación de recuperación 30.8 usando una jeringa. En otra realización, se construye ruta fluida 30.5 de modo que se divida fuera de la cámara de procesamiento y después se conecte con los extremos exteriores de la cámara de procesamiento 30, es decir, dentro de las cámaras de centrifuga que alojan las cámaras de salida 50 (no mostrado). En esta realización, grandes volúmenes de composición de células regenerativas y/o aditivos, soluciones, etc. pueden transportarse a la cámara de centrifuga y/o las cámaras de salida directamente.

Con referencia a las Figuras 4 y 7-9, entre la cámara de recogida 20 y la cámara de procesamiento 30, pueden proporcionarse una bomba 34 y una o más válvulas 14. En una realización preferida las válvulas 14 son válvulas electromecánicas. Además, pueden proporcionarse sensores, tales como sensor de presión 29 en línea con la cámara de procesamiento 30 y la cámara de recogida 20. Las válvulas, bombas y sensores actúan en sintonía con el dispositivo de procesamiento presente en el componente reutilizable (Figura 14) para automatizar las etapas de

concentración del sistema.

Los sensores detectan la presencia de la composición de células regenerativas en las cámaras de centrifuga y activan el dispositivo de centrifuga a través de comunicación con el dispositivo de procesamiento del sistema. La composición de células regenerativas se somete después a una carga preprogramada durante un tiempo preprogramado basándose en la cantidad de tejido recogido originalmente y/o entrada de usuario. En ciertas realizaciones, esta etapa puede repetirse automáticamente o a través de entrada de usuario. Por ejemplo, la composición se somete a una carga de aproximadamente 400 veces la fuerza de la gravedad durante un periodo de aproximadamente 5 minutos. La cámara de salida 50 se construye de modo que los extremos exteriores de la cámara formen un depósito pequeño para las partículas densas y células. La cámara de salida 50 conserva las partículas densas en lo que se denomina un "sedimento celular", mientras que permite que el sobrenadante más ligero se retire a través de una ruta fluida, por ejemplo, una ruta fluida que está a lo largo del eje de rotación de la red de sellado rotatoria 30.1 y viaja desde el punto inferior en el centro de la cámara de procesamiento 30 a través de la red de sellado rotatoria 30.1 al depósito de residuos 40. Las válvulas 14 y bombas 34 señalizan al dispositivo de procesamiento para activar las etapas de retirar el sobrenadante al depósito de residuos 40 sin alterar el sedimento celular presente en la cámara de salida 50.

El sedimento celular se obtiene usando el sistema mostrado en la Figura 4 comprende las células regenerativas concentradas de la invención. En algunas realizaciones, después de que se ha retirado el sobrenadante y dirigido a la cámara de residuos 40, puede usarse una ruta fluida 30.5 para resuspender el sedimento celular que se forma después de la centrifugación con soluciones y/u otros aditivos adicionales. La resuspensión del sedimento celular de esta manera posibilita lavados adicionales de las células regenerativas para retirar proteínas no deseadas y compuestos químicos así como aumentar el flujo de oxígeno a las células. La suspensión resultante puede someterse a otra carga de aproximadamente 400 veces la fuerza de la gravedad durante otro periodo de aproximadamente 5 minutos. Después de que se forme un segundo sedimento celular y el sobrenadante resultante se retire a la cámara de residuos 40, puede realizarse un lavado final de la manera descrita anteriormente con solución salina u otra solución de tampón apropiada. Estos lavados repetidos pueden realizarse múltiples veces para potenciar la pureza de la solución de células regenerativas. En ciertas realizaciones, la solución salina puede añadirse en cualquier etapa que se considere necesaria para mejorar el procesamiento. Las concentraciones de las células regenerativas obtenidas usando el sistema mostrado en la Figura 4 pueden variar dependiendo de la cantidad de tejido recogido, edad del paciente, perfil del paciente, etc. Se proporcionan rendimientos ejemplares en la Tabla 1.

El sedimento final presente en la cámara de salida 50 puede después recuperarse de una manera aséptica usando una jeringa apropiada después de que la cámara de salida 50 se haya posicionado en la orientación apropiada para la retirada de células. En otras realizaciones, el sedimento final pueden moverse automáticamente a un depósito en la cámara de salida 50 que puede retirarse y almacenarse o usarse según se necesite. Este depósito puede estar en cualquier forma o tamaño apropiados. Por ejemplo, el depósito puede ser una jeringa. En ciertas realizaciones, el depósito de salida 50 en sí mismo puede estar sellado por calor (automática o manualmente) y aislado de los otros componentes de la cámara de procesamiento para recuperación y uso posterior de las células regenerativas en aplicaciones terapéuticas como se describen en el presente documento incluyendo reinfusión en el paciente. Las células también pueden someterse a procesamiento adicional como se describe en el presente documento antes de la recuperación de la cámara de salida o después de la transferencia a un segundo sistema o dispositivo. El componente reutilizable mostrado en la Figura 14 se construye de modo que pueda conectarse con uno o más sistemas o dispositivos adicionales para procesamiento adicional según se necesite.

Como se describe en el presente documento, las células regenerativas derivadas de tejido adiposo obtenidas usando los sistemas y procedimientos de la presente invención pueden usarse para el tratamiento de enfermedades y trastornos cardiovasculares basándose en sus propiedades según se describe en los ejemplo. En consecuencia, en un aspecto de la presente invención se extraen células derivadas de tejido adiposo de un donante y se usan para inducir un beneficio terapéutico a miocardio dañado o degenerado u otro tejido cardiovascular a través de uno o más de los mecanismos demostrados en el presente documento. En una realización preferida las células se extraen del tejido adiposo de la persona en la que se van a implantar, reduciendo de este modo las complicaciones potenciales asociadas con respuestas antigénicas y/o inmunogénicas al trasplante. Los pacientes típicamente se evalúan para valorar el daño miocárdico o enfermedad por uno o más de los siguientes procedimientos realizados por un médico u otro especialista clínico: historia clínica del paciente, examen físico y datos objetivos incluyendo pero sin limitación EKG, perfil de enzimas cardíacas en suero y microcardiografía.

En una realización, el procedimiento de recogida se realiza antes de que el paciente reciba cualquier producto diseñado para reducir la coagulación sanguínea en relación con el tratamiento del infarto de miocardio. Sin embargo, en ciertas realizaciones, el paciente puede haber recibido aspirina y/u otras sustancias antiplaquetarias (es decir Clopidogrel) antes del procedimiento de recogida. Además, un procedimiento preferido incluye recogida de tejido adiposo antes de cualquier intento de procedimiento de revascularización. Sin embargo, como se entiende por los expertos en la materia, se espera que el momento de recogida varíe y dependerá de varios factores, incluyendo, entre otras cosas, la estabilidad de paciente, el perfil de coagulación del paciente, la disponibilidad del proveedor y los patrones de calidad de los cuidados. En última instancia, el momento de recogida se determinará por el facultativo responsable de administrar los cuidados al paciente afectado.

El volumen de tejido adiposo recogido del paciente puede variar de aproximadamente 0 cm³ a aproximadamente 2000 cm³ y en algunas realizaciones hasta aproximadamente 3000 cm³. El volumen de grasa retirada variará de paciente a paciente y dependerá de varios factores incluyendo pero sin limitación: edad, constitución corporal, perfil de coagulación, estabilidad hemodinámica, gravedad del infarto, co-morbilidades y preferencia del médico.

5 Las células pueden administrarse a un paciente en cualquier situación en la que la función miocárdica esté deteriorada. Los ejemplos de tales situaciones incluyen, pero sin limitación, infarto de miocardio agudo (ataque al corazón), insuficiencia cardíaca congestiva (como terapia o como preparación para trasplante), cardiomiopatías no isquémicas, (es decir tóxicas o infecciosas) y complementación de cirugía de injerto de derivación de arteria coronaria entre dos cosas. Las células pueden extraerse antes y almacenarse de un modo criopreservado o pueden
10 extraerse en o aproximadamente en el momento de necesidad definida. Como se desvela en el presente documento, las células pueden administrarse al paciente o aplicarse directamente al tejido dañado o en las proximidades del tejido dañado, sin procesamiento adicional o después de procedimientos adicionales para purificar, modificar, estimular o cambiar otro modo adicionalmente las células. Por ejemplo, las células obtenidas de un paciente pueden administrarse a un paciente que lo necesite sin cultivar las células antes de administrarlas al
15 paciente. En una realización, la recogida de tejido adiposo se realizará en la cabecera del paciente. El control hemodinámico puede usarse para controlar el estado clínico del paciente.

De acuerdo con la invención desvelada en el presente documento, las células derivadas de tejido adiposo pueden suministrarse al paciente poco después de recoger el tejido adiposo del paciente. Por ejemplo, las células pueden administrarse inmediatamente después del procesamiento del tejido adiposo para obtener una composición de
20 células regenerativas derivadas de tejido adiposo. En una realización, el momento preferido de suministro debería tener lugar entre horas y días después del infarto para aprovechar el ambiente neurohormonal e inflamatorio que existe después de la lesión cardíaca. En última instancia, el momento de suministro dependerá de la disponibilidad del paciente y el tiempo requerido para procesar el tejido adiposo. En otra realización, el momento de suministro puede ser relativamente más largo si las células a reinfundir al paciente se someten a modificación adicional,
25 purificación, simulación u otra manipulación, como se ha analizado en el presente documento. Además, las células derivadas de tejido adiposo pueden administrarse múltiples veces después del infarto. Por ejemplo, las células pueden administrarse continuamente durante un periodo prolongado de tiempo (por ejemplo, horas) o pueden administrarse en múltiples inyecciones de en bolo prolongadas durante un periodo de tiempo. En ciertas realizaciones, una administración inicial de células se administrará en un periodo de aproximadamente 12 horas
30 después de un infarto, tal como a las 6 horas y una o más dosis de células se administrarán a intervalos de 12 horas.

El número de células administrado a un paciente puede estar relacionado con, por ejemplo, el rendimiento celular después del procesamiento de tejido adiposo o el tamaño o tipo de la lesión. Una parte del número total de las células puede conservarse para uso posterior o criopreservarse. Además, la dosis suministrada dependerá de la vía
35 de administración de las células al paciente. Pueden necesitarse menos células cuando se emplean sistemas de suministro epicárdico o endocárdico, puesto que estos sistemas y procedimientos pueden proporcionar la ruta más directa para tratar afecciones cardiovasculares. En una realización de la invención, un número de células, por ejemplo, células purificadas, suministrada al paciente se espera que sea de aproximadamente $5,5 \times 10^4$ células. Sin embargo, este número puede ajustarse en órdenes de magnitud para conseguir el efecto terapéutico deseado.

40 Las células también pueden aplicarse con aditivos para potenciar, controlar o dirigir de otro modo el efecto terapéutico pretendido. Por ejemplo, en una realización, y como se describe en el presente documento, las células pueden purificarse adicionalmente mediante el uso de selección de células positiva y/o negativa mediada por anticuerpos para enriquecer la población celular para aumentar la eficacia, reducir la morbilidad o facilitar la realización del procedimiento. De forma similar, las células pueden aplicarse con una matriz biocompatible que
45 facilite la ingeniería tisular *in vivo* apoyando y/o dirigiendo el destino de las células implantadas. De la misma manera, pueden administrarse células después de manipulación genética de modo que expresen productos génicos que se cree que o se pretende que promuevan la respuesta o respuestas terapéuticas proporcionadas por las células. Los ejemplos de manipulaciones incluyen manipulaciones para controlar (aumentar o reducir) la expresión de factores que promueven la angiogénesis o vasculogénesis (por ejemplo VEGF), expresión de genes del
50 desarrollo que promueven la diferenciación a linajes celulares específicos (por ejemplo MyoD) o que estimulan el crecimiento y proliferación celulares (por ejemplo bFGF-1).

Las células también pueden someterse al cultivo celular en un material de almacén antes de implantarse. De este modo, las válvulas modificadas por ingeniería de tejido, parches ventriculares, pericardio, vasos sanguíneos y otras estructuras podrían sintetizarse en matrices naturales o sintéticas o almacenarse usando ADC antes de la inserción o
55 implantación en el receptor (Eschenhagen y col., 2002; Zimmermann y col., 2004; Zimmermann y col., 2002; Nerem y Ensley, 2004).

En una realización, se prefiere la administración directa de células al sitio de beneficio pretendido. Esto puede conseguirse por inyección directa en el miocardio a través de la superficie externa del corazón (epicárdica), inyección directa en el miocardio a través de la superficie interna (endocárdica) a través de inserción de una cánula adecuada, por infusión arterial o venosa (incluyendo mecanismos de flujo retrógrado) o por otros medios desvelados
60 en el presente documento o conocidos en la técnica tales como inyección pericárdica. Las vías de administración

conocidas para el experto en la materia, incluyen, pero sin limitación, intravenosa, intracoronaria, endomiocárdica, epimiocárdica, intraventricular, de seno coronario retrógrado o intravenosa.

Como se ha mencionado anteriormente, las células pueden aplicarse por varias vías incluyendo administración sistémica por infusión venosa o arterial (incluyendo infusión de flujo retrógrado) o por inyección directa en el músculo cardiaco o las cámaras. La administración sistémica, particularmente por acceso venoso periférico, tiene la ventaja de ser mínimamente invasivo dependiendo de la perfusión natural del corazón y la capacidad de las células derivadas de tejido adiposo de dirigirse al sitio de daño. Las células pueden inyectarse en un bolo sencilla, a través de una infusión lenta o a través de una serie escalonada de aplicaciones separadas por varias horas o, en tanto que las células se almacenan apropiadamente, varios días o semanas. Las células también pueden aplicarse mediante el uso de catéteres de modo que el primer pase de células a través del corazón se potencia; la aplicación puede mejorarse adicionalmente usando globos para controlar el flujo sanguíneo miocárdico. Como con el acceso venoso periférico, las células pueden inyectarse a través de los catéteres en un bolo sencilla o en múltiples alícuotas más pequeñas. Las células también pueden aplicarse directamente al miocardio por inyección epicárdica. Esta podría emplearse bajo visualización directa en el contexto de un procedimiento a corazón abierto (tales como Cirugía de Injerto de Derivación de la Arteria Coronaria) o colocación de un dispositivo de asistencia ventricular. Pueden emplearse catéteres equipados con agujas para suministrar células directamente en el miocardio de una manera endocárdica que permitiría un medio menos invasivo de aplicación directa.

En una realización, la vía de suministro incluirá suministro intravenoso a través de un catéter intravenoso periférico convencional, un catéter venoso central o un catéter arterial pulmonar. En otras realizaciones, las células pueden suministrarse a través de una vía intracoronaria a la que se accede mediante procedimientos actualmente aceptados. El flujo de células puede controlarse por inflación/deflación de globos distales y proximales localizados dentro de la vasculatura del paciente, creando de este modo zonas sin flujo temporales que promueven el injerto celular o la acción terapéutica celular. En otra realización, las células pueden suministrarse a través de un procedimiento endocárdico (superficie interior de la cámara cardiaca) que puede requerir el uso de un catéter compatible así como la capacidad de tomar imágenes o detectar el tejido diana pretendido. Como alternativa, las células pueden suministrarse a través del tejido diana pretendido. Como alternativa, las células pueden suministrarse a través de un procedimiento epicárdico (superficie exterior del corazón). Este suministro puede conseguirse a través de visualización directa en el momento de un procedimiento a corazón abierto o a través de un enfoque de toracoscopia que requiere instrumentos de suministro de células especializados. Además, las células podrían suministrarse a través de las siguientes vías, solas o en combinación con uno o más de los enfoques identificados anteriormente: subcutánea, intramuscular, sublingual, perfusión coronaria retrógrada, maquinaria de derivación coronaria, equipamiento de oxigenación de membrana extracorpórea (ECMO) y mediante una ventana pericárdica.

En una realización, las células se administran al paciente como un bolo intravascular o infusión temporalizada. En otra realización, las células pueden resuspenderse en un medio natural o artificial o almacén de tejido antes de administrarse al paciente.

La dosis celular administrada al paciente dependerá de la cantidad de tejido adiposo recogida y el índice de masa corporal del donante (como una medida de la cantidad de tejido adiposo disponible). La cantidad de tejido recogido se determinará por el alcance de la lesión o degeneración miocárdica. Múltiples tratamientos usando múltiples recogidas de tejido o usando una recogida única con almacenamiento apropiado de células entre las aplicaciones están dentro del alcance de la presente invención.

Partes del lipoaspirado procesado pueden almacenarse antes de administrarse a un paciente. Para almacenamiento a corto plazo (menos de 6 horas) las células pueden almacenarse a o por debajo de la temperatura ambiente en un depósito sellado con o sin complementación con una solución de nutriente. El almacenamiento a medio plazo (menos de 48 horas) se realiza preferentemente a 2-8 °C en una solución isosmótica tamponada (por ejemplo Plasmalyte[®]) en un depósito compuesto de o revestido con un material que evita la adhesión celular. El almacenamiento a mayor plazo se realiza preferentemente por criopreservación apropiada y almacenamiento de células en condiciones que promuevan la retención de función celular, tal como se desvela en la solicitud PCT transferida legalmente y del mismo solicitante número PCT/US02/29207, presentada el 13 de septiembre de 2002 y la solicitud Provisional de Estados Unidos número 60/322.070, presentada el 14 de septiembre de 2001.

De acuerdo con un aspecto de la invención, las células derivadas de tejido adiposo que se administran a un paciente pueden actuar como vehículos de suministro de factor de crecimiento. Por ejemplo, modificando por ingeniería genética las células para expresar uno o más factores de crecimiento adecuados para aliviar síntomas asociados con un trastorno o enfermedad cardiovascular, las células pueden administrarse a un paciente y modificarse por ingeniería genética para liberar uno o más de los factores de crecimiento. La liberación puede proporcionarse de una manera controlada durante periodos prolongados de tiempo. Por ejemplo, la liberación puede controlarse de modo que el factor o factores de crecimiento se liberen de una manera por pulsos o periódica de modo que existan elevaciones locales de factor de crecimiento y/o recesiones locales en la cantidad de factor de crecimiento en las proximidades de un área lesionada de tejido.

Las células que se administran al paciente no solamente ayudan a restaurar la función a tejidos dañados o de otro

modo no sanos, sino que también facilitan la reparación de los tejidos dañados.

El suministro de células puede tener lugar pero sin limitación en las siguientes localizaciones: clínica, oficina clínica, departamento de urgencias, servicio hospitalario, unidad de cuidados intensivos, quirófano, salas de cateterización y salas radiológicas.

- 5 En una realización, los efectos de terapia de suministro de células se demostraría por, pero sin limitación, una de las siguientes medidas clínicas: aumento de fracción de eyección cardiaca, reducción de la tasa de insuficiencia cardiaca, reducción del tamaño del infarto, aumento de la contractilidad (dP/dT), reducción del agarrotamiento ventricular (aumento en -dP/dT), reducción de la morbilidad asociada (edema pulmonar, insuficiencia renal, arritmias, revascularización de vasos diana), mejora de la tolerancia de ejercicio u otras medidas de calidad de vida y
- 10 reducción de la mortalidad. Los efectos de terapia celular pueden resultar evidentes a lo largo de días o semanas después del procedimiento. Sin embargo, los efectos beneficiosos pueden observarse tan temprano como varias horas después del procedimiento, y pueden persistir durante varios años.

- Los pacientes se controlan típicamente antes de y durante el suministro de las células. Los procedimientos de control incluyen, pero sin limitación: estudios de coagulación, saturación de oxígeno, control hemodinámico y control del ritmo cardiaco. Después del suministro de células, los pacientes pueden requerir un periodo de aproximadamente 24 horas de control de acontecimientos adversos. Los estudios de seguimiento para evaluar mejoras funcionales de los procedimientos pueden incluir y sin limitación: capacidad funcional del paciente (por ejemplo, disnea en el esfuerzo, disnea nocturna paroxísmica, angina) ecocardiografía, estudios de perfusión nuclear, imagen de resonancia magnética, topografía de emisión de positrones y angiografía coronaria.
- 15

- 20 Como se ha expuesto previamente anteriormente, en una realización preferida, las ADC, es decir, la población de células regenerativas derivadas de tejido adiposo activas, se administran directamente al paciente. En otras palabras, la población de células activas (por ejemplo, las células madre y/o células precursoras endoteliales) se administran al paciente sin retirarse del sistema o exponerse al ambiente externo del sistema antes de administrarse al paciente. Proporcionar un sistema cerrado reduce la posibilidad de contaminación del material que se administra al paciente. De este modo, el procesamiento del tejido adiposo en un sistema cerrado proporciona ventajas sobre los procedimientos existentes debido a que la población de células activas es más probablemente estéril. En una realización tal, el único momento en el que las células madre y/o células precursoras endoteliales se exponen al ambiente externo o se retiran del sistema, es cuando las células se están sacando a un dispositivo de aplicación y se administran al paciente. En una realización, el dispositivo de aplicación también puede ser parte del sistema
- 25
- 30 cerrado. De este modo, las células usadas en estas realizaciones no se procesan para cultivo o crioconservación y pueden administrarse a un paciente sin procesamiento adicional o puede administrarse a un paciente después de mezclarse con otros tejidos o células.

- En otras realizaciones, al menos una parte de la población de células activas se almacena para implantación/infusión posterior. La población puede dividirse en más de una alícuota o unidad de modo que parte de la población de células madre y/o células precursoras endoteliales se conserva para aplicación posterior mientras que parte se aplica inmediatamente al paciente. El almacenamiento de moderado a largo plazo de todas o parte de las células en un banco de células también está dentro del alcance de la presente invención, como se desvela en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 10/242.094, titulada CONSERVACIÓN DE CÉLULAS NO EMBRIONARIAS DE TEJIDOS NO HEMATOPOYÉTICOS, presentada el 12 de septiembre de 2002, que reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos 60/322.070 presentada el 14 de septiembre de 2001, que es de cesión común. Al final de procesamiento, las células concentradas pueden cargarse en un dispositivo de suministro, tal como una jeringa, para su colocación en el receptor por cualquier medio conocido para un experto en la materia.
- 35
- 40

- La población de células activas puede aplicarse sola o en combinación con otras células, tejido, fragmentos de tejido, factores de crecimiento tales como VEGF y otros factores de crecimiento angiogénicos o arteriogénicos conocidos, compuestos biológicamente inertes o activos, armazones plásticos reabsorbibles u otros aditivos pretendidos para mejorar el suministro, eficacia, tolerancia o función de la población. La población celular también puede modificarse por inserción de ADN o por colocación en cultivo celular de tal modo que cambie, mejore o complemente la función de las células para derivación de un fin estructural o terapéutico. Por ejemplo, las técnicas de transferencia génica para células madre se conocen por expertos en la materia, como se desvela en (Morizono y col., 2003; Mosca y col., 2000), y pueden incluir técnicas de transfección virales y más específicamente, técnicas de transferencia de genes de virus adenoasociados, como se desvela en (Walther y Stein, 2000) y (Athanasopoulos y col., 2000). También pueden realizarse técnicas no basadas en virus como se desvela en (Muramatsu y col., 1998).
- 45
- 50

- En otro aspecto, las células pueden combinarse con un gen que codifica factor o factores de crecimiento proangiogénicos y/o cardiomiogénicos que permitirían a las células actuar como su propia fuente de factor de crecimiento durante la reparación o regeneración cardiaca. También podrían aplicarse genes que codifican factores o agentes antiapoptóticos.
- 55

En ciertas realizaciones de la invención, las células se administran a un paciente con uno o más agentes de diferenciación celular, tales como citocinas y factores de crecimiento. Se desvelan ejemplos de diversos agentes de

diferenciación celular en (Gimble y col., 1995; Lennon y col., 1995; Majumdar y col., 1998; Caplan y Goldberg, 1999; Ohgushi y Caplan, 1999; Pittenger y col., 1999; Caplan y Bruder, 2001; Fukuda, 2001; Worster y col., 2001; Zuk y col., 2001).

5 La presente invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos que no deberían interpretarse de ningún modo como limitantes adicionales.

Ejemplos

Las células regenerativas derivadas de tejido adiposo usadas en los ejemplos expuestos posteriormente se obtuvieron por el procedimiento o procedimientos descritos en la presente divulgación.

Ejemplo 1: Expresión de Factor de Crecimiento Angiogénico, VEGF, por ADC

10 El Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF) es uno de los reguladores clave de la angiogénesis (Nagy y col., 2003; Folkman, 1995). El Factor de Crecimiento de Placenta, otro miembro de la familia de VEGF, desempeña un papel similar en angiogénesis así como en arteriogénesis, el procedimiento por el cual se reclutan vasos colaterales y se expanden en respuesta a perfusión aumentada y fuerza de cizallamiento (Nagy y col., 2003; Pipp y col., 2003; Scholz y col., 2003). Específicamente, el trasplante de células de tipo silvestre (PIGF +/+) a un ratón
15 knockout PIGF restaura la capacidad para inducir recuperación rápida de isquemia de las extremidades posteriores (Scholz y col., 2003).

Dada la importancia de tanto angiogénesis como arteriogénesis para el procedimiento de revascularización, la expresión de PIGF y VEGF por células regenerativas derivadas de tejido adiposo se examinó usando un ensayo
20 ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) usando células de tres donantes. Un donante tenía un historial de hiperglucemia y diabetes de Tipo 2 (una afección altamente asociada con enfermedad microvascular y macrovascular, incluyendo pacientes con enfermedad de arteria coronaria). Las células ADC de cada donantes se sembraron en placas a 1.000 células/cm² en medio DMEM/F-12 complementado con FCS 10 % y HS *5 % y se cultivaron hasta la confluencia. Se tomaron muestras de sobrenadante y se ensayaron con respecto a una expresión
25 de proteína PIGF y VEGF. Como se muestra en las Figuras 16A y 16B los resultados demuestran una expresión sólida de tanto VEGF (Figura 16A) como PIGF (Figura 16B) por las células regenerativas derivadas de tejido adiposo de la invención.

En un estudio separado, se midió la cantidad relativa de citocinas relacionadas con angiogénesis secretadas por células regenerativas cultivadas de ratones adultos normales. Las células regenerativas se cultivaron en alfa-MEM
30 con FBS 10 % hasta cinco días después de la confluencia celular, momento en el cual el medio de cultivo celular se recogió y se evaluó mediante análisis de serie de anticuerpos (RayBio[®] Mouse Cytokine Antibody Array II (RayBiotech, Inc.). Se detectaron los siguientes factores de crecimiento relacionados con angiogénesis: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), bFGF, IGF-II, Eotaxina, G-CSF, GM-CSF, IL-12 p40/p70, IL-12 p70, IL-13, IL-6, IL-9, Leptina, MCP-1, M-CSF, MIG, PF-4, TIMP-1, TIMP-2, TNF- α y Trombopoyetina. Los siguientes factores
35 de crecimiento relacionados con angiogénesis o citocinas se elevaron al menos dos veces en comparación con el medio de control blanco con FBS al 10 %: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), Eotaxina, G-CSF, IL-6, MCP-1 y PF-4.

Estos datos demuestran que las células regenerativas de la presente invención expresan una amplia serie de factores de crecimiento angiogénicos y arteriogénicos. Estos datos también demuestran que las células progenitoras y madre derivadas de tejido adiposo de pacientes tanto normales como diabéticos expresan factores de crecimiento
40 angiogénicos y arteriogénicos. Esto es importante puesto que los pacientes con diabetes tienen un riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular y estos datos indican que las células ADC conservan su capacidad angiogénica en situación diabética. El hallazgo de que un paciente diabético expresaba VEGF y PIGF a niveles equivalentes a los de los pacientes normales sugiere que los pacientes diabéticos pueden ser candidatos para terapia angiogénica por células regenerativas derivadas de tejido adiposo autólogas.

Ejemplo 2: ADC Contiene Poblaciones Celulares que Participan en Angiogénesis

Se sabe que las células endoteliales y sus precursores, células progenitoras endoteliales (EPC), participan en angiogénesis. Para determinar si las EPC están presentes en células regenerativas derivadas de tejido adiposo, se
evaluaron células regenerativas derivadas de tejido adiposo humanas con respecto a marcadores de superficie celular de EPC, por ejemplo, CD-34.

50 Se aislaron ADC por digestión enzimática de tejido adiposo subcutáneo humano. Se incubaron las ADC (100 μ l) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía suero bovino fetal (FBS) al 0,2 % que se incubaron durante 20 a 30 minutos a 4 °C con anticuerpos marcados con fluorescencia dirigidos hacia los marcadores endoteliales humanos CD-31 (marcador de células endoteliales diferenciadas) y CD-34 (marcador de EPC), así como ABCG2 humano (transportador de casete de unión a ATP), que se expresa de forma selectiva en células
55 multipotentes. Después de lavar, las células se analizaron en un clasificador FACSAria (Beckton Dickinson - Immunocytometry). La adquisición de datos y análisis se realizaron después por software FACSDiva (BD-Immunocytometry, CA). Los resultados (no mostrados) mostraron que las células regenerativas derivadas de tejido

adiposo de un adulto sano expresaban el marcador de EPC CD-34 y ABCG2, pero no el marcador de células endoteliales CD-31. Se detectaron células que expresaban el marcador de EPC CD-34 y ABCG2 a una frecuencia similar en células regenerativas derivadas de un donante con un historial de diabetes.

5 Para determinar la frecuencia de EPC en células regenerativas derivadas de tejido adiposo humano después de su cultivo en medio de diferenciación de células endoteliales, se sembraron células regenerativas en placas revestidas de fibronectina y se cultivaron en medio de células endoteliales durante tres días para retirar las células endoteliales maduras. Las células no adherentes se retiraron y se volvieron a sembrar en placas. Después de 14 días, se identificaron las colonias tiñendo con Aglutinina-1 *Ulex europaeus* conjugada con FITC (Vector Labs, Burlingame, CA) y LDL acetilada marcada con Dil (Molecular Probes, Eugene, OR). Como se muestra en la Figura 17, los resultados indican una frecuencia de EPC de aproximadamente 500 EPC/10⁶ células ADC.

La presencia de EPC dentro de las células regenerativas derivadas de tejido adiposo indican que esas células pueden participar directamente en el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos y mejorar la angiogénesis y restaurar la perfusión.

Ejemplo 3: Desarrollo *In Vitro* de Estructuras Vasculares en ADC

15 Un ensayo reconocido en la técnica para angiogénesis es uno en el que las células endoteliales cultivadas en una capa alimentadora de fibroblastos desarrollan una red compleja de tubos positivos para CD-31 reminiscente de una red capilar de nueva síntesis (Donovan y col., 2001). Puesto que las células regenerativas derivadas de tejido adiposo contienen células endoteliales, EPC y otros precursores de células del estroma, los inventores ensayaron la capacidad de estas células regenerativas para formar estructuras de tipo capilar en ausencia de una capa alimentadora. Las células regenerativas obtenidas de almohadillas de grasa inguinal de ratones normales desarrollaron redes capilares dos semanas después del cultivo (Figura 18A). Notablemente, las células regenerativas de ratones hiperglucémicos con diabetes Tipo 1 inducida por estreptozotocina (STZ) ocho semanas después de la administración de STZ formaron redes capilares equivalentes a las formadas por células de ratones normales (Figura 18B).

25 En un estudio posterior, se cultivaron células regenerativas derivadas de tejido adiposo en medio de cultivo completo (α -MEM complementado con FCS al 10 %) y sin factores de crecimiento adicionales. Estas células regenerativas también formaron redes capilares. Además, las estructuras vasculares formadas se tiñeron positivas para los marcadores de células endoteliales CD31, CD34, VE-cadherina y Factor von Willebrand/Factor VIII, pero no el marcador panlinfocítico, CD45.

30 Para comparar la capacidad de células regenerativas de ratones jóvenes frente a viejos para formar redes capilares, se cultivaron células regenerativas de ratones viejos y jóvenes normales (de 1, 12 ó 18 meses de edad) durante 2 semanas en medio de cultivo completo (α -MEM complementado con FCS al 10 %) y sin factores de crecimiento adicionales. Se observaron redes de tipo capilar equivalentes en cultivos de células regenerativas de todos los donantes (no mostrado).

35 Los datos anteriores demuestran que las células regenerativas derivadas de tejido adiposo de pacientes normales y diabéticos, así como jóvenes y ancianos pueden formar estructuras vasculares coherentes con la formación de redes capilares de nueva síntesis. En consecuencia, las células regenerativas de la invención pueden usarse para tratar insuficiencias angiogénicas.

Ejemplo 4: Desarrollo *In Vivo* de Estructuras Vasculares en ADC

40 El potencial angiogénico *in vitro*, aunque es prometedor, es de escaso valor si las células no ejercen actividad angiogénica *in vivo*. La inducción quirúrgica de isquemia de extremidades crítica en roedores es un modelo bien reconocido en el que pueden observarse procedimientos simultáneos de arteriogénesis (reclutamiento y expansión de vasos colaterales principalmente en respuesta a fuerza de cizallamiento aumentada) y angiogénesis (desarrollo de nuevos vasos en respuesta a isquemia) (Schatteman, 2000; Scholz, 2002; Takahashi, 1999). Este modelo se desarrolló en ratones inmunodeficientes (NOD-SCID) en los que pudo observarse la capacidad de las células humanas para restaurar la perfusión. Específicamente, se anestesiaron animales con xilacina (80mg/kg; 7,5 mg/kg) y se colocaron en la superficie de operación en posición supina. Se determinaron los valores del flujo sanguíneo preoperatorios para ambas extremidades posteriores como se describe posteriormente. Los animales se prepararon con betadine y se cubrieron de la manera estéril habitual y se colocaron en un baño de agua en circulación. Se realizó una incisión de 1,5 cm unilateral extendiéndose desde el origen de la extremidad posterior a las proximidades de la rodilla para exponer la arteria ilíaca, las proximidades de su bifurcación hacia las arterias femorales superficial y profunda. La vasculatura se ató con una ligadura de seda 3-0 en los siguientes sitios: 1) arteria iliaca próxima a su bifurcación, 2) distal del origen de la arteria femoral profunda, 3) proximal a la ramificación de la arteria femoral superficial. Después de la ligación, la vasculatura se retiró en bloque. Se hizo después un esfuerzo para identificar cualquier circulación colateral obvia que se ligó y se retiró posteriormente. La herida y la capa de músculo se cerraron con vicryl 4-0 y la piel se cerró con sutura de vicryl 5-0. Los animales se trataron después de la operación con buprenorfina (0,5 mg/kg) y se recuperaron en el baño de agua circulatoria hasta posición recostada espontánea. Veinticuatro horas después de la cirugía se inyectó a los animales 5x10⁶ células

ADC a través de la vena de la cola. Se inyectó a los ratones NOD-SCID células de donante humano, incluyendo en un estudio, células de un paciente con diabetes. Se formaron imágenes del flujo 14 días después del tratamiento.

5 En estos estudios, los animales tratados con ADC mostraron mejora estadísticamente significativa en la retención de estructuras de las extremidades (recuperación de extremidades; 2/3 ratones no tratados perdieron todas las estructuras de las extremidades posteriores en comparación con 0/5 animales tratados con ADC) y restauración del flujo (Figura 19). De forma más notable, en ratones NOD SCID que recibieron células de donante humano diabético, el flujo al día 14 se restauró a 50 ± 11 % en animales tratados en comparación con 10 ± 10 % en animales no tratados ($p < 0,05$). El día 19 se había producido rebote de modo que la perfusión en las extremidades experimentales era mayor que la del control (136 ± 37 %). Esta respuesta está dentro del intervalo observado con
10 células obtenidas de dos donantes normales (no diabéticos) ($50-90$ %).

En un experimento similar en ratones inmunocompetentes (ratones 129S) en los que los péptidos de transferencia de células autólogas pudo determinarse. Los ratones tratados con células ADC mostraron 80 ± 12 % de restauración del flujo el día 14 en comparación con 56 ± 4 % en ratones no tratados.

15 En este modelo la restauración del flujo sanguíneo viene del reclutamiento y la expansión de vasos colaterales y por angiogénesis en las extremidades inferiores. Estos procedimientos también son clave para la restauración del flujo en el corazón después del infarto. Por lo tanto, la capacidad de ADC para estimular estos procedimientos *in vivo* apoya fuertemente la aplicación de células ADC en la situación de infarto de miocardio. También es importante observar que las células ADC obtenidas de un donante diabético (un miembro de una población de pacientes con mayor riesgo de enfermedad cardiovascular) también demostró esta actividad.

20 **Ejemplo 5: Aumentar la dosis de ADC Está Asociado con Angiogénesis y Supervivencia de Injerto Mejorada**

El trasplante de tejido adiposo autólogo es un procedimiento relativamente común en cirugía plástica y reconstructiva (Fulton, 1998; Shiffman, 2001). Sin embargo, este procedimiento está limitado por el hecho de que los fragmentos de tejido adiposo se transfieren sin un aporte vascular y, como resultado, la supervivencia de injertos depende de la neovascularización (Coleman, 1995; Eppley y col., 1990). Por lo tanto, de una manera limitada, el
25 tejido trasplantado representa un tejido isquémico.

Se realizó un estudio en ratas Fisher en el que los fragmentos de tejido adiposo se trasplantaron en el espacio subcutáneo sobre los músculos del muslo exterior. La pata derecha se trasplantó con 0,2 g de fragmentos de tejido adiposo solamente, la pata izquierda con 0,2 g de fragmentos de tejido adiposo complementados por la adición de células regenerativas derivadas de tejido adiposo a tres diferentes dosis ($1,7 \times 10^5$ - $1,3 \times 10^6$ células/injerto; tres
30 animales por dosis); de esta manera la pata contralateral actuó como un control. Los animales se mantuvieron después durante un mes después del cual los animales se sacrificaron y se recuperaron los injertos, se pesaron, se fijaron en formalina y se incluyeron en parafina para análisis histológico.

Como se muestra en la Figura 20A, los resultados muestran retención mínima de tejido injertado en la pata control y un incremento dependiente de dosis en la retención de peso del injerto en la pata tratada. Además, el análisis inmunohistoquímico de los injertos mostró neoangiogénesis considerable y perfusión en los injertos tratados con células regenerativas derivadas de tejido adiposo (Figura 20B, flechas). Esto también se asoció con retención de morfología del tejido adiposo (Figura 20B).
35

Como anteriormente, la demostración de que las células ADC promueven la supervivencia de tejido isquémico perfundido de forma inadecuada es un importante indicio de potencial clínico en enfermedad cardiovascular.

40 **Ejemplo 6: Injerto Miocárdico por ADC**

La criolesión al miocardio es un modelo quirúrgico bien establecido para investigar el papel de la terapia celular en regeneración miocárdica (Marchlinski y col., 1987). Para demostrar la capacidad de las células ADC para injertarse en el miocardio dañado y de este modo inhibir la formación de cicatriz (reticulación y deposición de colágeno), se realizó criolesión miocárdica en ratones B6129SF1/J. Inmediatamente después de la lesión, se inyectó 1 millón ($1,0 \times 10^6$) de células ADC recogidas de ratones ROSA26 que son transgénicos para el gen lacZ mediante una vía intraventricular. El tejido cardíaco del receptor teñido con B-galactosidasa detectará la presencia de células regenerativas derivadas de tejido adiposo del donante por tinción azul. Los corazones de los ratones se recogieron y procesaron en los siguientes 5 puntos temporales después de la inyección: día 1, día 7, día 14, día 28, día 84. Como se muestra en la Figura 10, los resultados demuestran injerto de células regenerativas de tejido adiposo derivadas
50 del donante en el área de miocardio infartado en todos los puntos temporales referenciados anteriormente. La Figura 21 demuestra una línea temporal histológica del injerto.

Resulta importante destacar que el análisis inmunohistoquímico de células derivadas de donante (positivas para beta galactosidasa) el día 14 indicó que muchas células derivadas de donante expresaban los marcadores de miocitos cardiacos cadena pesada de miosina sarcomérica (Figura 22), troponina I y nkx2.5. Esto indica que las células ADC son capaces de dirigirse al sitio de lesión en un corazón dañado y de diferenciarse en miocitos cardiacos o células de tipo miocito cardíaco. Por lo tanto, las células ADC pueden ser capaces de reponer los miocitos cardiacos o células de tipo miocito cardíaco que se pierden después de un ataque al corazón (infarto de
55

miocardio).

Para extender estos hallazgos entre especies, se estudió el injerto de lipoaspirado procesado derivado de donante en un modelo del corazón de reperfusión/oclusión en rata. En esta preparación experimental, la arteria coronaria descendiente anterior izquierda de una rata Wistar inmunocompetente se ocluyó temporalmente usando una sutura de prolono 7-0 y un pequeño trozo de tubos silastic que actúan como un lazo sobre la arteria. Después de una hora, la oclusión se liberó y se permitió que la sangre volviera a perfundir al miocardio isquémico. Este modelo representa de forma más cercana los mecanismos de lesión y reparación presentes en el paradigma clínico humano. Inmediatamente después de la reperfusión, aproximadamente 1 millón (1×10^6) de células ADC obtenidas de ratones Rosa 26 se inyectaron en la cámara ventricular izquierda del corazón. Los corazones se recogieron una semana después de la inyección. Como se muestra en la Figura 23, los resultados demuestran injerto de células ADC derivadas de donante.

Por lo tanto, las células regenerativas de la presente invención son clínicamente relevantes y tienen el potencial de mejorar la perfusión y regenerar el miocardio dañado.

Ejemplo 7: Las ADC Mejoran la Función Cardíaca Después de Infarto Agudo de Miocardio en Ratas

El Infarto Agudo de Miocardio (“AMI”) da como resultado miocardio isquémico que inicia una serie negativa de acontecimientos que conduce con el tiempo a insuficiencia cardíaca congestiva. La cardiomioplastia celular usando ADC tiene el potencial de alterar esta progresión proporcionando células regenerativas para reemplazar/ reparar las células del huésped dañadas por la isquemia. Este ejemplo describe un modelo animal pequeño de infarto de miocardio y demuestra la mejora funcional en los animales que reciben un bolo de ADC.

Se indujo infarto de miocardio por una ligación de 60 minutos de la arteria coronaria descendiente anterior izquierda (LAD) en ratas hembra Lewis (250-300 gramos). Se diluyeron aleatoriamente dieciocho ratas en dos grupos: (1) tratadas con ADC (n = 10) o (2) tratadas con solución salina (n = 8). Para animales tratados con ADC, se introdujeron cinco millones de ADC en la cavidad ventricular izquierda, una aproximación del suministro intracoronario, 15 minutos después de la perfusión. Se tomaron análisis ecocardiográficos antes del infarto y 4, 8 y 12 semanas después de AMI. Tras la compleción del estudio, se tomaron mediciones de contractilidad invasivas para analizar la contractilidad/relajación del ventrículo izquierdo. Después se detuvieron los corazones en diástole y se prepararon para análisis histológico.

El análisis de contractilidad y Eco a las 12 semanas después de MI reveló que las ratas tratadas con ADC en comparación con solución salina tuvieron una mejora significativa de la fracción de eyección ($76,0 \pm 0,9$ % frente a $68,3 \pm 1,9$ %, $p < 0,01$, Figura 24); contractilidad base (+dP/dT: $730,76 \pm 73,25$ kPa frente a $377,40 \pm 40,06$ kPa, $p < 0,05$, Figura 25); relajación base (-dP/dT: $-841,40 \pm 732,43$ frente a $-361,29 \pm 44,13$ kPa, $p < 0,05$, Figura 26); y parámetros de remodelación, incluyendo grosor de tabique ventricular (diástole: $1,23 \pm 0,03$ mm frente a $1,50 \pm 0,11$ mm; $p < 0,05$, Figura 27). El tratamiento con ADC también evitó la progresión de dilatación ventricular, evidente en grosor de tabique ventricular (sístole, Figura 28) y grosor de la pared posterior (tanto en diástole (Figura 29) como en sístole (Figura 30)).

Ejemplo 8: Las ADC Mejoran la Función en un Modelo Porcino de AMI

Como se ha demostrado anteriormente, las ADC pueden mejorar la función cardíaca después de AMI en animales pequeños. Este estudio demuestra que algunos de estos beneficios funcionales también pueden observarse en animales grandes. Este estudio también demuestra que el suministro intravascular de ADC en la arteria coronaria descendiente anterior izquierda (“LAD”) es segura y factible.

Se indujo un infarto de miocardio antero-apical en 13 cerdos juveniles por oclusión con globo de la LAD media. Cuarenta y ocho horas después del infarto, se recogió tejido adiposo a través de una lipectomía inguinal derecha, se aislaron ADC autólogas y se seleccionaron aleatoriamente los cerdos para una infusión intracoronaria de solución salina (control) o 40-140 millones (media 52×10^6) de ADC infundidas distalmente al sitio de oclusión en la LAD. Se realizaron angiografía coronaria, cineangiografía ventricular izquierda (LV) y ecocardiografía de dos dimensiones en el momento inicial, antes del infarto, inmediatamente después del infarto y a los seis meses.

Los 13 cerdos (7 tratados con ADC, 6 control) sobrevivieron al periodo posterior de seis meses con flujo coronario de TIMI-3 en la LAD y sin acontecimientos cardíacos adversos importantes. Como demuestra la Figura 31, la fracción de eyección ventricular izquierda (“LVEF”) por ecocardiografía, medible en 10 cerdos, aumentó significativamente en el grupo de infusión de células ($3,0$ % \pm $6,0$ %, media \pm DT) frente al grupo control ($-9,0$ % \pm $5,0$ %, $p = 0,01$). La LVEF por cineangiografía (n=12) mostró una tendencia similar con valores de $3,7$ % \pm $5,0$ % frente a $-2,0$ % \pm $7,5$ %, respectivamente ($p = 0,16$). Los resultados se resumen en la Tabla IV a continuación. En resumen, estos resultados muestran que las ADC provocan mejoras significativas de la función cardíaca en animales grandes y que el suministro de ADC es seguro y eficaz en la conservación de función sistólica ventricular.

Tabla IV

| Procedimiento de Diagnóstico | LVEF en el Momento Inicial | LVEF a los 6 Meses | Cambio en LVEF | Desviación Típica | P-valor |
|------------------------------|----------------------------|--------------------|----------------|-------------------|---------|
| Ecocardiografía en 2D | - | | | | |
| Tratado | 46 % | 49 % | + 3 % | ± %6 % | 0,01 |
| Control | 47 % | 38 % | -9 % | ± %5 % | |
| Cineangiografía | - | | | | |
| Tratado | 51 % | 55 % | +4 % | ± %5 % | 0,16 |
| Control | 49 % | 47 % | -2 % | ± %7 % | |

Ejemplo 9: Tratamiento de Daño Cardíaco Agudo

5 El infarto de miocardio agudo (ataque al corazón) da como resultado lesión isquémica al miocardio. El daño tisular puede minimizarse por reperfusión temprana del tejido dañado y por regeneración de tejido miocárdico (Murry y col., 1996; Orlic y col., 2001; Orlic y col., 2003; Rajnoch y col., 2001; Strauer y col., 2002; Assmus y col., 2002). La terapia celular derivada de tejido adiposo, como se ha desvelado en el presente documento, busca proporcionar una fuente superior de células regenerativas en relación con terapias celulares derivadas de tejido no adiposo, debido a por ejemplo al menos uno del uso de una mayor variedad de células no cultivadas y células más puras con morbilidad atenuada asociada con terapias derivadas de tejido no adiposo, tales como recogida de médula ósea.

10 Se sospecha que un paciente ha padecido un infarto de miocardio. El paciente se ingresa en un periodo de una hora desde la experimentación del infarto. Se prescribe al paciente una terapia celular derivada de tejido adiposo. Se examina la constitución del paciente con respecto a un sitio adecuado para recogida de tejido adiposo. Los sitios de recogida se caracterizan por al menos uno de los siguientes: espacio o espacios potenciales limitados por estructuras anatómicas normales, sin estructuras viscerales o vasculares principales en riesgo de daño, y facilidad de acceso. Se prefieren sitios de recogida vírgenes, pero un sitio de recogida previo no evita recogida de tejido adiposo adicional. Los sitios de recogida potenciales incluyen, pero sin limitación, los siguientes: regiones lateral y media del muslo de extremidades inferiores bilaterales, pannus de la pared abdominal anterior y regiones flanqueantes bilaterales.

20 El paciente recibe una inyección subcutánea de una solución fluida tumescente que contiene una combinación de lidocaína, solución salina y epinefrina en por ejemplo diferentes regímenes de dosificación normalizados. Usando un escalpelo (por ejemplo, un escalpelo de hoja 11), se realiza una pequeña herida perforante en la región media del muslo del paciente en su pierna derecha y/o izquierda para atravesar la dermis. La hoja se gira 360 grados para completar la herida. Se inserta una cánula de punta roma (por ejemplo, una cánula de calibre 14) en el plano del tejido adiposo subcutáneo debajo de la incisión. La cánula se conecta a un dispositivo de succión asistido por electricidad. La cánula se mueve a través del plano de tejido adiposo para romper la arquitectura de tejido conectivo. Se obtienen aproximadamente 500 cm³ de aspirado. Después de la retirada del tejido adiposo, se consigue la hemostasis con técnicas quirúrgicas convencionales y la herida se cierra.

30 El lipoaspirado se procesa de acuerdo con los procedimientos desvelados en el presente documento anteriormente para obtener una unidad de células madre derivadas de tejido adiposo concentradas. Aproximadamente seis horas después del infarto, se administran las células madre al paciente. Basándose en el procesamiento de lipoaspirado, se estima que el paciente recibe una dosis inicial de células madre en un intervalo de entre aproximadamente 5,5 x 10⁴ células madre y 5,5 x 10⁵ células madre. El paciente recibe dos dosificaciones complementarias a intervalos de 12 horas después de la administración inicial. Las células madre pueden administrarse al paciente a través de un catéter venoso central. En otras realizaciones para promover el injerto celular en la región de diana el flujo de células madre se controla por un globo localizado corriente abajo del sitio diana y por un globo corriente arriba del sitio diana para crear regiones de flujo sanguíneo mínimo o bajo.

40 Se observan mejoras en el paciente en un periodo de aproximadamente seis horas después del procedimiento de administración de las células. Varios días después del procedimiento de administración de las células se observa mejora adicional del paciente manifestada por aumento de la fracción de eyección cardíaca, reducción de la tasa de insuficiencia cardíaca, reducción del tamaño del infarto, mejora de la tolerancia a ejercicio y otras medidas de calidad de vida.

Cualquier característica o combinación de características descritas en el presente documento se incluyen dentro del alcance de la presente invención con tal de que las características incluidas en cualquier combinación tal no sean

5 mutuamente incoherentes como resultará evidente a partir del contexto, la presente memoria descriptiva y el conocimiento de un experto en la materia. Para los fines de resumir la presente invención, ciertos aspectos, ventajas y características nuevas de la presente invención se han descrito en el presente documento. Por supuesto, debe entenderse que no necesariamente todos los aspectos, ventajas o características tales se incorporarán en ninguna realización particular de la presente invención. Ventajas y aspectos adicionales de la presente invención resultarán evidentes en la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

10 Las realizaciones anteriormente descritas se han proporcionado como ejemplo y la presente invención no se limita a estos ejemplos. Aparecerán múltiples variaciones y modificaciones de las realizaciones desveladas, hasta el punto no mutuamente exclusivo, para los expertos en la materia tras la consideración de la descripción anterior. Adicionalmente, otras combinaciones, omisiones, sustituciones y modificaciones resultarán evidentes para el experto en la materia a la vista de la divulgación del presente documento. En consecuencia, no se pretende que la presente invención esté limitada por las realizaciones desveladas, sino que debe definirse por referencia a las reivindicaciones adjuntas.

Se han citado varias publicaciones y patentes anteriormente en el presente documento.

15 **Equivalentes**

Los expertos en la materia reconocerán o serán capaces de determinar usando nada más que experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una población concentrada de células que comprende células madre derivadas de tejido adiposo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno **caracterizado por** función cardiaca insuficiente, perfusión insuficiente, miocardio dañado o remodelación de tejido cardiaco.
- 5 2. El uso de la reivindicación 1, en el que dicha población concentrada de células que comprende células madre derivadas de tejido adiposo comprende adicionalmente células progenitoras derivadas de tejido adiposo.
3. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho trastorno es insuficiencia cardiaca.
4. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho trastorno es infarto de miocardio.
- 10 5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho medicamento se formula para administración en un bolo.
6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicho medicamento se formula para administración en múltiples dosis.
7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho medicamento comprende adicionalmente un factor angiogénico.
- 15 8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que dicho medicamento comprende adicionalmente al menos un factor arteriogénico.
9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que dicho medicamento comprende adicionalmente uno o más fármacos inmunosupresores.
- 20 10. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que dicho medicamento se formula para administración mediante una vía endomiocárdica, epimiocárdica, intraventricular, intracoronaria, de seno coronario retrógrado, intraarterial, intrapericárdica o intravenosa.
11. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que dicha población concentrada de células que comprende células madre derivadas de tejido adiposo se modifica por transferencia génica.
- 25 12. El uso de la reivindicación 1, en el que dicha población concentrada de células que comprende células madre derivadas de tejido adiposo comprende adicionalmente un aditivo.
13. El uso de la reivindicación 12, en el que el aditivo se selecciona del grupo que consiste en un factor de crecimiento, un agente inmunosupresor, un inhibidor de reagregación celular.
14. El uso de la reivindicación 1, en el que la población concentrada de células que comprende células madre derivadas de tejido adiposo no se ha cultivado.
- 30 15. El uso de la reivindicación 1, en el que la población concentrada de células que comprende células madre derivadas de tejido adiposo se aísla en un sistema que se configura para mantener una ruta de fluido/tejido estéril cerrada.

Figura 1

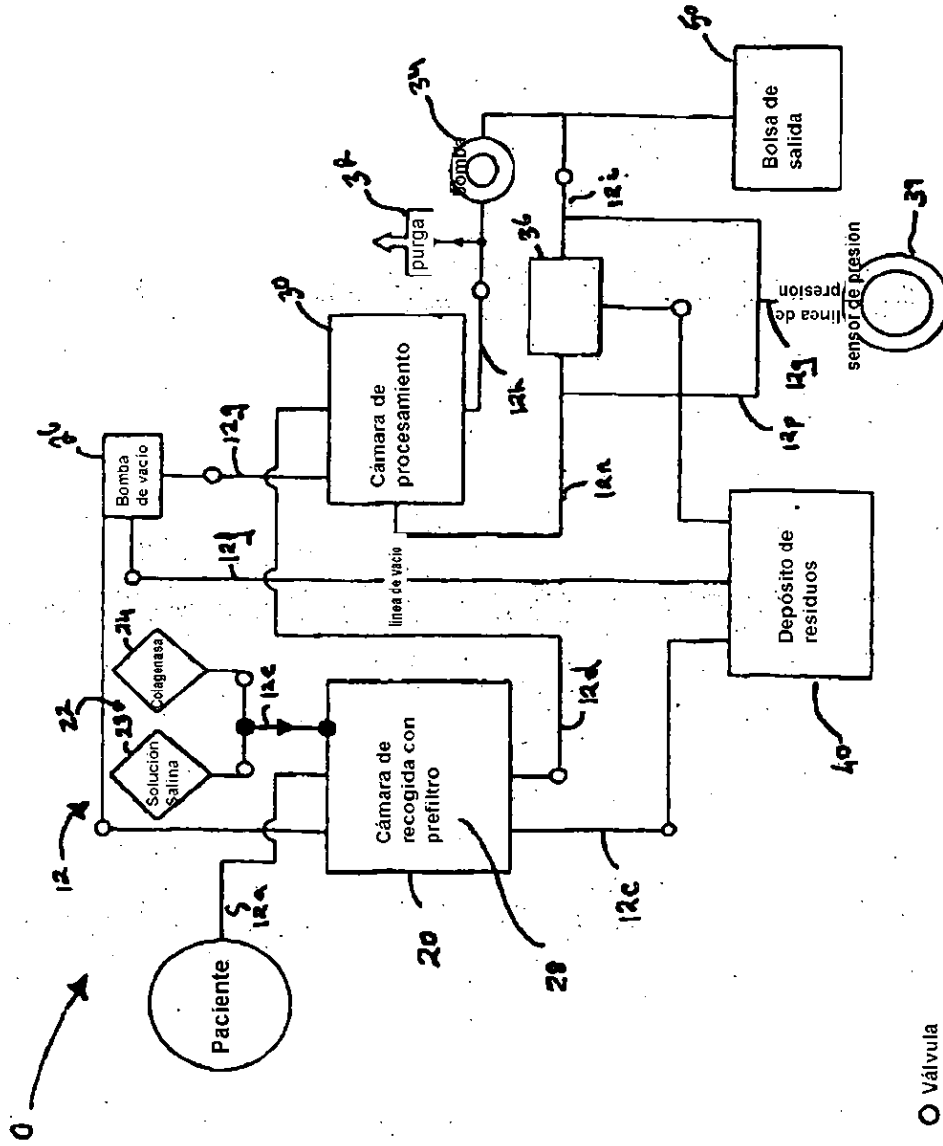
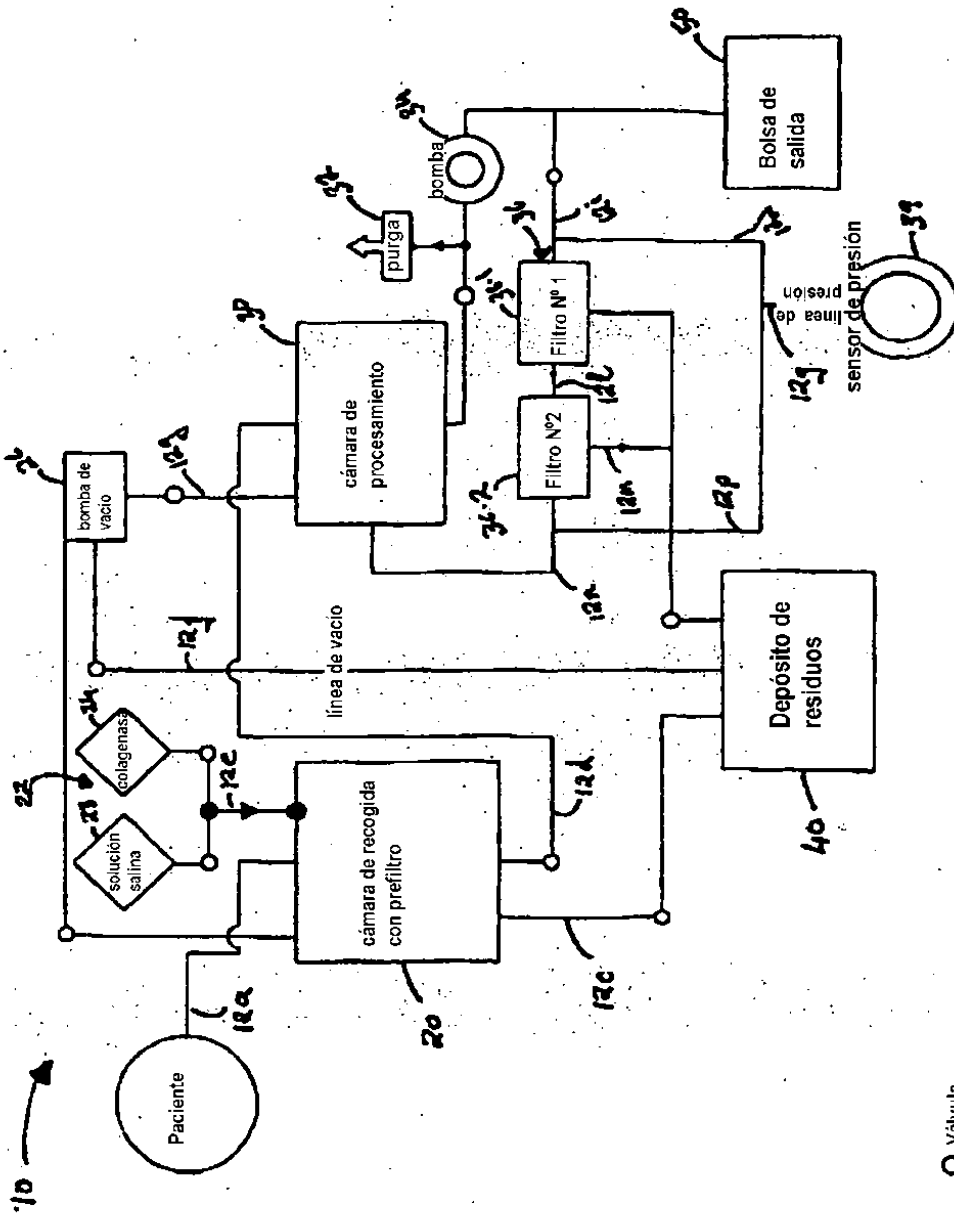


Figura 2



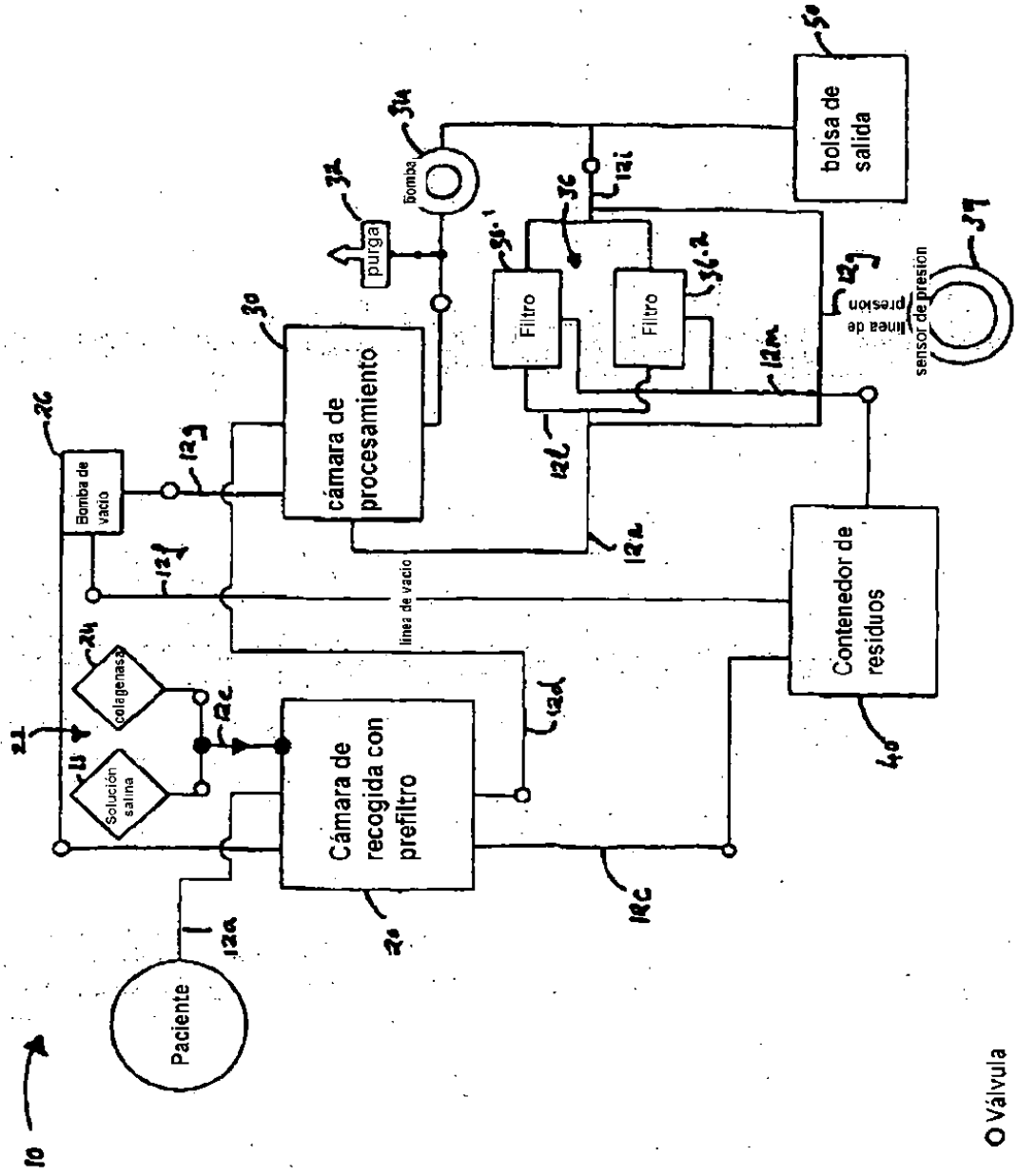


Figura 4

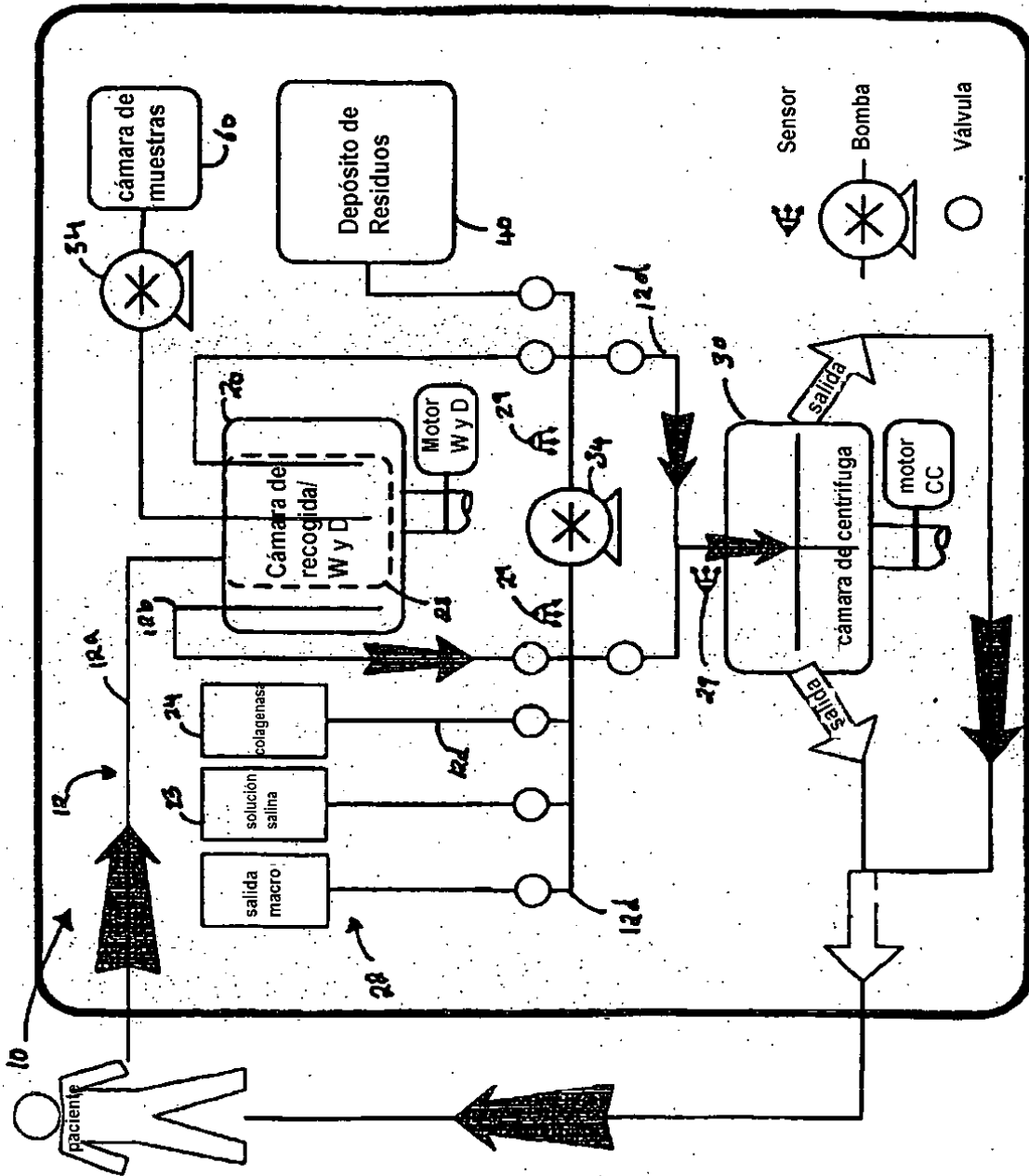


Figura 5

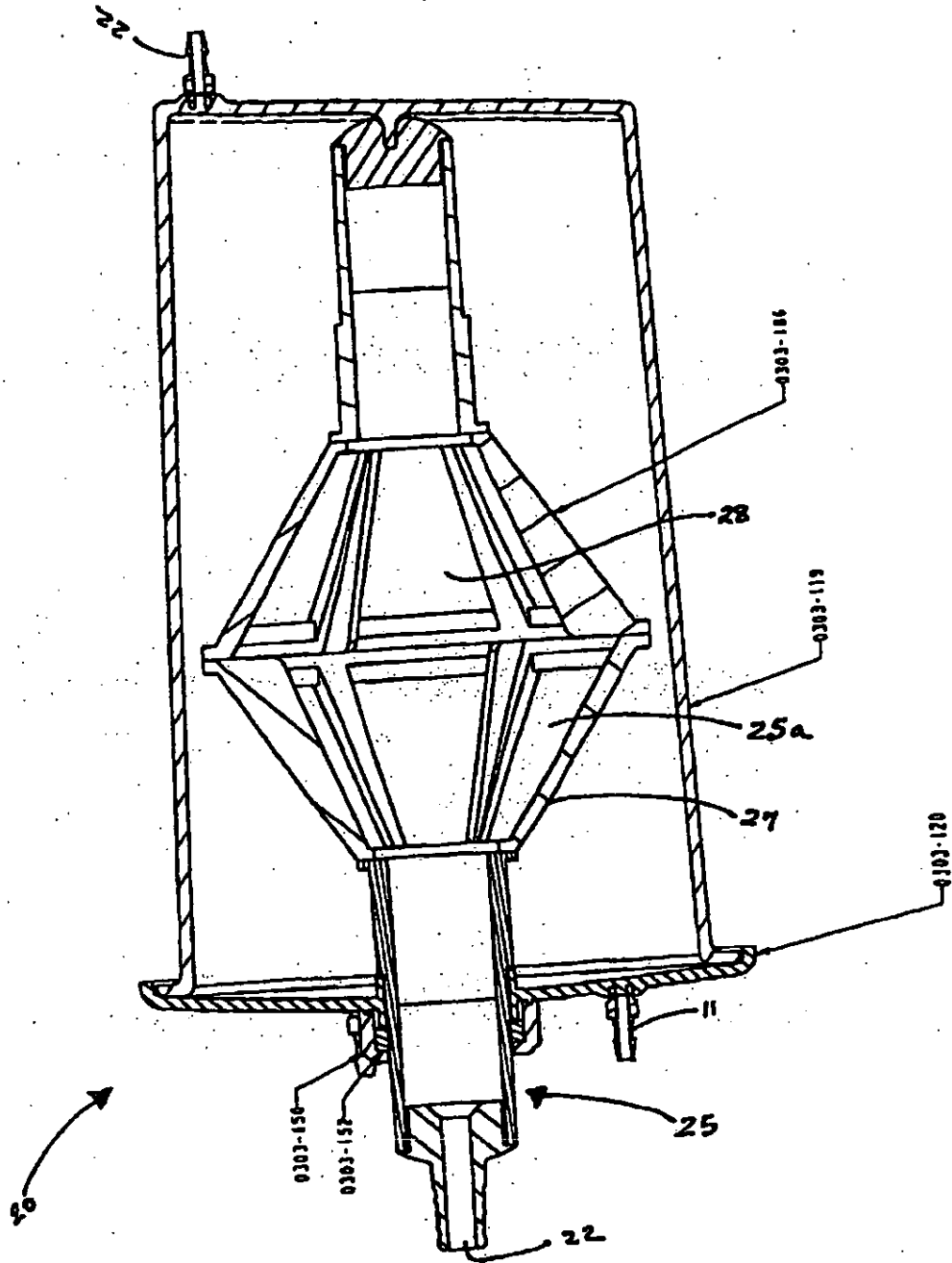


Figura 6

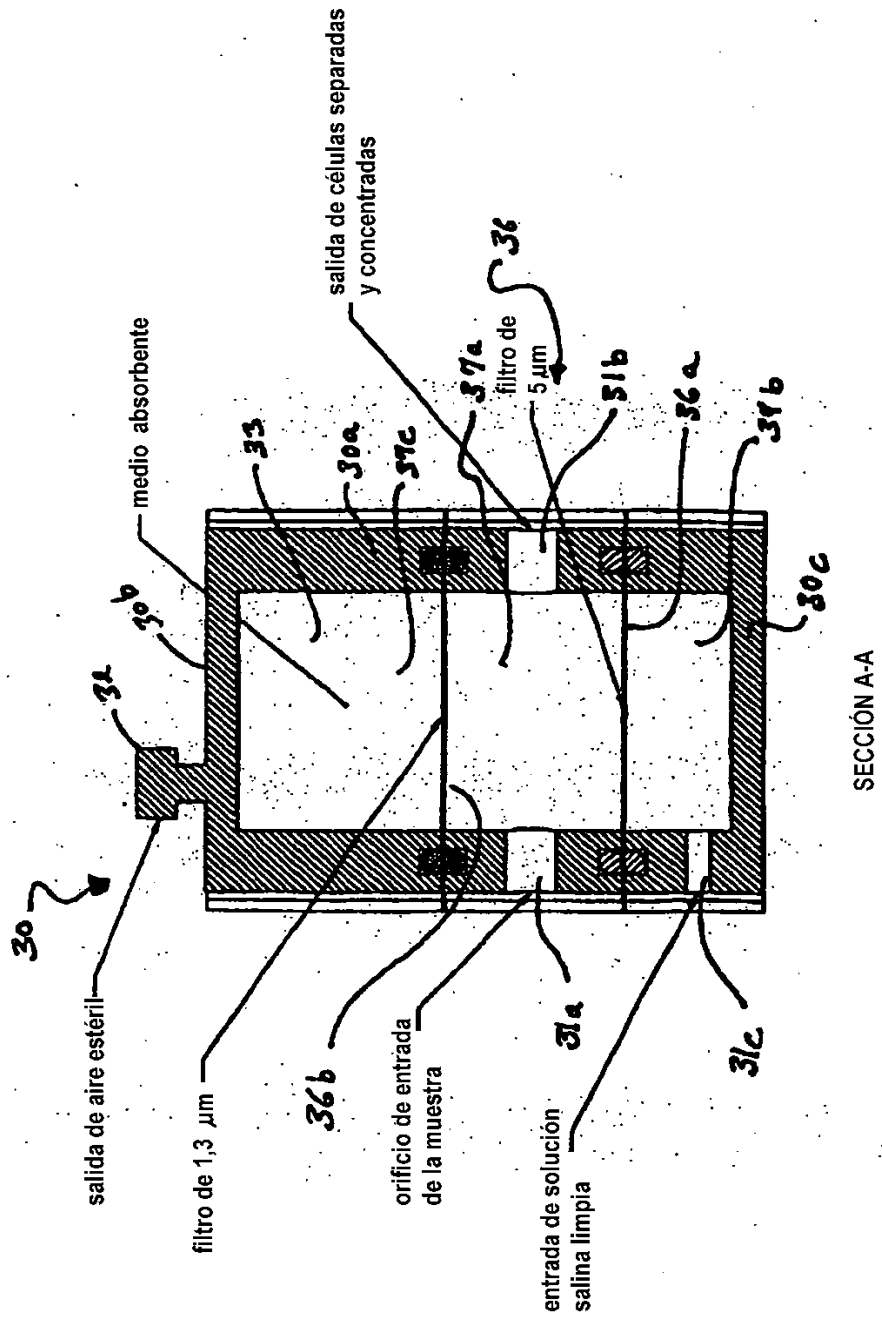


Figura 7

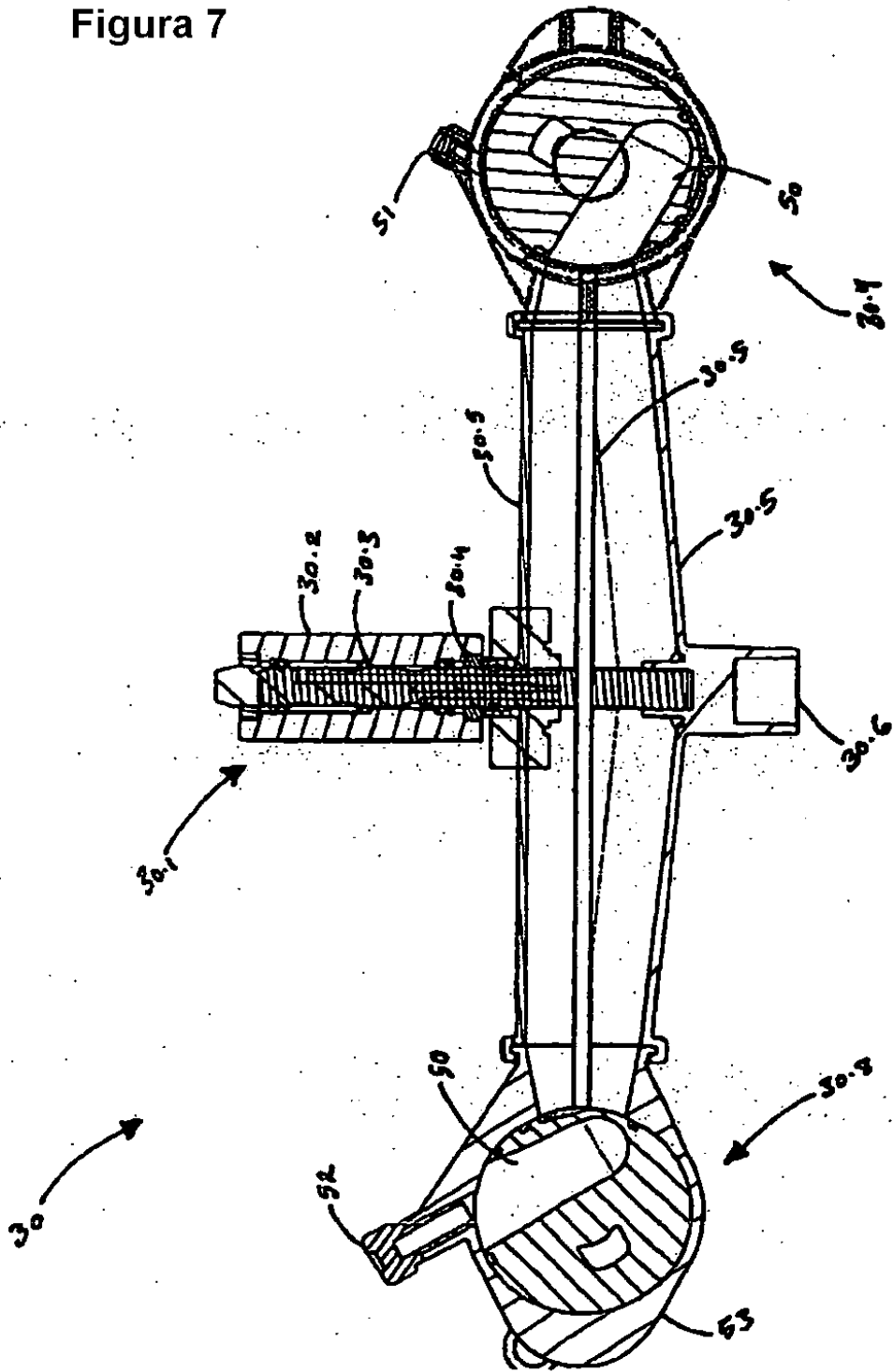


Figura 8

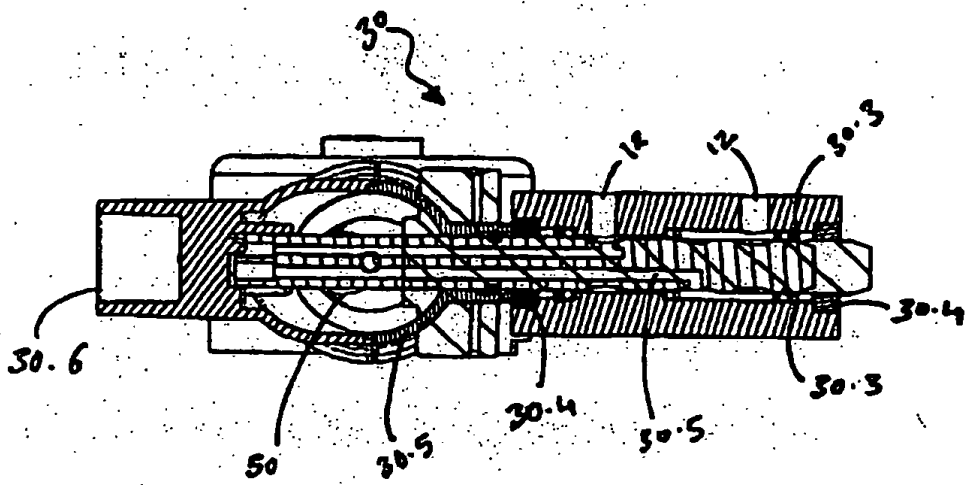


Figura 9

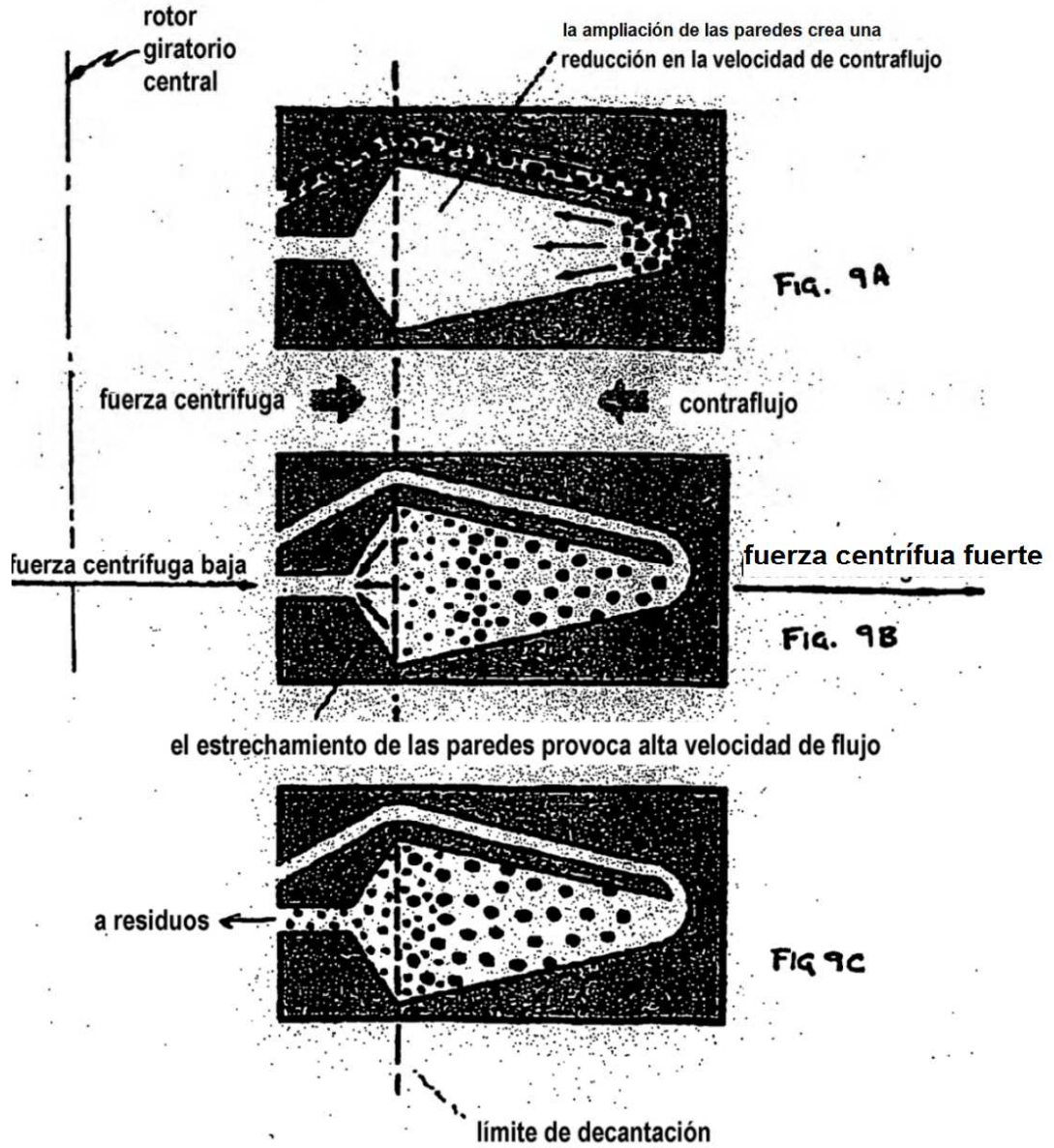


Figura 10

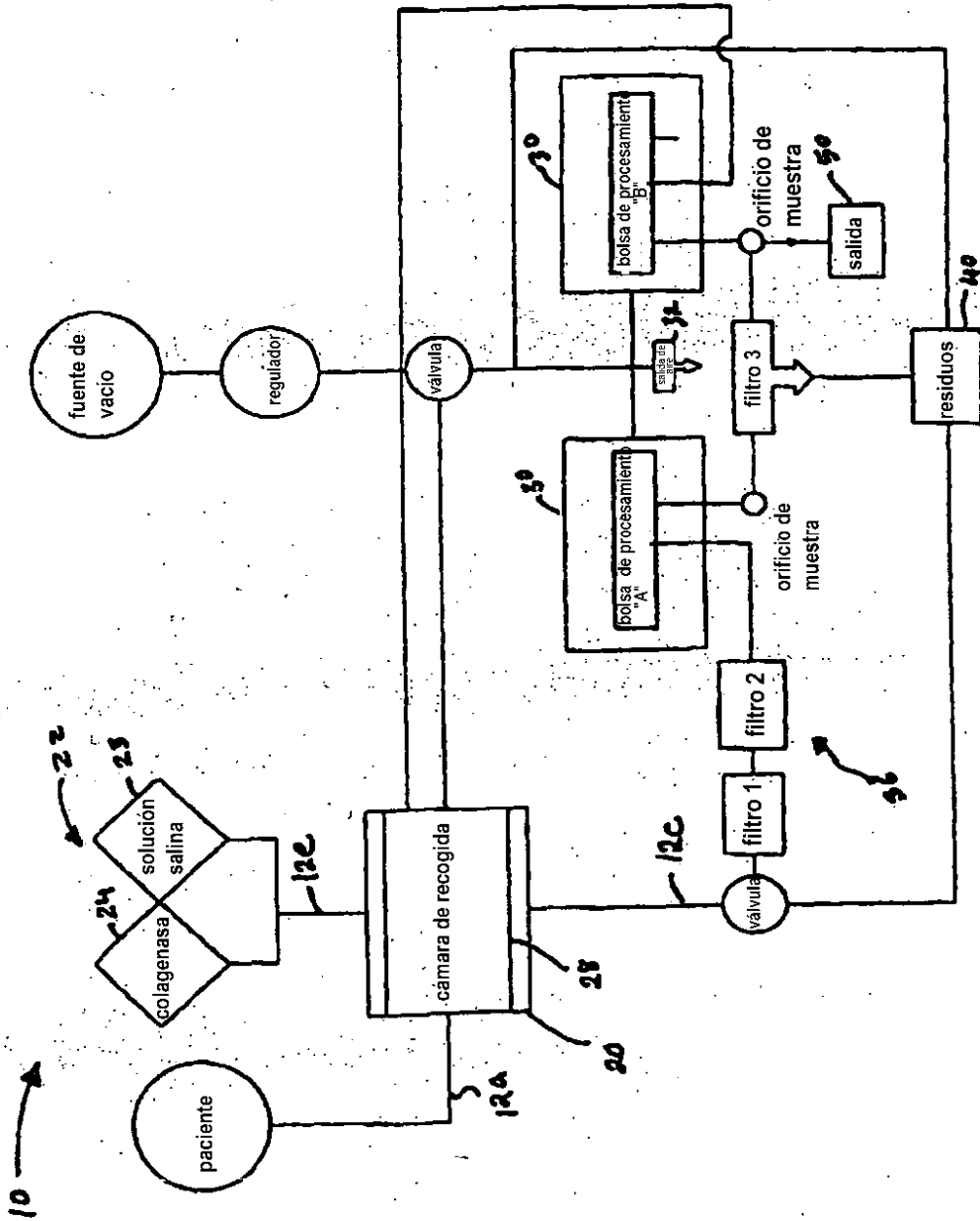


Figura 11

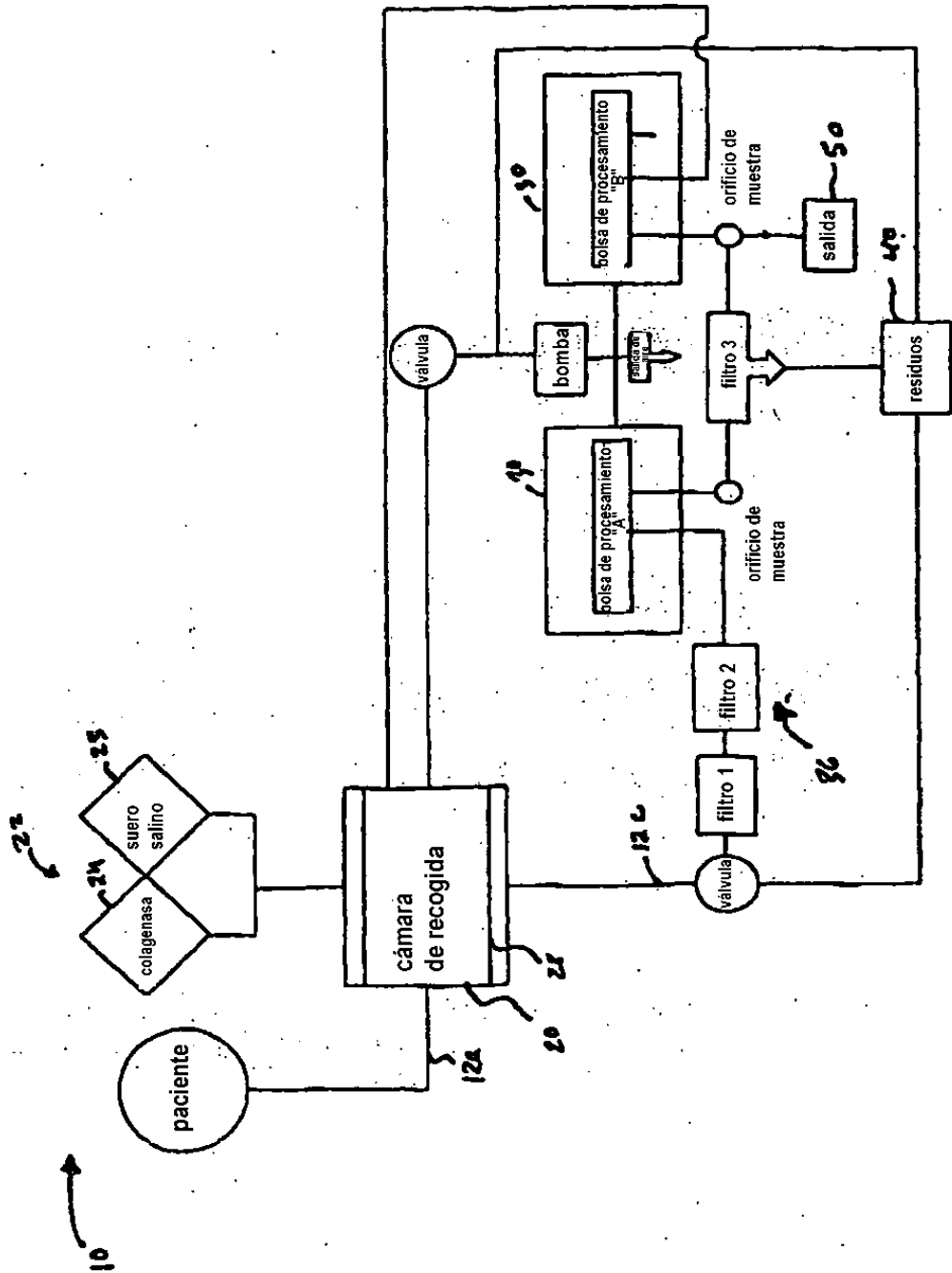


Figura 12

flujo tangencial frente a filtración sin salida



PERMEADO
filtración de flujo cruzado tangencial
(alta velocidad de permeado)

Figura 12A

corriente de suministro



PERMEADO
filtración sin salida
(baja velocidad de permeado)

Figura 12B

Figura 13

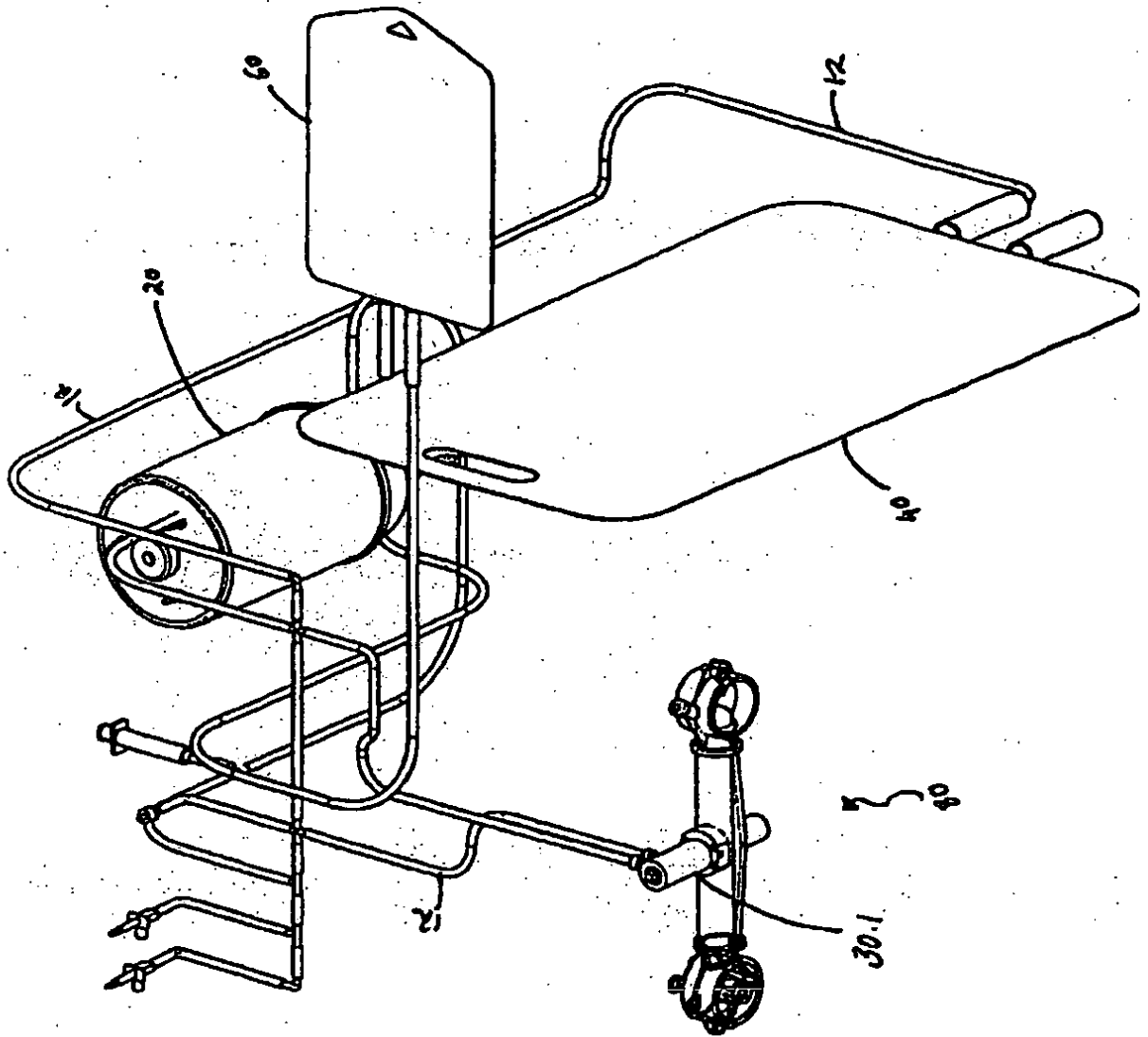


FIGURA 14

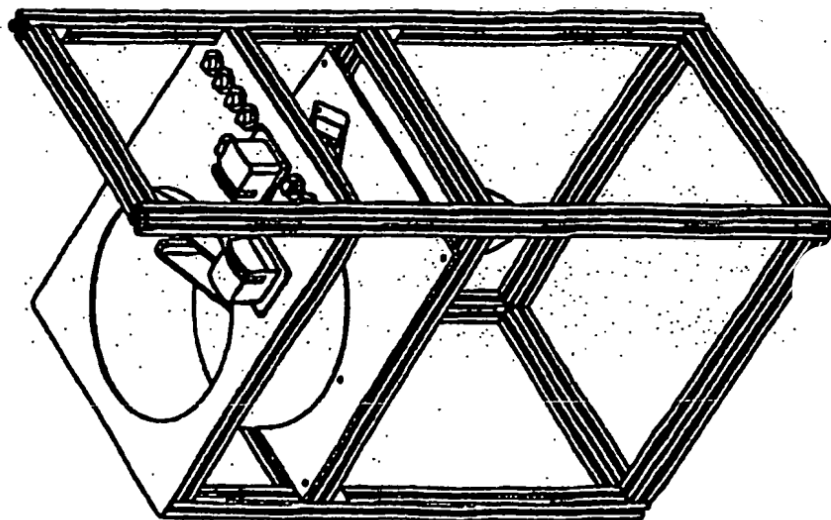
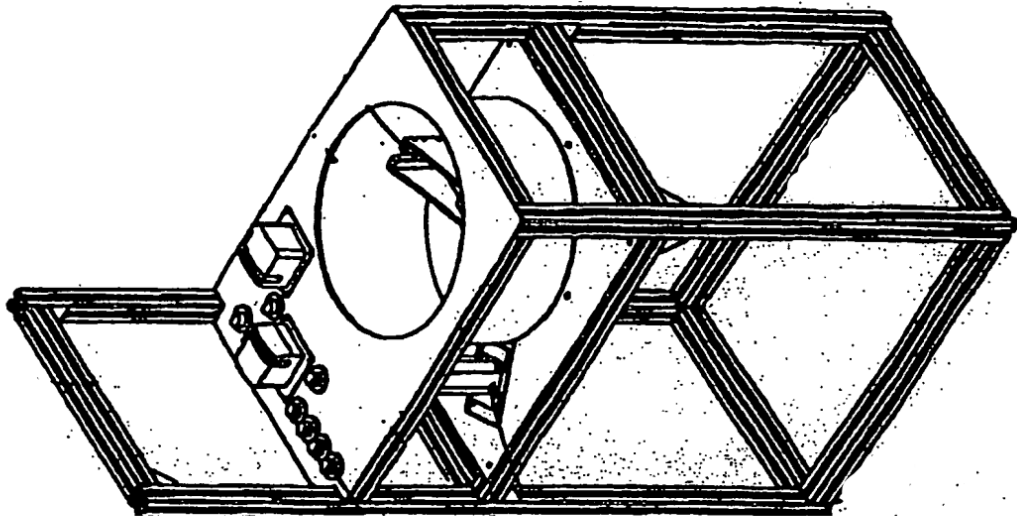


FIGURA 15A

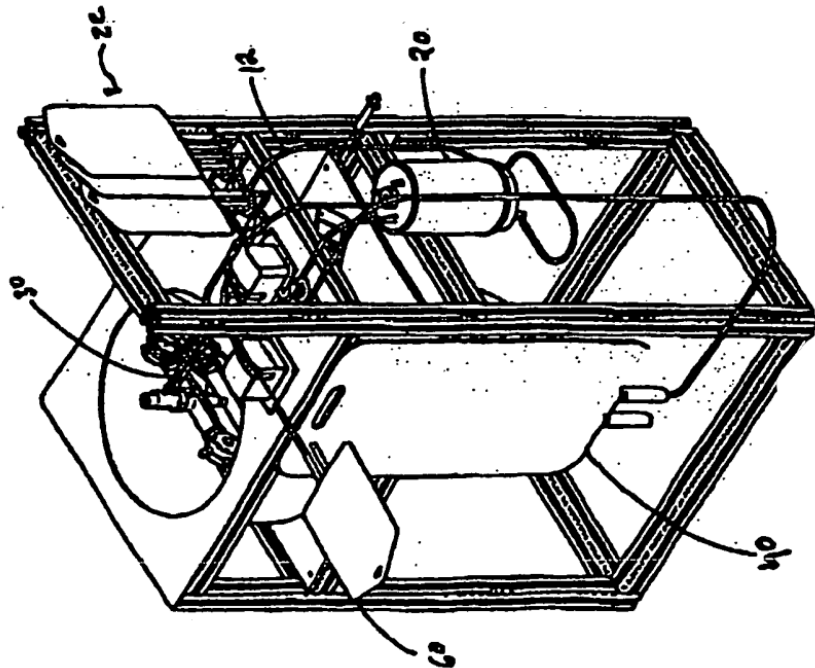
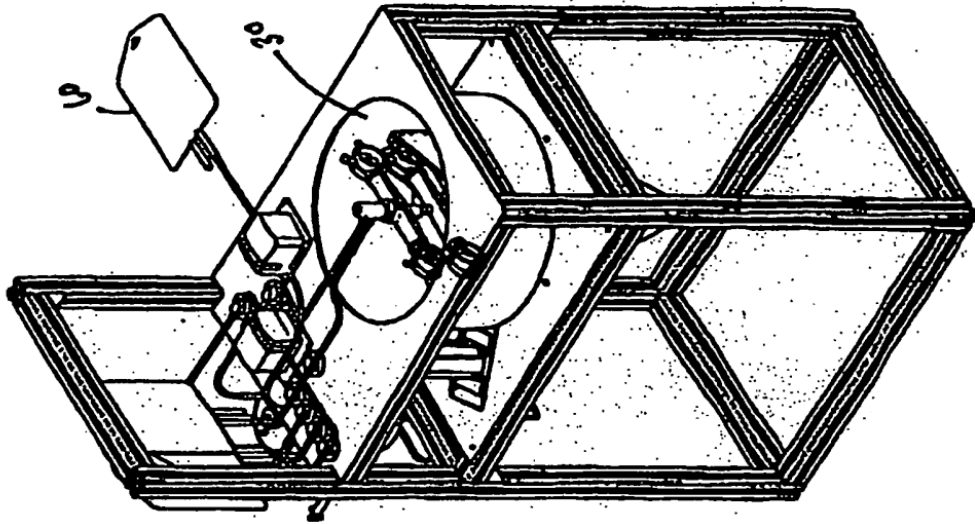


Figura 15B

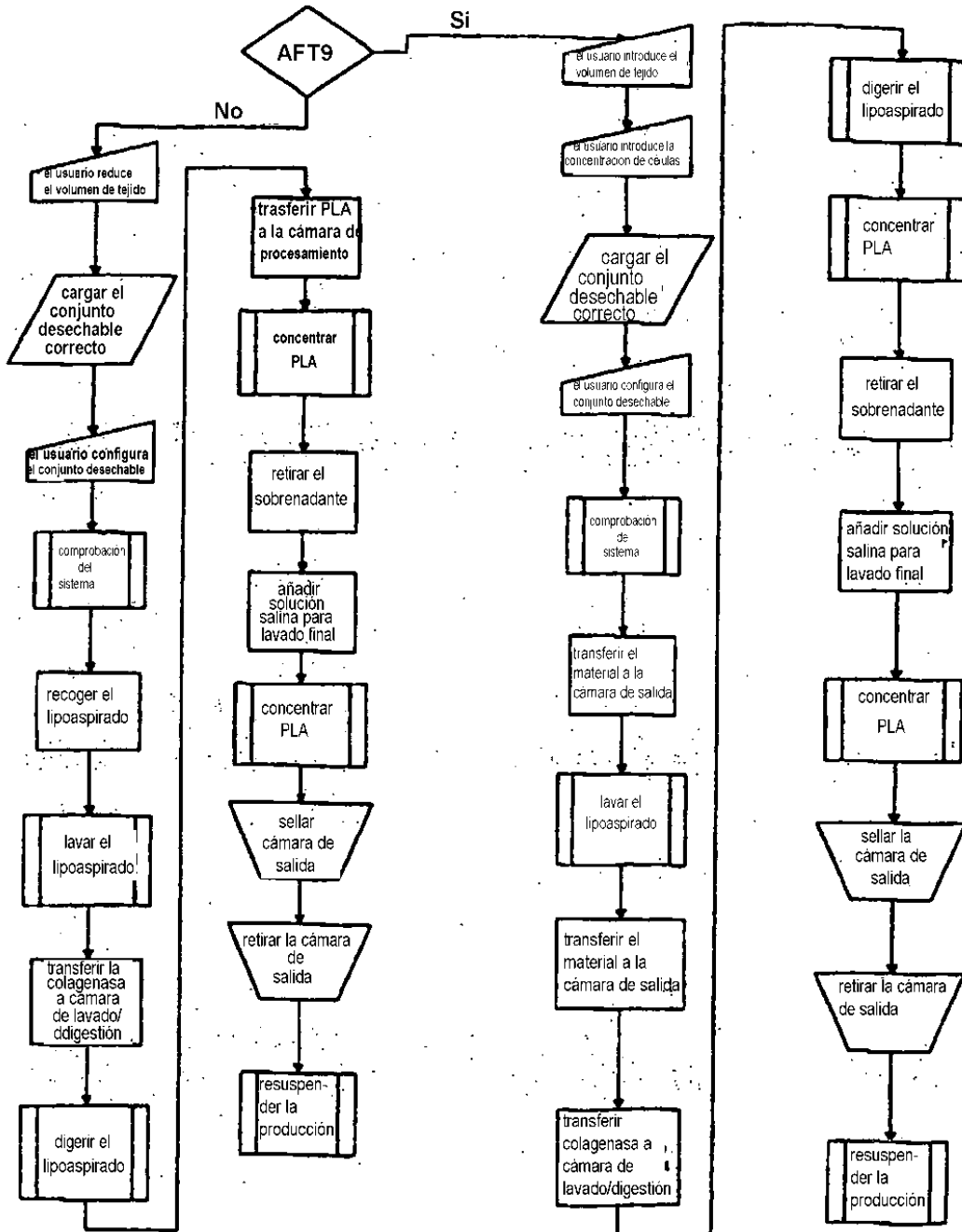
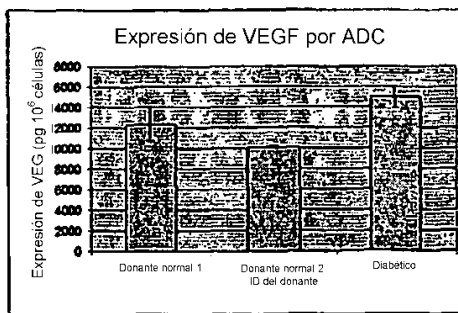


FIGURA 16

16A



16B

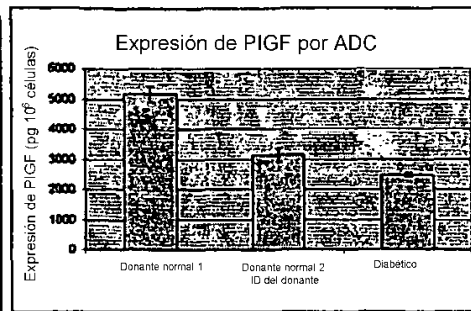


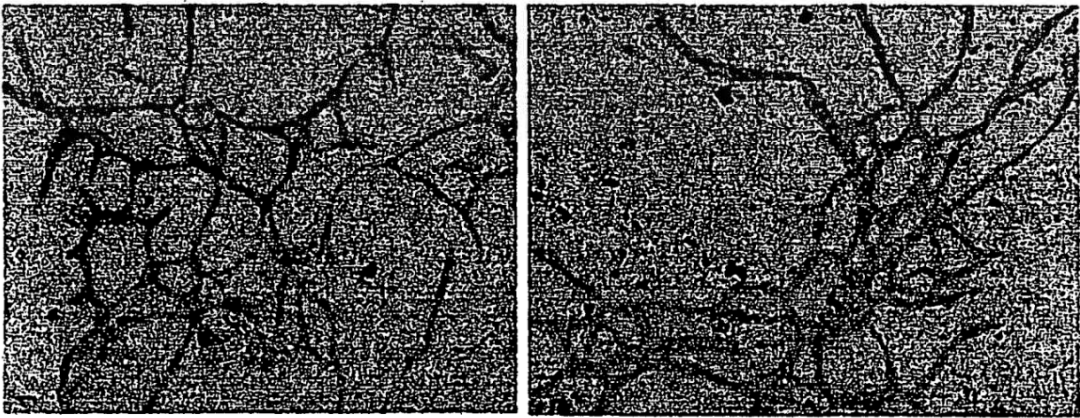
FIGURA 17



Tinción con UEA-1 de colonia de **EPC** derivada de **ADC**

FIGURA 18

Crecimiento de estructuras vasculares positivas para CD31 de ADC de ratones tratados con STZ normales



18A

18B

FIGURA 19

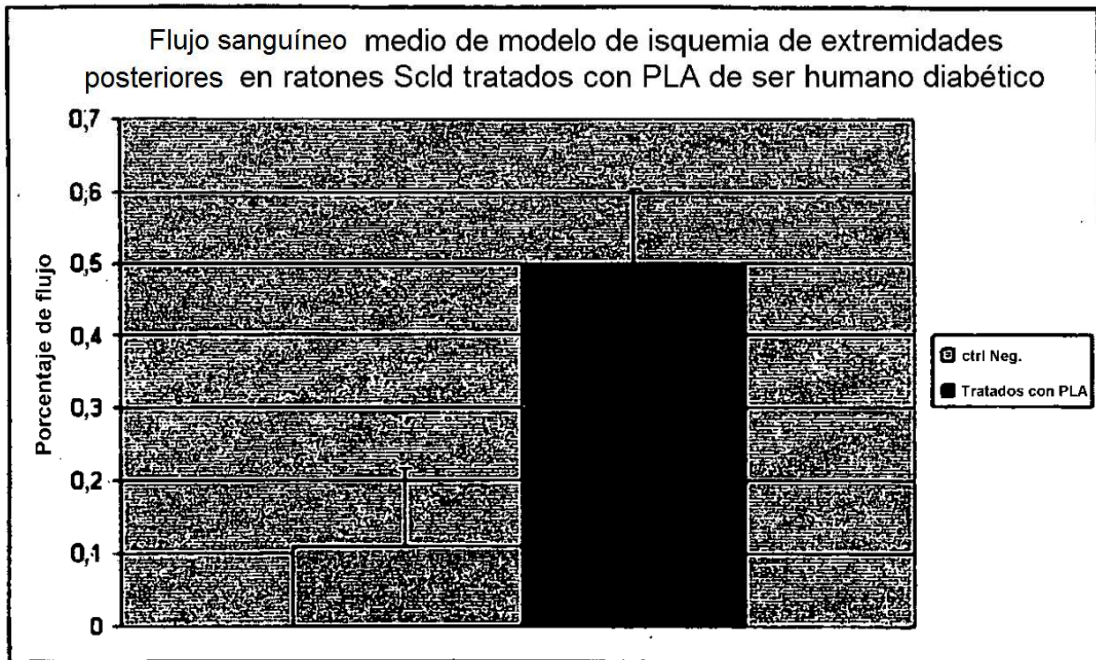


FIGURA 20

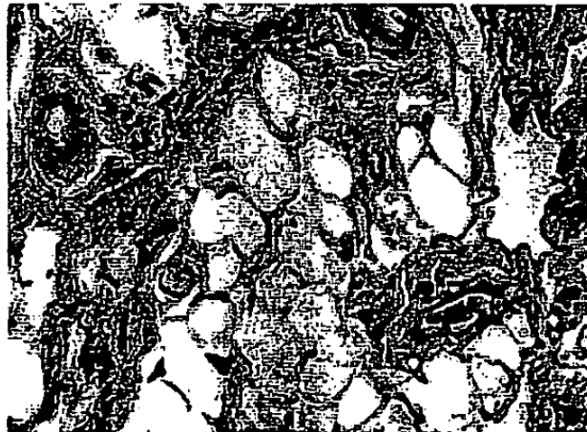
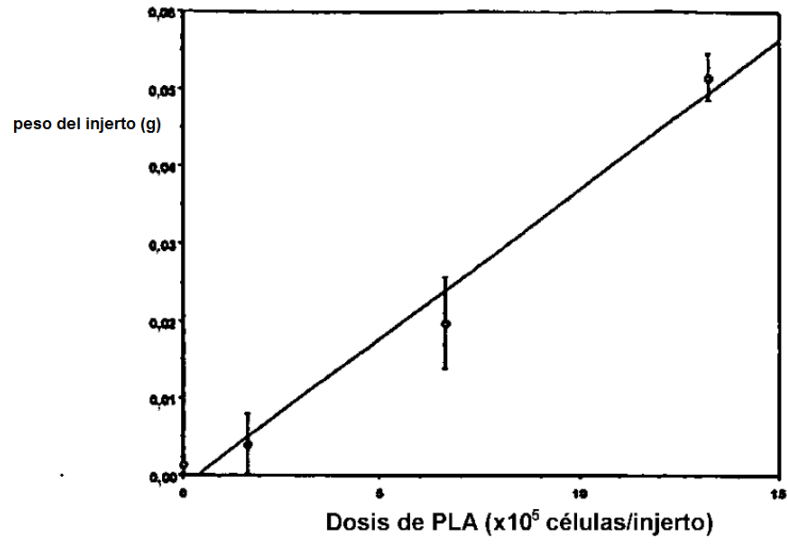
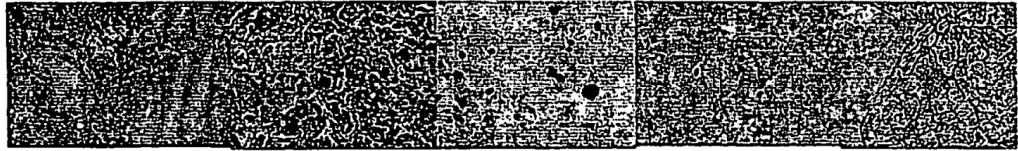


FIGURA 21



Día 1

Día 7

Día 14

Día 28

Día 84

FIGURA 22

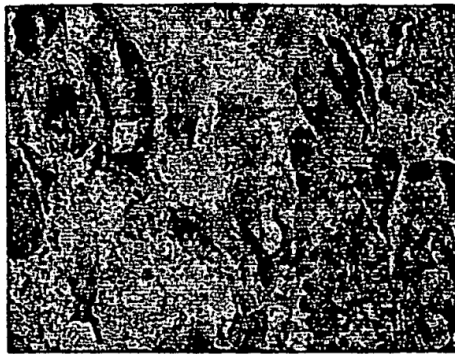


FIGURA 23

