



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 364 957**

⑤1 Int. Cl.:
C12N 5/0775 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **04756623 .7**

⑨6 Fecha de presentación : **01.07.2004**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1778833**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2007**

⑤4 Título: **Procedimientos de uso de células regenerativas para promover la cicatrización de heridas.**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.09.2011

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.09.2011

⑦3 Titular/es: **CYTORI THERAPEUTICS, Inc.**
3020 Callan Road
San Diego, California 92101, US

⑦2 Inventor/es: **Hedrick, Marc, H.;**
Fraser, John, K. y
Daniels, Eric

⑦4 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 364 957 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 regenerativas para promover la cicatrización de heridas

1. Campo de la Invención

La presente invención se refiere en general al uso de una población concentrada de células regenerativas obtenidas de tejido adiposo que comprenden células madre en la preparación de un medicamento para promover la epitelización y formación de neodermis en un sitio de herida, por ejemplo, heridas producidas como resultado de diabetes, enfermedad vascular periférica crónica y obesidad.

2. Descripción de Técnica Relacionada

Aproximadamente cinco millones de estadounidenses sufren de úlceras abiertas crónicas debido al flujo sanguíneo limitado que ralentiza el proceso de curación propio del organismo. Normalmente, las lesiones a la piel ponen en movimiento una cascada compleja de acontecimientos que da como resultado en última instancia la cicatrización de heridas, concretamente la formación de la neodermis y reepitelización. Esta secuencia de acontecimientos compleja incluye una sinfonía de interacción entre factores del crecimiento locales, regionales y sistémicos, citoquinas, así como participantes celulares, incluyendo células madre mesenquimales. Sin embargo, la cicatrización de heridas inadecuada y/o incompleta, puede conducir a morbilidad individual significativa incluyendo una reducción profunda de la calidad de vida. Las úlceras se pueden infectar gravemente, se pueden volver gangrenosas y en algunos casos necesitar la amputación. Por ejemplo, la causa principal de amputación no traumática debido a cicatrización de heridas inadecuada es la diabetes. Existen casi 16 millones de diabéticos en los Estados Unidos. Más de 67.000 pacientes con diabetes necesitan amputación quirúrgica cada año, necesitando una rehabilitación larga y costosa. Para muchos, la movilidad y la independencia se afectan gravemente, alterando permanentemente su calidad de vida. En su extremo, la cicatrización de heridas pobre puede servir como la causa principal de muerte.

Para pacientes que tienen heridas crónicas que son difíciles de curar, el cuidado médico y quirúrgico básico es esencial, pero no siempre suficiente. Las terapias actuales para cicatrización de heridas incluyen la eliminación de tejido enfermo, el uso de factores del crecimiento, tratamiento con oxígeno hiperbárico (alta presión), apósitos para heridas avanzados, terapia de antibióticos, apósitos de heridas convencionales, asesoramiento nutricional, educación/prevención, cirugía y terapia física. Por ejemplo, la manipulación de moléculas únicas o una combinación de moléculas participantes, incluyendo pero sin limitación PDGF-BB y bFGF, se puede usar para aumentar la cicatrización de heridas natural. Adicionalmente, también se puede usar la aplicación de productos celulares "elaborados mediante ingeniería" (Apligraf® y Dermagraft®) como una manera de generar un patrón más fisiológico de expresión del factor de crecimiento. La implementación de terapias como Regranex, un factor del crecimiento obtenido de plaquetas que estimula la curación, también ha demostrado ser beneficioso para el cuidado de heridas en pacientes apropiados.

El enfoque celular regenerativo también ha disfrutado de éxito relativo en comparación con terapias moleculares únicas o de combinación descritas anteriormente. La medicina regenerativa aprovecha, de una manera clínicamente dirigida, la capacidad de las células madre (es decir, las células maestras no especializadas del organismo) de renovarse así mismas indefinidamente y desarrollarse en células especializadas maduras. Sin embargo, la aplicación amplia de la terapia celular regenerativa se ha visto obstaculizada por cuestiones de retención celular y los altos costes asociados con la manipulación exhaustiva ex vivo. Sin embargo, aunque las poblaciones de células madre han demostrado estar presentes en uno o más de médula ósea, piel, músculo, hígado y cerebro (Jiang y col., 2002b; Alison, 1998; Crosby y Strain, 2001), su frecuencia en estos tejidos es baja. Por ejemplo, la frecuencia de células madre mesenquimales en médula ósea se estima en entre 1 y 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 a partir de la piel implica una serie complicada de etapas de cultivo celular a lo largo de varias semanas (Toma y col., 2001) y la aplicación clínica de células madre obtenidas a partir de músculo esquelético requiere una fase de cultivo de dos a tres semanas (Hagege y col., 2003). Por tanto, cualquier aplicación clínica propuesta de células madre a partir de tales tejidos requiere aumentar el número, la pureza y la madurez de las células mediante procedimientos de purificación celular y cultivo celular.

Aunque las etapas de cultivo celular pueden proporcionar número de células, pureza y madurez aumentada, lo hacen a un coste. Este coste puede incluir una o más de las siguientes dificultades técnicas: pérdida de función celular debido a envejecimiento celular, pérdida de poblaciones de células no madre potencialmente útiles, retrasos en la aplicación potencial de células a pacientes, coste monetario aumentado y riesgo aumentado de contaminación de células con microorganismos ambientales durante el cultivo. Estudios recientes que examinan los efectos terapéuticos de ASC obtenidos de médula ósea han usado básicamente médula completa para eludir los problemas asociados con el cultivo celular (Horwitz y col., 2001; Orlic y col., 2001; Stamm y col., 2003; Strauer y col., 2002). Sin embargo, los beneficios clínicos han sido subóptimos, un resultado casi seguramente relacionado con la dosis y la pureza de ASC limitada inherentemente disponible en la médula ósea.

Recientemente, el tejido adiposo ha demostrado ser una fuente de células madre (Zuk y col., 2001; Zuk y col., 2002). El tejido adiposo (a diferencia de la médula, piel, músculo, hígado y cerebro) es comparativamente fácil de recoger

en cantidades relativamente grandes con baja morbilidad (Commons y col., 2001; Katz y col., 2001b). Sin embargo, existe una carencia de procedimientos adecuados para recoger células madre obtenidas de tejido adiposo. Los procedimientos existentes sufren de varias deficiencias. Por ejemplo, los procedimientos existentes carecen de automatización parcial o completa, un sistema parcial o completamente cerrado, desechabilidad de los componentes, etc.

Dado el potencial terapéutico de las células madre obtenidas del tejido adiposo para la cicatrización de heridas, existe una necesidad en la técnica de un procedimiento para recoger células a partir del tejido adiposo que produzca una población de células madre adultas con rendimiento, consistencia y/o pureza aumentados y que lo haga de forma rápida y fiable con una necesidad disminuida o no existente de manipulación después de la extracción.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere al uso de una población concentrada de células regenerativas obtenidas de tejido adiposo, por ejemplo, células madre y progenitoras adultas, en la preparación de un medicamento para promover la epitelización y formación de neodermis en un sitio de herida, en el que dicha población concentrada de células se tiene que administrar a un paciente que necesita de las mismas sin cultivar las células antes de administrarlas al paciente. Por consiguiente, en una realización general, la presente invención se refiere al uso de una población concentrada de células regenerativas obtenidas de tejido adiposo que comprende células madre en la preparación de un medicamento para promover la epitelización y la formación de neodermis en un sitio de herida, en el que dicha población concentrada de células se tiene que administrar directamente a un receptor junto con tales aditivos necesarios para promover, generar o apoyar un beneficio de cicatrización de heridas terapéutico.

En realizaciones específicas, la presente invención se refiere a procedimientos para promover la cicatrización de heridas, administrando una concentración de células regenerativas. Las células regenerativas pueden comprender, por ejemplo, células madre, células progenitoras o una combinación de las mismas. En determinadas realizaciones, la administración de dosis múltiples de células regenerativas puede ser necesaria para obtener un beneficio terapéutico. Adicionalmente, se pueden administrar aditivos tales como uno o más factores del crecimiento con las células regenerativas. En una realización preferida, las células regenerativas se administran con factores del crecimiento angiogénicos solas o en combinación con otros aditivos. Las células regenerativas también se pueden administrar con uno o más fármacos inmunosupresores.

Las vías de administración para el medicamento se conocen en la técnica e incluyen inyección en un sitio subcutáneo, dérmico o intramuscular distante de la lesión o administración vascular localizada usando un mecanismo basado en catéter. El medicamento puede ser para la administración a, por ejemplo, la vasculatura del paciente. El medicamento también puede ser para la administración a través de una matriz, por ejemplo, una matriz reabsorbible o un vendaje conocido en la técnica.

Antes de la administración a un paciente, las células se podrían modificar mediante transferencia génica de forma que la expresión de uno o más genes, por ejemplo, un gen angiogénico, en las células regenerativas modificadas esté alterada.

El sistema usado por la invención generalmente incluye uno o más de una cámara de recolección, una cámara de procesamiento, una cámara de desperdicios, una cámara de salida y una cámara de muestra. Las diversas cámaras están acopladas entre sí a través de uno o más conductos de forma que los fluidos que contienen material biológico puedan pasar de una cámara a otra en una vía de fluido/tejido estéril cerrada. Como alternativa, la cámara de desperdicios, la cámara de salida y la cámara de muestra son opcionales. El procedimiento completo desde la extracción del tejido a través de procesamiento y colocación del dispositivo en el recipiente se puede realizar en la misma instalación, de hecho, incluso dentro de la misma habitación del paciente que se está sometiendo al procedimiento.

Es útil para la invención un sistema, que está configurado para mantener un fluido/tejido estéril cerrado, que incluye un sistema de eliminación de tejido para obtener tejido adiposo a partir de un paciente, teniendo el tejido adiposo una concentración de células madre; medios para procesar al menos una parte del tejido adiposo para obtener una concentración de células regenerativas diferente a la concentración de células regenerativas del tejido adiposo antes del procesamiento y medios para administrar las células regenerativas a un paciente sin eliminar las células regenerativas del sistema de eliminación de tejido antes de administrarse al paciente.

Cualquier característica o combinación de características descritas en el presente documento se incluyen dentro del alcance de la presente invención siempre y cuando las características incluidas en cualquier combinación de este tipo no sean mutuamente incompatibles como será evidente a partir del contexto, de la presente memoria descriptiva y del conocimiento de un experto en la materia. Son evidentes ventajas y aspectos adicionales de la presente invención en la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es una ilustración de un sistema para separar células regenerativas de tejido que incluye un conjunto de filtro.

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.

La Figura 3 es una ilustración de un sistema similar a la Figura 1 que tiene una pluralidad de conjuntos de filtros en una configuración en paralelo.

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

La Figura 5 es una vista en corte de una cámara de recolección que incluye un filtro prefijado utilizado en un sistema para separar las células regenerativas de tejido.

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

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

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

Las Figuras 9.1, 9.2 y 9.3 ilustran un componente de elutriación durante el funcionamiento con el sistema de la invención.

La Figura 10 es una ilustración de un sistema para separar células regenerativas de tejido utilizando presión al vacío para mover fluidos a través del sistema. Un sistema de vacío se puede construir aplicando una bomba de vacío o una fuente de vacío a la salida del sistema, controlado a una velocidad predeterminada para atraer los tejidos y fluidos, usando un sistema de llaves de paso, rejillas de ventilación y abrazaderas para controlar la dirección y la sincronización del flujo.

La Figura 11 es una ilustración de un sistema para separar células regenerativas de tejido que utiliza presión positiva para mover fluidos a través del sistema. Un sistema de presión positiva usa un medio mecánico tal como una bomba peristáltica para empujar o impulsar el fluido y tejido a través del sistema a una velocidad determinada, usando válvulas, llaves de paso, rejillas de ventilación y abrazaderas para controlar la dirección y sincronización del flujo.

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

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

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

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

La Figura 15 es una ilustración de un dispositivo ilustrativo de la invención ensamblado usando un conjunto desechable similar a la Figura 13 y un componente reutilizable similar a la Figura 14.

Las Figuras 16A y 16B representan la expresión de proteína VEGF (5A) y PIGF (5B) mediante células madre obtenidas de tejido adiposo cultivadas.

La Figura 17 representa la detección de células progenitoras endoteliales dentro de poblaciones de células madre obtenidas 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).

La Figura 19 representa el restablecimiento promedio aumentado de flujo sanguíneo en isquemia de miembros posteriores de ratones tratados con células madre obtenidas de tejido adiposo en comparación con un control negativo.

Las Figuras 20A y 20B muestran que el aumento de la dosis de células madre obtenidas 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).

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona el uso de una población concentrada de células regenerativas obtenidas de tejido adiposo que comprende células madre en la preparación de un medicamento para promover la epitelización y formación de neodermis en un sitio de herida, en el que dicha población concentrada de células se tiene que administrar a un paciente que la necesita sin cultivar las células antes de administrarlas al paciente. La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que las células regenerativas de la invención (1) expresan factores de crecimiento angiogénicos y citoquinas, 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) secretan citoquinas relacionadas con la cicatrización de heridas, incluyendo MIP-1 α , RANTES, MCP-1, MIG, TARC, MIP-1, KC y TIMP, (3) secretan colágeno *in vitro* y (4) promueven la cicatrización de heridas *in vivo*. Por consiguiente, las células regenerativas obtenidas a partir de tejido adiposo, por ejemplo, células madre que expresan moléculas de superficie celular generalmente consideradas como características de células madre mesenquimales tienen la capacidad de promover la formación de vasos nuevos y la cicatrización de heridas.

La presente invención también utiliza sistemas y procedimientos rápidos y fiables para separar y concentrar células regenerativas, por ejemplo, células madre y/o células progenitoras, a partir de una diversidad de tejidos, incluyendo pero sin limitación tejido adiposo, médula ósea, sangre, piel, músculo, hígado, tejido conectivo, fascia, cerebro y otros tejidos del sistema nervioso, vasos sanguíneos y otros tejidos suaves o líquidos o componentes de tejido o mezclas de tejido (por ejemplo, una mezcla de tejidos que incluye piel, vasos sanguíneos, tejidos adiposo y tejido

conectivo). Preferentemente, el sistema separa y concentra células regenerativas a partir de tejido adiposo. También se prefiere que el sistema esté automatizado de forma que el procedimiento completo se pueda realizar con una intervención o experiencia mínima del usuario. En una realización particularmente preferida, el medicamento que comprende las células regenerativas obtenidas usando los sistemas es adecuado para la colocación directa en un receptor que está sufriendo.

Preferentemente, el procedimiento completo desde la extracción de tejido a través de la separación, concentración y colocación de las células regenerativas en el receptor se realizaría en la misma instalación, de hecho, incluso dentro de la misma habitación del paciente que se está sometiendo al procedimiento. Las células regenerativas para uso en la preparación de un medicamento de la invención pueden ser para su uso en un periodo de tiempo relativamente corto después de la extracción y la concentración. Por ejemplo, las células regenerativas para uso en la preparación de un medicamento de la invención pueden estar listas para su uso en aproximadamente una hora a partir de la recolección de tejido de un paciente y en determinadas situaciones, pueden estar listas para su uso en aproximadamente 10 a 40 minutos desde la recolección del tejido. En una realización preferida, las células regenerativas para su uso en la preparación de un medicamento de la invención pueden estar listas para su uso en aproximadamente 20 minutos a partir de la recolección de tejido. La duración completa del procedimiento desde la extracción a través de la separación y la concentración puede variar dependiendo de varios factores, incluyendo el perfil del paciente, el tipo de tejido que se esté recogiendo y la cantidad de células regenerativas necesarias para una aplicación terapéutica determinada. Las células para uso en la preparación de un medicamento de la invención, también pueden ser para colocación en el receptor en combinación con otras células, tejidos, fragmentos de tejido, matrices u otros estimuladores del crecimiento y/o la diferenciación celular en el contexto de un procedimiento operativo único con la intención de obtener un beneficio terapéutico para el receptor. Se entiende que cualquier manipulación adicional de las células regenerativas más allá de la fase de separación y de concentración del sistema necesitará tiempo adicional en consonancia con la forma de tal manipulación.

Con el fin de que la presente invención se pueda comprender más fácilmente, en primer lugar se definen determinados términos. Las definiciones adicionales se exponen a través de la descripción detallada.

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 causan o contribuyen a la regeneración, restablecimiento o sustitución de la estructura o función de un órgano, tejido o unidad fisiológica completa o parcial o sistema para proporcionar de ese modo un beneficio terapéutico. Los ejemplos de células regenerativas incluyen: ASC, células endoteliales, células precursoras endoteliales, células progenitoras endoteliales, macrófagos, fibroblastos, pericitos, células de músculo liso, preadipocitos, adipocitos diferenciados o desdiferenciados, queratinocitos, células progenitoras y precursoras unipotenciales y multipotenciales (y sus progenies) y linfocitos.

Un mecanismo mediante el cual las células regenerativas pueden proporcionar un beneficio terapéutico es incorporándose a sí mismas o a su progenie en tejidos o componentes de tejido generados recientemente, existentes o reparados. Por ejemplo, las ASC y/o su progenie se pueden incorporar en tejido funcional generado recientemente y provocar de ese modo o contribuir a una mejora terapéutica, estructural o cosmética. De forma similar, las células endoteliales o células precursoras o progenitoras endoteliales y sus progenies se pueden incorporar en vasos sanguíneos existentes, generados recientemente, reparados o expandidos para de ese modo provocar o contribuir a un beneficio terapéutico.

Otro mecanismo mediante el cual las células regenerativas pueden proporcionar un beneficio terapéutico es expresando y/o secretando moléculas, por ejemplo, factores de crecimiento, que promueven la creación, retención, restablecimiento y/o regeneración de 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 después participan directamente o indirectamente en función mejorada. Las células regenerativas pueden expresar y/o secretar factores de crecimiento, incluyendo, por ejemplo, Factor del Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF), factor de Crecimiento Placentario (PlGF), 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 , Trombopoyetina 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 suministro de oxígeno de vasos sanguíneos pequeños preexistentes (colaterales) expandiendo su capacidad de carga de sangre; inducir la movilización de células regenerativas desde sitios alejados del sitio de la lesión para mejorar de ese modo la reposición 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 ese modo la retención de función o estructura; suministrar moléculas con propiedades antiapoptóticas reduciendo de este modo el índice o la probabilidad de muerte celular y la pérdida de función permanente; e interactuar con células regenerativas endógenas y/o otros mecanismos fisiológicos.

Las células regenerativas para el uso en la preparación del medicamento de la invención pueden estar en su forma "nativa" presentes en o separadas y concentradas a partir del tejido usando los sistemas y procedimientos descritos en el presente documento o las mismas se pueden modificar mediante estimulación o sensibilización con factores del crecimiento u otros modificadores de la respuesta biológica, mediante transferencia génica (transferencia transitoria o estable), mediante subfraccionamiento adicional de la población resultante en base a propiedades

físicas (por ejemplo tamaño o densidad), adherencia diferencial a un material de fase sólida, expresión de moléculas de superficie celular o intracelulares u otra manipulación, modificación, o fraccionamiento *ex vivo* o *in vivo* como se ha descrito adicionalmente en el presente documento. Las células regenerativas para el uso en la preparación del medicamento de la invención también pueden ser para uso en combinación con otras células o dispositivos tales como matrices, materiales o dispositivos sintéticos o biológicos para administrar factores, fármacos, químicos u otros agentes que modifiquen o potencien las características pertinentes de las células como se ha descrito adicionalmente en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "composición de células regenerativas" se refiere a la composición de células típicamente presente en un volumen de líquido después de que se ha lavado y al menos parcialmente disgregado un tejido, por ejemplo, tejido adiposo. Por ejemplo, una composición de células regenerativas 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 progenitoras o precursoras unipotenciales y multipotenciales (y sus progenies) y linfocitos. La composición de células regenerativas también puede contener uno o más contaminantes, tales como colágeno, que pueden estar presentes en los fragmentos de tejido o colagenasa residual u otra enzima o agente empleado en o que se produce como resultado a partir del procedimiento de disgregación del tejido descrito en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "medicina regenerativa" se refiere a cualquier beneficio terapéutico, estructural o cosmético que se obtiene a partir de la colocación, directamente o indirectamente, de células regenerativas en un sujeto. Como se usa en el presente documento, "cicatrización de heridas" tiene por objeto incluir todos los trastornos caracterizados por cicatrización de heridas insuficiente, indeseada o anormal. El tratamiento de una herida, enfermedad o trastorno está dentro del ámbito de la medicina regenerativa. La expresión también tiene por objeto significar cualquier enfermedad, trastorno, síndrome, anomalía, patología o condición anormal de la piel y/o del tejido conectivo subyacente o de la estructura o función de sus partes constituyentes, por ejemplo, heridas que no cicatrizan incluyendo: úlceras isquémicas, heridas diabéticas, heridas traumáticas (incluyendo quirúrgicas, heridas secundarias a afecciones vasculíticas o infecciosas y cualquier afección que conduzca a una herida que no cicatriza en un sujeto, particularmente un sujeto humano. La cicatrización de heridas insuficiente o anormal puede ser el resultado de enfermedad, lesión y/o envejecimiento.

Como se usa en el presente documento, el término "isquemia" se refiere a cualquier isquemia de tejido localizada debido a la reducción de la afluencia de sangre. La expresión "herida isquémica" se refiere a la incapacidad de la contracción y reepitelización de heridas debido a oxígeno inadecuado. Determinadas situaciones médicas y quirúrgicas están asociadas con un riesgo elevado de desarrollar heridas que no cicatrizan, por ejemplo, diabetes (tipo I y II), enfermedad vascular periférica crónica, obesidad, administración de esteroides exógena, heridas de enfermedad vascular, dehiscencia de heridas quirúrgicas, herida de lesión de médula espinal, heridas químicas y regímenes quimioterapéuticos u otros regímenes inmunosupresores. Las heridas con dificultad para cicatrizar se pueden producir como resultado de lesión traumática, diabetes, enfermedad vascular periférica, complicaciones a continuación de cirugía, artritis reumatoide, insuficiencia cardíaca congestiva, úlceras arteriales o venosas, linfedema y muchas otras afecciones que comprometen la circulación.

Como se usa en el presente documento, el término "angiogénesis" se refiere al procedimiento mediante el cual se generan vasos sanguíneos nuevos a partir de vasculatura y tejido existente (Folkman, 1995). La expresión "reparar o remodelar" se refiere a la reforma de vasculatura existente. El alivio de isquemia tisular es críticamente dependiente 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. Las enfermedades y trastornos mediados por angiogénesis incluyen infarto del miocardio agudo, cardiomiopatía isquémica, enfermedad vascular periférica, apoplejía isquémica, necrosis tubular aguda, heridas isquémicas que incluyen AFT, sepsis, enfermedad intestinal isquémica, retinopatía diabética, neuropatía y nefropatía, vasculitis, encefalopatía isquémica, disfunción eréctil fisiológica, lesiones de la médula espinal isquémicas o traumáticas, insuficiencia múltiple de órganos y sistemas, enfermedad de las encías isquémica e isquemia relacionada con trasplante.

Como se usa en el presente documento "célula madre" se refiere a una célula regenerativa multipotencial con el potencial de diferenciarse en una diversidad de otros tipos celulares, que realizan una o más funciones específicas y que tienen la capacidad de auto renovarse. Algunas de las células madre descritas en el presente documento pueden ser mutipotenciales.

Como se usa en el presente documento, "célula progenitora" se refiere a una célula regenerativa multipotencial con el potencial de diferenciarse en más de un tipo celular y que tiene una capacidad limitada o no tiene capacidad de auto renovarse. "Célula progenitora", como se usa en el presente documento, también se refiere a una célula unipotencial con el potencial de diferenciarse en únicamente un tipo de célula único, que realiza una o más funciones específicas y que tiene una capacidad limitada o ninguna capacidad de auto renovarse. En particular, como se usa en el presente documento, "célula progenitora endotelial" se refiere a una célula multipotencial o unipotencial con el potencial de diferenciarse en células endoteliales vasculares.

Como se usa en el presente documento "célula precursora" se refiere a una célula regenerativa unipotencial con el potencial de diferenciarse en un tipo celular. Las células precursoras y su progenie pueden conservar capacidad proliferativa amplia, por ejemplo, linfocitos y células endoteliales, que pueden proliferar en condiciones apropiadas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "factor angiogénico" o "proteína angiogénica" se refiere a cualquier proteína, péptido u otro agente conocido capaz de promover el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasculatura existente ("angiogénesis"). Los factores angiogénicos para su uso en la invención incluyen, pero sin limitación, Factor de Crecimiento de Placentario (Luttun y col., 2002), Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos (Aharinejad y col., 1995), Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos y Granulocitos (Buschmann y col., 2003), Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)-A, VEGF-A, VEGF-B, 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 (Botta y col., 2000), Angiopoietina 1, Angiopoietina 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), Pleyotropina (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 independientemente o en combinación el uno con el otro. Cuando están en combinación, los factores angiogénicos también 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 incluye 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 tanto, mimetizan la actividad de los factores para promover la angiogénesis y/o el remodelado 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 se pueden producir u obtener a partir de cualquier fuente adecuada. Por ejemplo, los factores se pueden purificar a partir de sus fuentes nativas o producirse sintéticamente o mediante expresión recombinante. Los factores se pueden administrar a pacientes como una composición de proteína. Como alternativa, los factores se pueden administrar 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 lentivirales y transposones.

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 células obtenidas de tejido adiposo (ADC) se siembran a densidad celular baja (<10.000 células/pocillo) y se cultivan en medio de cultivo que soporta el crecimiento de MSC (por ejemplo, medio DMEM/F12 complementado con suero fetal bovino al 10%, suero equino al 5% y agentes antibióticos/antimicóticos). Las células se cultivan durante dos semanas 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 (por ejemplo, 15 colonias contadas en una placa iniciada con 1.000 células regenerativas nucleadas produce una frecuencia de células madre del 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 porcentaje elevado (~100%) de UFC-F cultivado a partir de células regenerativas expresa la molécula de superficie celular CD 105 que también se expresa en células madre obtenidas de médula (Barry y col., 1999). CD105 también se expresa en células madre obtenidas de tejido adiposo (Zuk y col., 2002).

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 de células regenerativas, incluyendo ASC y células progenitoras y precursoras endoteliales.

Como se usa en el presente documento, la expresión "unidad de tejido adiposo" se refiere a una cantidad específica o medible de tejido adiposo. Una unidad de tejido adiposo se puede medir determinando el peso y/o el volumen de la unidad. En base a los datos identificados anteriormente, una unidad de lipoaspirado procesado, retirado de un paciente, tiene un componente celular en el que al menos el 0,1% del componente celular son células madre; es decir, tiene una frecuencia de células madre, determinada como se ha descrito anteriormente de al menos el 0,1%. Con referencia a la divulgación del presente documento, una unidad de tejido adiposo se puede referir a la cantidad entera de tejido adiposo retirada de un paciente o una cantidad que es menor que la cantidad entera de tejido adiposo retirada de un paciente. Por tanto, una unidad de tejido adiposo se puede combinar 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.

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

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 regenerativo) a partir de adipocitos maduros y tejido conectivo. Esta fracción se denomina en el presente documento “células obtenidas de tejido adiposo” o “ADC”. Típicamente, ADC se refiere al sedimento de células regenerativas obtenido mediante el lavado y separación y concentración de las células a partir del tejido adiposo. El sedimento se obtiene típicamente centrifugando una suspensión de células de forma que las células se agregan en el fondo de una cámara centrífuga o un concentrador de células.

Como se usan en el presente documento, los términos “administrar”, “introducir”, “suministrar”, “colocación” y “trasplantar” se usan de forma intercambiable en el presente documento y se refieren a la colocación de células regenerativas de la invención en un sujeto mediante un procedimiento o vía que da como resultado al menos la localización parcial de las células regenerativas en el sitio deseado. El medicamento que comprende las células regenerativas puede ser para administración mediante cualquier vía apropiada que dé como resultado el suministro a un emplazamiento deseado en el sujeto donde al menos una parte de las células o componentes de las células permanece viable. El periodo de viabilidad de las células después de la administración a un sujeto puede ser tan corto como pocas horas, por ejemplo, veinticuatro horas, hasta pocos días, hasta tanto como varios años.

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

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 producir un efecto clínico beneficioso o deseado. Dicha dosis se podría administrar en una o más administraciones. Sin embargo, la determinación exacta de lo que se consideraría una dosis eficaz se puede basar en factores individuales para cada paciente, incluyendo, pero sin limitación, la edad o el tamaño del paciente, el tipo o alcance de la enfermedad, la etapa de la enfermedad, la vía de administración de las células regenerativas, el tipo o alcance de la terapia complementaria usada, el proceso de la enfermedad en curso y el 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 previamente en el presente documento, las células regenerativas, por ejemplo, células madre y progenitoras, se pueden recoger a partir de una amplia diversidad de tejidos. El tejido adiposo es una fuente especialmente rica en células regenerativas. Por consiguiente, el sistema útil para la presente invención se ilustra en el presente documento usando tejido adiposo como una fuente de células regenerativas a modo de ejemplo únicamente y no como limitación.

El tejido adiposo se puede obtener mediante cualquier procedimiento conocido por un experto en la materia. Por ejemplo, el tejido adiposo se puede retirar de un paciente mediante liposucción (de jeringa o asistida por potencia) o mediante lipectomía, por ejemplo, lipoplastia asistida por succión, lipoplastia asistida por ultrasonido y lipectomía con escisión o combinaciones de las mismas. El tejido adiposo se retira y se recoge y se puede procesar como se ha descrito en el presente documento. La cantidad de tejido recogido depende de varios factores, incluyendo el índice de masa corporal y la edad del donante, el tiempo disponible para la recolección, la disponibilidad de sitios accesibles para recoger tejido adiposo, las medicaciones y afecciones concomitantes y preexistentes (tales como terapia anticoagulante) y el fin clínico para el cual se está recogiendo el tejido. Por ejemplo, el porcentaje de células regenerativas de 100 ml de tejido adiposo extraídos a partir de un individuo delgado es mayor que el extraído a partir de un donante obeso (Tabla 1). Esto probablemente refleja un efecto de dilución del contenido de grasa aumentado en el individuo obeso. Por lo tanto, puede ser deseable obtener cantidades mayores de tejido a partir de donantes con sobrepeso en comparación con las cantidades que se podrían extraer de pacientes más delgados. Esta observación también indica que la fuente de células regenerativas obtenidas de tejido adiposo no está limitada a individuos con grandes cantidades de tejido adiposo.

Tabla 1: Efecto del Índice de Masa Corporal Sobre Rendimiento de Tejido y Células

Estado del Índice de Masa Corporal	Cantidad de Tejido Obtenido (g)	Rendimiento de Células Regenerativas Total ($\times 10^7$)
Normal	641 ± 142	$2,1 \pm 0,4$
Obeso	1.225 ± 173	$2,4 \pm 0,5$
Valor p	0,03	0,6

Después de que se procesa el tejido adiposo, las células regenerativas resultantes están sustancialmente libres de adipocitos maduros y tejido conectivo y comprenden una pluralidad heterogénea de células regenerativas obtenidas

de tejido adiposo que se pueden usar con fines de investigación y/o terapéuticos. Preferentemente, las células son adecuadas para uso de una población concentrada de células regenerativas obtenidas del tejido adiposo que comprende células madre en la preparación de un medicamento de la invención.

A continuación se hará referencia con detalle a las realizaciones actualmente preferidas de la invención, ejemplos de los cuales se ilustran en los dibujos adjuntos. Siempre que sea posible, se usan los mismos números de referencia o números similares en los dibujos y la descripción para referirse a partes iguales o similares. Se ha de observar que los dibujos están en forma simplificada y no a escala exacta. Con referencia a la divulgación en el presente documento, con fines de conveniencia y claridad únicamente, los términos de dirección tales como superior, inferior, izquierda, derecha, arriba, abajo, sobre, encima, debajo, por debajo, posterior, frontal, distal y proximal se usan con respecto a los dibujos adjuntos. Tales términos de dirección no se deben interpretar como limitantes del alcance del sistema de ninguna manera.

Aunque la divulgación en el presente documento se refiere a determinadas realizaciones ilustradas, se ha de comprender que estas realizaciones se presentan a modo de ejemplo y no a modo de limitación. El intento de la siguiente descripción detallada, aunque describe realizaciones ilustrativas, se ha de interpretar que abarca todas las modificaciones, alternativas y equivalentes de las realizaciones que puedan caer dentro del espíritu y el alcance de la invención como se ha definido por las reivindicaciones adjuntas. La presente invención se puede utilizar junto con diversos procedimientos médicos que se usan convencionalmente en la técnica.

Con referencia ahora a las Figuras, un sistema 10 de la presente invención generalmente comprende uno o más de una cámara de recolección de tejido 20, una cámara de procesamiento 30, una cámara de desperdicios 40, una cámara de salida 50 y una cámara de muestra 60. Las diversas cámaras están acopladas entre sí a través de uno o más conductos 12 de forma que los fluidos que contienen material biológico puedan pasar de una cámara a otra mientras mantienen una vía de fluido/tejido estéril cerrada. Los conductos pueden comprender cuerpos rígidos o flexibles denominados en el presente documento de manera intercambiable lúmenes y tubería, respectivamente. En determinadas realizaciones, los conductos están en forma de tuberías flexibles, tales como tuberías de polietileno usadas convencionalmente en entornos clínicos, silicona o cualquier otro material conocido en la técnica. Los conductos 12 pueden variar de tamaño dependiendo de si se desea el paso de fluido o tejido. Los conductos 12 también pueden variar de tamaño dependiendo de la cantidad de tejido o fluido que entra en un ciclo a través del sistema. Por ejemplo, para el paso de fluido, los conductos pueden tener un diámetro que varía desde aproximadamente 0,15 hasta aproximadamente 1,91 centímetros y para el paso de tejido, los conductos pueden tener un diámetro que varía desde 0,79 hasta 1,91 centímetros. En general, el tamaño de los conductos se selecciona para equilibrar el volumen que los conductos pueden alojar y el tiempo necesario para transportar el tejido o fluidos a través de dichos conductos. En versiones automatizadas del sistema, los parámetros anteriores, es decir, volumen y tiempo para el transporte, se tienen que identificar de forma que las señales apropiadas se puedan transmitir al dispositivo de procesamiento del sistema. Esto permite al dispositivo mover volúmenes precisos de líquido y tejido desde una cámara a otra. La tubería flexible usada debe ser capaz de soportar presión negativa para reducir la probabilidad de colapso. La tubería flexible usada también debe ser capaz de soportar presión positiva que se genera por, por ejemplo, una bomba de desplazamiento positivo, que se puede usar en el sistema.

Todas las cámaras del sistema pueden comprender uno o más orificios, por ejemplo, orificios de salida 22 o entrada 21, que aceptan conexiones de jeringa y de tubería de succión convencionales IV. Los orificios pueden ser un orificio sellado tal como un orificio de acceso de aguja de jeringa cerrado por tabique de goma 51. Los orificios de entrada se pueden acoplar a una o más cánulas (no mostradas) a modo de conductos. Por ejemplo, un orificio de entrada de tejido 21 se puede acoplar a una cánula de liposucción de uso único integrada y el conducto puede ser una tubería flexible. Los conductos generalmente se colocan para proporcionar pasos de fluido de una cámara del sistema a otra. Con este fin, los conductos y orificios se pueden acoplar a, por ejemplo, un dispositivo de succión (no mostrado) que puede funcionar manualmente o automáticamente. El dispositivo de succión puede ser, por ejemplo, una jeringa o una bomba eléctrica. El dispositivo de succión debe ser capaz de proporcionar suficiente presión negativa para aspirar tejido desde un paciente. Generalmente, cualquier dispositivo de succión adecuado conocido por un experto en la materia, por ejemplo, un cirujano, se puede usar.

Los conductos 12 pueden comprender además una o más abrazaderas (no mostradas) para controlar el flujo de material entre diversos componentes del sistema. Las abrazaderas son útiles para mantener la esterilidad del sistema sellando eficazmente regiones diferentes 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. Las válvulas pueden ser válvulas de manguito electromecánicas o las válvulas pueden ser válvulas neumáticas. Las válvulas también pueden ser válvulas hidráulicas o válvulas mecánicas. Tales válvulas preferentemente se activan mediante un sistema de control que puede estar acoplado a palancas. Las palancas se pueden manipular manualmente de forma que las palancas se activen. En realizaciones automatizadas, el sistema de control puede estar acoplado a las palancas así como a un dispositivo de procesamiento que puede activar las válvulas en condiciones de activación predeterminadas. En determinadas realizaciones automatizadas, la activación de las válvulas puede ser parcialmente automatizada y parcialmente sujeta a la preferencia del usuario de forma que el procedimiento se pueda optimizar. En aun otras realizaciones, determinadas válvulas se pueden activar manualmente y otras automáticamente a través del dispositivo de procesamiento. Las válvulas 14 también se pueden usar 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 comprender sensores 29, por ejemplo, sensores ópticos, sensores ultrasónicos, sensores de presión u otras formas de monitores conocidos en la técnica que son capaces de distinguir entre los diversos componentes de fluido y niveles de fluido que fluyen a través del sistema. Preferentemente, los sensores 29 pueden ser sensores ópticos.

- 5 El sistema también puede incluir una pluralidad de filtros 36. Los filtros pueden estar dentro de una cámara del sistema 28. Diferentes cámaras dentro del sistema pueden comprender diferentes filtros. Los filtros son eficaces para separar las células regenerativas, por ejemplo, células madre y/o células progenitoras, de células indeseables y agentes de disgregación que se pueden usar de acuerdo con el sistema. Un conjunto de filtro 36 puede incluir un dispositivo de filtración de fibra hueco. Un conjunto de filtro 36 puede incluir un dispositivo de filtración percolativo, 10 que puede o no usarse con un procedimiento de sedimentación. El conjunto de filtro 36 puede comprender un dispositivo de centrifugación, que puede o no usarse con un dispositivo y procedimiento de elutriación. El sistema puede comprender una combinación de estos dispositivos de filtración. Las funciones de filtración de la presente invención pueden ser de dos veces, con algunos filtros eliminando cosas de la concentración final tales como colágeno, lípidos libres, adipocitos libres y colagenasa residual y con otros filtros usándose para concentrar el 15 producto final. Los filtros del sistema pueden comprender una pluralidad de poros que varían en diámetro y/o longitud desde 20 hasta 800 μm . Preferentemente, la cámara de recolección tiene un filtro prefijado 28 con una pluralidad de poros que varían desde 80 hasta 400 μm . La cámara de recolección 20 puede tener un filtro prefijado 28 con una pluralidad de poros de 265 μm . Los filtros pueden ser desmontables y/o desechables.

- 20 El sistema también puede comprender uno o más dispositivos de control de 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 temperatura puede ser un calentador, un refrigerador o ambos, es decir, puede ser capaz de cambiar entre un calentador y un refrigerador. El dispositivo de temperatura puede ajustar la temperatura de cualquiera de los materiales que pasa a través del sistema, incluyendo el tejido, los agentes de disgregación, los 25 agentes de resuspensión, los agentes de enjuague, los agentes de lavado o los aditivos. Por ejemplo, el calentamiento de tejido adiposo facilita la disgregación mientras que el enfriamiento de la producción de células regenerativas es deseable para mantener la viabilidad. También, si se necesitan reactivos calentados previamente para procesamiento de tejido óptimo, el papel del dispositivo de temperatura sería mantener la temperatura predeterminada en lugar de aumentar o disminuir la temperatura.

- 30 Para mantener una vía para fluido/tejido estéril cerrada, todos los orificios y válvulas pueden comprender un cierre que mantiene la configuración sellada del sistema. El cierre puede ser una membrana que es impermeable a fluido, aire y otros contaminantes o el mismo puede ser cualquier otro cierre conocido en la técnica adecuado. Adicionalmente, todos los orificios del sistema se pueden diseñar de forma que los mismos puedan alojar jeringas, agujas u otros dispositivos para extraer los materiales en las cámaras sin comprometer la esterilidad del sistema.

- 35 El tejido se puede extraer a partir de un paciente a través de cualquier procedimiento reconocido en la técnica. El tejido aspirado se puede extraer antes de colocarse en el sistema para procesamiento. El tejido aspirado típicamente se transfiere a la cámara de recolección 20 a través de los conductos 12 a través de un orificio de entrada sellado, tal como un orificio de acceso de aguja de jeringa cerrado por tabique de goma (no mostrado en la cámara de recolección). Como alternativa, la etapa de extracción de tejido puede ser parte del sistema. Por ejemplo, la cámara de recolección 20 puede comprender una línea de vacío 11 que facilita la eliminación de tejido usando una cánula 40 convencional insertada en el paciente. Por tanto, en la presente realización, el sistema completo está unido al paciente. El tejido se puede introducir en la cámara de recolección 20 a través de un orificio de entrada 21 a través de un conducto tal como 12a que son parte de una vía estéril cerrada. La cámara de recolección 20 puede comprender una pluralidad de cartuchos o cilindros flexibles o rígidos o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la cámara de recolección 20 puede comprender uno o más cartuchos rígidos de tamaños variables. La cámara de 45 recolección 20 también puede comprender una o más bolsas flexibles. En tales sistemas, la bolsa preferentemente se proporciona 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 recolección 20 tiene un tamaño para contener la cantidad necesaria de solución salina para lavar y disgregar apropiadamente el tejido antes de la etapa de lavado y concentrado del procedimiento realizado en la cámara de procesamiento 30. Preferentemente, el volumen de tejido o 50 fluido presente en la cámara de recolección 20 se puede determinar fácilmente a simple vista. Por ejemplo, para obtener células regenerativas a partir de tejido adiposo, una cámara de recolección adecuada tiene la capacidad para mantener 800 ml de lipoaspirado y 1200 ml de solución salina. La cámara de recolección 20 puede tener una capacidad de al menos 2 litros. En general, el tamaño de la cámara de recolección 20 variará dependiendo del tipo y la cantidad de tejido recogido a partir del paciente. La cámara de recolección 20 puede tener un tamaño para 55 contener tan poco como aproximadamente 5 ml hasta aproximadamente 2 litros de tejido. Para volúmenes de tejido más pequeños, por ejemplo, 5 ml a 100 ml, el tejido se puede recoger en una jeringa antes de transferirlo a la cámara de recolección 20.

- 60 La cámara de recolección 20 se puede construir usando cualquier material biocompatible adecuado que se pueda esterilizar. En una realización preferida, la cámara de recolección 20 se construye de material desechable que cumple con los requerimientos de biocompatibilidad para contacto intravascular como se ha descrito en la norma ISO 10993. Por ejemplo, se puede usar policarbonato acrílico o ABS. La vía de fluido de la cámara de recolección 20 preferentemente está libre de pirógenos, es decir, adecuada para uso sanguíneo sin peligro de transmisión de

enfermedad. En una realización, la cámara de recolección 20 se construye de un material que permite al usuario determinar visualmente el volumen apropiado de tejido presente en la cámara. El volumen de tejido y/o fluido en la cámara de recolección 20 también se puede determinar mediante sensores automatizados 29. La cámara de recolección 20 preferentemente se diseña de forma que en una realización automatizada, el sistema puede

5

determinar el volumen de tejido y/o de fluido dentro de la cámara con un grado razonable de exactitud. Preferentemente, el sistema detecta el volumen dentro de la cámara de recolección con una precisión de más o menos el quince por ciento.

Por ejemplo, la cámara de recolección 20 puede estar en forma de una cámara rígida, por ejemplo, una cámara construida de un policarbonato de calidad médica que contiene un filtro prefijado más o menos cónico 28 de poliéster de calidad médica con un tamaño de malla de 265 μm (véase la Figura 5). El recipiente de recolección de tejido rígido puede tener un tamaño de aproximadamente veinte coma treinta y dos centímetros de alto y aproximadamente doce coma setenta centímetros de diámetro; el espesor de la pared puede ser de aproximadamente cero coma treinta y dos centímetros. Se puede acceder al interior del cilindro a través de, por ejemplo, uno o más orificios para tubería de succión, uno o más orificios con tubería para la conexión a través de tecnología de acoplamiento estéril y uno o más orificios para acceso de punción de aguja a través de un tabique de goma. El filtro prefijado 28 en el interior de la cámara de recolección 20 preferentemente está estructurado para conservar el tejido adiposo y para dejar pasar tejido no adiposo a medida que, por ejemplo, los tejidos se retiran del paciente. Más específicamente, el filtro 28 puede permitir el paso de lípido libre, sangre y solución salina, mientras que retiene fragmentos de tejido adiposo durante o, en otra realización, después de la recolección inicial del tejido adiposo. Con respecto a esto, el filtro 28 incluye una pluralidad de poros de tamaños iguales o diferentes, pero que varían de tamaño desde aproximadamente 20 μm hasta 5 mm. Preferentemente, el filtro 28 incluye una pluralidad de poros de 400 μm . En una realización preferida, el filtro 28 es una malla de poliéster de calidad médica de aproximadamente 200 μm de espesor con un tamaño de poro de aproximadamente 265 μm y un área abierta de aproximadamente el 47%. Este material retiene el tejido durante el enjuague pero permite que las células pasen a través de la malla a continuación de la disgregación del tejido. Por tanto, cuando los tejidos se aspiran a partir del paciente, el tejido no adiposo se puede separar del tejido adiposo. La misma funcionalidad se puede conseguir con diferentes materiales, tamaño de malla y el número y tipo de orificios. Por ejemplo, tamaños de poro de malla menores de 100 μm o tan grandes como varios miles de micrómetros podrían conseguir el mismo fin de permitir el paso de solución salina y células sanguíneas mientras que retienen agregados y fragmentos de tejido adiposo. De forma similar, el mismo fin se podría conseguir mediante el uso de un material plástico rígido alternativo o mediante muchas otras modificaciones que podrían conocer los expertos en la materia.

10

15

20

25

30

El sistema 10 también puede comprender 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 recolección 20 comprende vías de fluido cerradas que permiten que se añadan las soluciones o agentes de lavado y disgregación al tejido de una manera aséptica.

35

Los recipientes para la solución de lavado 23 y los agentes de disgregación 24 pueden ser cualquier recipiente adecuado que pueda contener sus contenidos de una manera estéril, por ejemplo, una bolsa plegable, tal como una bolsa IV usada en entornos clínicos. Estos recipientes pueden tener conductos 12, tales como conducto 12e, acoplado a la cámara de recolección 20 de forma que la solución de lavado y el agente de disgregación se puedan suministrar al interior de la cámara de recolección 20. La solución de lavado y el agente de disgregación se pueden suministrar al interior de la cámara de recolección 20 a través de cualquier manera reconocida en la técnica, incluyendo presión por gravedad sencilla aplicada al exterior de los recipientes para la solución salina 23 y/o los agentes de disgregación 24 o mediante la colocación de una bomba de desplazamiento positivo en los conductos, por ejemplo, conducto 12d en la Figura 4. En realizaciones automatizadas, el dispositivo de procesamiento del sistema calcula diversos parámetros, por ejemplo, el volumen de solución salina y el tiempo o número de ciclos necesarios de lavado así como la concentración o cantidad de agente de disgregación y el tiempo necesario para la disgregación en base a información introducida inicialmente por el usuario (por ejemplo, volumen de tejido que se está procesando). Como alternativa, las cantidades, tiempos, etc. se pueden manipular manualmente por el usuario.

40

45

El tejido y/o fluido dentro de la cámara de recolección se debe mantener a una temperatura que varía desde 30 grados Celsius hasta 40 grados Celsius. En una realización preferida, la temperatura de la suspensión dentro de la cámara de recolección se mantiene a 37 grados Celsius. Si el procedimiento quirúrgico o la aplicación terapéutica necesita retrasarse, el tejido seleccionado se puede almacenar en la cámara de recolección para uso posterior. El tejido se puede almacenar a temperatura ambiente o a aproximadamente 4 grados Celsius durante hasta 96 horas.

50

La solución de lavado puede ser cualquier solución conocida por un experto en la materia, incluyendo solución salina o cualquier otra solución de electrolitos tamponada o no tamponada. Los tipos de tejido que se estén procesando determinarán los tipos o combinaciones de soluciones de lavado usadas. Típicamente, la solución de lavado, tal como solución salina, entra en la cámara de recolección 20 después de que el tejido adiposo se ha retirado del paciente y se ha colocado en la cámara de recolección. Sin embargo, la solución de lavado se puede suministrar a la cámara de recolección 20 antes de extraer el tejido adiposo o se puede suministrar a la cámara de recolección 20 simultáneamente con el tejido adiposo. En la cámara de recolección 20, la solución de lavado y el tejido adiposo extraído se pueden mezclar por cualquier medio incluyendo los procedimientos descritos más adelante.

55

60

Por ejemplo, el tejido se puede lavar mediante agitación (que maximiza la viabilidad celular y minimiza la cantidad del lípido libre liberado). El tejido se puede agitar girando la cámara de recolección 20 completa a través de un arco de grados variables (por ejemplo, a través de un arco de aproximadamente 45 grados a aproximadamente 90 grados) a velocidades variables, por ejemplo, aproximadamente 30 revoluciones por minuto. En otras realizaciones, el tejido se agita girando la cámara de recolección 20 completa, en la que la cámara de recolección 20 comprende una o más paletas o salientes unidas rígidamente a una superficie interior de la cámara de recolección, a través de un arco de grados variables (por ejemplo, a través de un arco de aproximadamente 45 grados a aproximadamente 90 grados) a velocidades variables, por ejemplo, aproximadamente 30 revoluciones por minuto. La rotación de la cámara de recolección 20 descrita anteriormente se puede conseguir mediante un mecanismo de transmisión unido a o en proximidad con la cámara de recolección 20. El mecanismo de transmisión puede ser una cinta o engranaje sencillo u otro mecanismo de transmisión conocido en la técnica. La velocidad de rotación puede ser, por ejemplo, 30 revoluciones por minuto. En general, se ha observado que velocidades más elevadas generan volúmenes más grandes de lípidos libres y pueden no ser óptimas.

Por ejemplo, el tejido se agita colocando un eje rotativo 25 dentro de la cámara de recolección 20, en el que el eje rotativo comprende una o más paletas 25a o salientes unidas rígidamente al eje rotativo 25 que pasa a través de la mezcla a medida que el eje se está rotando. En determinadas realizaciones, el eje rotativo 25 con paletas unidas rígidamente 25a se puede apoyar en la parte inferior de la cámara de recolección 20. Esto se puede conseguir, por ejemplo, colocando el dispositivo similar a paleta en un campo magnético de giro (por ejemplo, agitador magnético). Como alternativa, la agitación del tejido se puede conseguir usando un agitador sencillo conocido en la técnica, es decir, un dispositivo que implementa agitación hacia arriba y hacia abajo sin rotación. El tejido también se puede lavar usando cualquier otro medio reconocido en la técnica incluyendo balanceo, agitación, inversión, etc.

Después de una cantidad deseada de ciclos de lavado, se puede suministrar un agente de disgregación de tejido a la cámara de recolección 20 para separar las células regenerativas de los componentes de tejido adiposo restantes. El agente de disgregación puede ser cualquier agente de disgregación conocido por un experto en la materia. Los agentes de disgregación que se pueden usar incluyen proteasas neutras, colagenasa, tripsina, lipasa, hialuronidasa, desoxirribonucleasa, miembros de la familia de mezcla de enzima Blendzyme, por ejemplo, Liberasa H1, pepsina, energía ultrasónica u otra energía 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 se pueden añadir con otras soluciones. Por ejemplo, se puede añadir solución salina, tal como solución salina suministrada a partir de una fuente de solución salina 23 como se ha descrito anteriormente, al tejido adiposo junto con o inmediatamente seguido por la adición de colagenasa. En un ejemplo, 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, se puede añadir una concentración más elevada de colagenasa o agente similar para disminuir el tiempo de digestión. El tejido adiposo lavado y el agente de disgregación de tejido después se pueden agitar de maneras similares a los procedimientos de agitación descritos anteriormente, hasta que el tejido adiposo lavado se disgrega. Por ejemplo, el tejido adiposo lavado y el agente de disgregación de tejido se pueden agitar girando la cámara de recolección completa a través de un arco de aproximadamente 90 grados, teniendo un eje que contiene una o más paletas que pasan a través de la solución a medida que el eje se rota y/o rotando la cámara de recolección completa que contiene paletas o salientes en la superficie interior de la cámara de recolección.

Dependiendo del fin para el cual se usarán las células obtenidas de tejido adiposo, el tejido adiposo se puede disgregar parcialmente o disgregar completamente. Por ejemplo, si las células obtenidas del tejido adiposo se tienen que combinar con una unidad de tejido adiposo, puede ser deseable disgregar parcialmente el tejido adiposo recogido, para eliminar una parte del tejido adiposo disgregado parcialmente y después continuar disgregando la parte restante de tejido adiposo que queda en la cámara de recolección. Como alternativa, una parte de tejido adiposo lavado se puede retirar y dejar a un lado en un recipiente de muestra antes de cualquier digestión. El tejido adiposo recogido se puede disgregar parcialmente para concentrar las células antes de volverse a reintroducir en el paciente. Por ejemplo, el tejido adiposo se puede mezclar con un agente de disgregación de tejido durante un periodo de tiempo generalmente menor de aproximadamente 20 minutos. Una parte del tejido disgregado parcialmente después se puede retirar de la cámara de recolección y el tejido disgregado parcialmente restante se puede disgregar adicionalmente mezclando el tejido adiposo con un agente de disgregación de tejido durante 40 minutos adicionales. Cuando las células obtenidas de tejido adiposo se tienen que usar como una población esencialmente pura de células regenerativas, el tejido adiposo se puede disgregar completamente.

Después de la digestión, el tejido y la solución de agente de disgregación se permite que se asienten durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que los componentes boyantes y no boyantes de la solución se diferencien dentro de la cámara de recolección. Típicamente, el tiempo varía desde aproximadamente 15 segundos hasta varios minutos pero se pueden implementar otros tiempos en realizaciones modificadas. La capa boyante comprende las células regenerativas que necesitan lavado y concentración adicional. La capa no boyante comprende sangre, colágeno, lípidos y otros componentes celulares no regenerativos del tejido. La capa no boyante se debe retirar a la cámara de desperdicios.

Por consiguiente, la cámara de recolección 20 preferentemente comprende un orificio de salida 22 en el punto más bajo de la cámara de forma que la sangre y otros componentes no boyantes del tejido se puedan drenar hacia uno o

más recipientes de desperdicios 40 a través de uno o más conductos 12. La cámara de recolección 20 generalmente está en (o se puede colocar en) una posición vertical de forma que los orificios de salida 20 se localicen en el fondo de la cámara de recolección. El drenaje puede ser pasivo o activo. Por ejemplo, los componentes no boyantes descritos anteriormente se podrían drenar usando gravedad, aplicando presión positiva o negativa, mediante el uso de bombas 34 o mediante el uso de rejillas de ventilación 32. En realizaciones automatizadas, el dispositivo de procesamiento puede enviar señales a determinadas válvulas y/o bombas para drenar la capa no boyante a partir de la cámara de recolección 20. Las realizaciones automatizadas también pueden comprender sensores 29 que pueden detectar cuándo la superficie de contacto entre los líquidos boyante y no boyante se ha alcanzado. Las realizaciones automatizadas también pueden comprender 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 fluye en el conducto que conduce hacia fuera de la cámara de recolección. El cambio apropiado en la refracción de la luz puede señalar la presencia de la capa boyante en los conductos de salida lo que indica que la capa no boyante se ha drenado. El sensor 29 después puede enviar una señal al dispositivo de procesamiento para que continúe con la siguiente etapa.

El tejido se puede procesar para recuperar el componente celular no regenerativo del tejido. Por ejemplo, en determinadas aplicaciones terapéuticas o de investigación, se pueden desear colágeno, proteínas, componentes de matriz o estromales, lípidos, adipocitos u otros componentes del tejido. En tales escenarios, es la capa boyante que comprende las células regenerativas la que tiene que eliminarse como se ha descrito anteriormente a la cámara de desperdicios. Después la cámara no boyante se conserva en el sistema para procesamiento adicional según sea necesario.

Una vez que la capa no boyante se elimina, la capa boyante que comprende las células regenerativas se puede lavar una o más veces para eliminar los contaminantes residuales. Por consiguiente, la cámara de recolección 20 típicamente incluye uno a 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 hacia fuera de la cámara de recolección 20. Por ejemplo, la cámara de recolección puede incluir uno o más orificios de entrada sellados como se ha descrito en el presente documento. La cámara de recolección 20 también puede incluir una o más cubiertas (no mostradas), tales como una cubierta superior y una cubierta inferior para asegurar además que el sistema permanece estéril mientras la solución de lavado se suministra en la cámara de recolección y/o los residuos se transportan hacia fuera. Los orificios 21 se pueden proporcionar en las cubiertas de las cámaras de recolección o en una pared lateral de la cámara de recolección.

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

Durante el lavado y/o la disgregación, se pueden añadir uno o más aditivos a los diversos recipientes según sea necesario 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 los adipocitos y/o los glóbulos rojos o aditivos que enriquecen las poblaciones celulares de interés (mediante adherencia diferencial a restos de fase sólida o de otra manera promueven la reducción sustancial o el enriquecimiento de poblaciones celulares). Otros aditivos posibles incluyen aquellos que promueven la recuperación y viabilidad de células regenerativas (por ejemplo, inhibidores de caspasa) o que reducen la posibilidad de reacción adversa en infusión o emplazamiento (por ejemplo, inhibidores de la agregación de células o tejido conectivo).

Después de que ha transcurrido un tiempo de asentamiento suficiente, la fracción no boyante de la mezcla resultante de fragmentos de tejido adiposo lavado y agentes de disgregación de tejido contendrá células regenerativas, por ejemplo, células madre y otras células progenitoras obtenidas del tejido adiposo. Como se ha descrito en el presente documento, la fracción no boyante 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 obtenidas de tejido adiposo, se separarán de otras células y materiales presentes en la fracción no boyante de la mezcla. Esta fracción no boyante se denomina en el presente documento la composición de células regenerativas y comprende múltiples tipos de células diferentes, incluyendo células madre, 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 los mismos, que estaban presentes en los fragmentos de tejido adiposo, o colagenasa residual del procedimiento de disgregación de tejido.

La cámara de procesamiento 30 preferentemente se posiciona dentro del sistema de forma que la composición de células regenerativas se mueva desde la cámara de recolección 20 hasta la cámara de procesamiento 30 por medio de tuberías 12, válvulas 14 y bomba 34 de una manera estéril. La cámara de procesamiento tiene un tamaño para

alojar mezclas de tejido/fluido que varían desde 10 ml hasta 1,2 l. En una realización preferida, la cámara de procesamiento tiene un tamaño para alojar 800 ml. En determinadas realizaciones, la composición de células regenerativas completa a partir de la cámara de recolección 20 se dirige hacia 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 la muestra 60, para volver a combinarse con células procesadas en la cámara de procesamiento 30 en un momento posterior.

La cámara de procesamiento 30 se puede construir usando cualquier material biocompatible adecuado que se pueda esterilizar. En una realización preferida, la cámara de procesamiento se construye de material desechable que cumple con los requerimientos de biocompatibilidad para el contacto intravascular, como se describe en la norma ISO 10993. Por ejemplo, se pueden usar policarbonato, acrílico, ABS, acetato de etileno vinilo o copolímeros de estireno-butadieno (SBC). En otra realización, la vía del fluido de la cámara de procesamiento desechable está libre de pirógenos. La cámara de procesamiento puede estar en forma de una bolsa plástica, tal como aquellas usadas convencionalmente en el procesamiento de sangre en 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 descrita en la Solicitud de los Estados Unidos del mismo solicitante N° 10/316.127, presentada el 7 de diciembre de 2001 y la Solicitud de los Estados Unidos N° 10/325.728, presentada el 20 de diciembre de 2002.

La cámara de procesamiento 30 se puede construir de cualquier manera adecuada para separar y concentrar células, incluyendo filtración y centrifugación y/o combinaciones de las mismas. En determinadas realizaciones, la composición de células regenerativas a partir de la cámara de recolección 20 se introduce en la cámara de procesamiento 30 donde la composición se puede filtrar para separar y/o concentrar una población de células regenerativas particular. La filtración celular es un procedimiento para separar componentes particulares y células de otros componentes diferentes o tipos de células. Por ejemplo, la composición de células regenerativas comprende múltiples tipos de células diferentes, incluyendo células madre, células progenitoras y adipocitos, así como uno o más contaminantes, tales como colágeno, que estaban presentes en los fragmentos de tejido adiposo o colagenasa residual del procedimiento de disgregación de tejido. 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 la filtración de células a partir de un líquido incluyen, pero sin limitación, tamaño de poro de los medios de filtro, geometría (forma) del poro, área de superficie del filtro, dirección de flujo de la solución que se está filtrando, presión transmembrana, dilución de la población de células particular, tamaño y forma del particulado así como tamaño celular y viabilidad celular. De acuerdo con la divulgación del presente documento, las células particulares que se desean separar o filtrar son típicamente células madre obtenidas de tejido adiposo. Sin embargo, en determinadas realizaciones, las células particulares pueden incluir células progenitoras obtenidas de tejido adiposo, tales como células precursoras endoteliales, solas o en combinación con las células madre.

La composición de células regenerativas se puede dirigir a través de un conjunto de filtro, tal como un conjunto de filtro 36. El conjunto de filtro 36 puede comprender una pluralidad de filtros que están estructurados para realizar diferentes funciones y separar la composición de células regenerativas en partes diferentes o componentes. Por ejemplo, uno de los filtros se pueden configurar para separar colágeno de la composición de células regenerativas, uno de los filtros se puede configurar para separar adipocitos y/o componentes lipídicos de la composición de células regenerativas y uno de los filtros se puede configurar para separar enzimas residuales, tales como el agente de disgregación de tejido, a partir de la composición de células regenerativas. En determinados ejemplos, uno de los filtros es capaz de realizar dos funciones, tales como separar colágeno y el agente de disgregación de tejido de la composición. La pluralidad de filtros están dispuestos típicamente en serie; sin embargo al menos una parte de los filtros se puede disponer en paralelo también. Una disposición en serie de los filtros del conjunto de filtros 36 se muestra en la Figura 2. Una disposición en paralelo de los filtros del conjunto de filtro 36 se muestra en la Figura 3.

En un ejemplo, el conjunto de filtro 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 típicamente tienen aproximadamente 0,1 micrómetros de diámetro y pueden ser de hasta 20 micrómetros de largo. Las partículas de colágeno pueden ser de tamaños variables dependiendo de la digestión. Las mismas también pueden ser fibrillas, lo que significa que las mismas tienen giros y vueltas. Cualquiera de los filtros descritos en el presente documento puede estar hecho a partir de poliétersulfona, poliéster, PTFE, polipropileno, PVDF, o posiblemente celulosa. Existen dos posibilidades para filtrar el colágeno. Una es tratar de eliminar las partículas grandes en primer lugar, dejando que las células pasen a través, lo cual requeriría por ejemplo un filtro probablemente en el intervalo de 10 micrómetros. El segundo procedimiento es usar un filtro de tamaño más pequeño, tal como 4,5 micrómetros, con la intención de que el colágeno se dirigiera bien, de forma de atrapar las células y permitir que el colágeno pase a través. Esto necesitaría un medio para hacer flotar las células lejos del filtro. También puede existir la posibilidad de implementar un filtro que atraería y atraparía las fibras de colágeno.

El segundo filtro se configura para eliminar adipocitos inmaduros libres que no son boyantes en la composición de células regenerativas. En una realización, el segundo filtro se puede construir de poliéster y tiene un tamaño de poro entre aproximadamente 30 y aproximadamente 50 micrómetros con un tamaño de poro preferido siendo

aproximadamente 40 micrómetros. Aunque se denomina un segundo filtro, la colocación de un dispositivo de este tipo puede estar en una primera, en lugar de una segunda posición para facilitar una eliminación inicial de células y partículas más grandes. El tercer filtro se configura para eliminar 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 una longitud menor de 1 μm . En determinadas realizaciones, los poros pueden tener diámetros que son más pequeños de 1 μm . En otras realizaciones, los poros tienen diámetros entre 10 kD y 5 micrómetros. En determinados ejemplos, el tercer filtro se puede configurar para concentrar la población de células regenerativas en un volumen pequeño de solución salina u otra solución de lavado, como se ha descrito en el presente documento. Como se prefiere actualmente, únicamente 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 a que es la más eficaz para eliminar la colagenasa con el efecto nocivo más pequeño a las células regenerativas. En una realización en la que el dispositivo es una colección de artículos listos para su uso, los tres filtros están en carcasas separadas. Es factible tener el primer y segundo filtros combinados en una carcasa si se usa una unidad de fibra hueca para el tercer filtro. Si el filtro final no es una configuración de fibra hueca entonces los tres filtros pueden estar contenidos en una carcasa.

Los filtros del conjunto de filtro 36 se pueden localizar en la cámara de procesamiento 30 o se pueden proporcionar como componentes separados de la cámara de procesamiento 30. Adicionalmente, los filtros del conjunto de filtro 36 se pueden proporcionar en cámaras de procesamiento múltiples o en una manera en línea. En determinadas realizaciones, los conductos o tuberías pueden actuar como una cámara o cámaras de procesamiento. La cámara de procesamiento puede tener un tamaño reducido de forma que la misma se vuelve el volumen interior de los conductos que conectan los filtros. Este tipo de sistema funcionará correctamente si el volumen de solución de tejido tiene un tamaño apropiado. Por tanto, los conductos pueden actuar como la cámara de procesamiento conteniendo el fluido con células a medida que se hace pasar a través de los filtros. Se debe tener cuidado de minimizar el volumen de los conductos de forma que las células/tejido no se pierdan de forma innecesaria en el procedimiento de imprimación y funcionamiento del sistema.

Con referencia a los ejemplos descritos anteriormente, la composición de células regenerativas, que contiene las células lavadas y el colágeno residual, adipocitos y/o agentes de disgregación de tejido no digerido, se puede dirigir a través del primer filtro para eliminar al menos una parte de y preferentemente sustancialmente todas las partículas de colágeno de la composición de forma que estén presentes pocas y preferentemente ninguna partícula de colágeno en la solución filtrada. La composición de células regenerativas filtrada que contiene los adipocitos y/o el agente de disgregación de tejido no digerido, después se puede dirigir a través del segundo filtro para eliminar al menos una parte de y preferentemente sustancialmente todos los adipocitos libres de la composición de células regenerativas filtradas. Posteriormente, la composición de células regenerativas filtrada dos veces, que contiene el agente de disgregación de tejido no digerido, se puede dirigir a través del tercer filtro, tal como un dispositivo de filtración de fibra hueca, como se ha descrito en el presente documento, para eliminar 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 restante después de haberse pasado a través del primero, segundo y tercer filtro) después se puede dirigir 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 a través de conductos a otros recipientes que pueden incluir la cámara de recolección 20, la cámara de salida 50 y/o el recipiente de desperdicios 40.

En un ejemplo, un filtro del conjunto de filtro 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 se pueden usar con el sistema divulgado 10 incluyen polisulfona, poliétersulfona o un material de éster mixto y similares. Estas fibras huecas o tubos huecos de medios de filtro pueden estar contenidos en un cartucho cilíndrico del conjunto de filtro 36. Los tubos o fibras individuales de los medios de filtro típicamente tienen un diámetro interior que varía desde aproximadamente 0,1 mm hasta aproximadamente 1 mm con un valor preferido siendo aproximadamente 0,5 mm. El diámetro y longitud de un cartucho cilíndrico adecuado determinará el número de tubos individuales de medios de filtro que se pueden colocar dentro del cartucho. Un ejemplo de un cartucho de filtro de fibra hueca adecuado es el FiberFlo[®] Tangential Flow Filter, N° de catálogo M-C-050-K (Minntech, Minneapolis, Minnesota). Los tamaños de poro de los medios de filtro pueden variar entre aproximadamente 10 kiloDaltons y aproximadamente 5 micrómetros siendo un tamaño de poro preferido 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 forma que una composición de células regenerativas se filtre fluyendo a través del lumen del cuerpo y los productos que se han de 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 con relación al 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 está filtrando. Preferentemente, el flujo de la composición es tangencial a los poros

del cuerpo de cada tubo hueco.

Mediante el uso de un flujo tangencial de fluido, la eficacia de la filtración de las células madre se puede potenciar con relación a otras técnicas de filtración. Por ejemplo, de acuerdo con algunas técnicas de filtración, los poros del medio de filtro se colocan de una manera tal que el filtro esté orientado perpendicular al flujo del fluido de forma que el medio de filtro bloquea la vía del fluido que se está filtrando, como se ilustra en la Figura 12B. En este tipo de filtración, las partículas que se están filtrando a partir de la composición de células regenerativas, por ejemplo, las células madre, tienden a acumularse en un lado del filtro y a bloquear el flujo del fluido a través de los poros. Este bloqueo puede reducir la eficacia del filtro. Adicionalmente, las células están constantemente comprimidas por la presión del flujo de fluido así como el peso de las células que se acumulan en el lado aguas arriba del filtro. Esto puede conducir a una lisis aumentada de las células madre. Por tanto, en tales 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 se pueden dirigir de forma indeseable contra el medio de filtro a medida que el fluido se pasa a través de los poros. Por consiguiente, los productos grandes en el líquido tales como las células pueden bloquear los poros, reduciendo de ese modo el efecto de filtración y aumentando una aparición de ruptura o lesión celular.

Por el contrario, en la configuración de fibra hueca del presente sistema 10, el fluido que se está filtrando 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 presión positiva del fluido en el interior del cuerpo así como una presión negativa que se aplica al exterior del cuerpo. En la presente realización, las células típicamente no están sometidas a la presión del flujo de fluido o el peso de otras células y, por lo tanto, las fuerzas de ruptura sobre las células madre se reducen. Por tanto, la eficacia y efectividad de la filtración se puede potenciar mediante la reducción en los índices de coagulación y la reducción en la lisis de células regenerativas. Debido al tamaño de la solución salina y las moléculas de proteína indeseadas, 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 hacia el recipiente de desperdicios 40. En un ejemplo, la filtración se potencia generando un vacío en la parte exterior del medio de filtro de tubo hueco. 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 de nuevo hacia la cámara de procesamiento 30 a través de un conducto entre el filtro y la cámara de procesamiento o hacia la cámara de salida 50.

En un ejemplo específico, el filtro de fibra hueca tiene aproximadamente un tamaño de poro de 0,05 micrómetros y contiene aproximadamente 550 cm² de área de superficie de medio 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 adicionales se pueden añadir a la composición. El procesamiento o el tiempo de filtrado puede ser 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 cuerpo) se considera la presión transmembrana. La presión transmembrana puede variar desde aproximadamente 1 mmHg hasta aproximadamente 500 mmHg siendo una presión preferida aproximadamente 200 mmHg. La recuperación y viabilidad de células nucleadas promedio usando la filtración de fibra hueca puede ser aproximadamente del 80% de células viables.

La cantidad de collagenasa que se elimina típicamente en un sistema de este tipo equivale a una reducción de tres log. Por ejemplo si la concentración inicial de collagenasa en la composición de células regenerativas que se transfiere desde la cámara de recolección hasta la cámara de procesamiento es 0,078 U/ml la concentración de collagenasa en la composición de células regenerativas final sería de 0,00078 U/ml. La collagenasa se elimina en el filtro de fibra hueca y el filtro de fibra hueca corresponde al tercer filtro descrito anteriormente.

Las cámaras de procesamiento que ilustran uno o más procedimientos de filtración celular descritos anteriormente se muestran en las Figuras, particularmente Figuras 1-3. Con referencia a las Figuras 1-3, entre la cámara de procesamiento 30 y la cámara de filtración del conjunto de filtro 36, se puede proporcionar una bomba, tal como la bomba 34. Adicionalmente, se pueden proporcionar rejillas de ventilación y sensores de presión, tales como la rejilla de ventilación 32 y el sensor de presión 39, en línea con la cámara de procesamiento 30 y el conjunto de filtro 36.

También se pueden proporcionar accesorios para la cámara de salida 50. Estos componentes opcionales (por ejemplo, la bomba 34, la rejilla de ventilación 32, el sensor de presión 39 y los accesorios para la cámara de salida 50) se pueden proporcionar entre la cámara de procesamiento 30 y el conjunto de filtro 36 de forma que el líquido contenido en la cámara de procesamiento 30 pueda fluir hacia uno o más de estos componentes opcionales antes de fluir a través del conjunto de filtro 36. Por ejemplo, el líquido puede fluir a través de la bomba 34 antes de pasar al conjunto de filtro 36. O, el líquido puede pasar a través del sensor de presión 39 antes de pasar a través del conjunto de filtro para obtener una presión del líquido prefiltro en el sistema. En determinadas situaciones, uno o más de estos componentes también se pueden proporcionar como un elemento de la cámara de procesamiento 30, tal como la rejilla de ventilación 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 mediante la bomba 34 a medida que entra en la cámara de filtración del conjunto de filtro 36. Esta construcción puede facilitar la supervisión de la presión transmembrana a través de la membrana de filtro. Se puede añadir solución salina u otro tampón y solución de lavado adicionales a la composición de células regenerativas para ayudar en la eliminación de proteínas

indeseadas a medida que la composición se filtra a través del conjunto de filtro 36. Este lavado repetido se puede realizar múltiples veces para potenciar la pureza de las células regenerativas. En determinadas realizaciones, la solución salina se puede añadir en cualquier etapa según se considere necesario para potenciar la filtración.

En un ejemplo específico, que se proporciona a modo de ejemplo y no de limitación, las proteínas indeseadas y la solución salina u otra solución de lavado se eliminan de la siguiente manera. La composición con las células regenerativas, así como colágeno y partículas de tejido conectivo o fragmentos, adipocitos y colagenasa, se ciclan a través de una serie de filtros hasta que se alcanza un volumen mínimo. El volumen mínimo es una función del volumen de retención total del sistema y alguna constante predeterminada. El volumen de retención es el volumen de líquido que se contiene en la tubería y los conductos si todas las cámaras de procesamiento están vacías. En un ejemplo, el volumen mínimo es 15 ml. Cuando el volumen mínimo se alcanza, un volumen predeterminado de solución de lavado se introduce en el sistema para mezclarse con la composición de células regenerativas. Esta mezcla se solución de lavado y de la composición de células regenerativas después se cicla a través de los filtros hasta que se alcanza nuevamente el volumen mínimo. Este ciclo se puede repetir múltiples veces para potenciar la pureza de las células regenerativas o, en otras palabras, para aumentar la proporción de células regenerativas en la composición a otros materiales en la composición. Véanse las Figuras 10 y 11.

Después de que se ha determinado que la composición de células regenerativas se ha limpiado de proteínas indeseadas y se ha concentrado de forma suficiente (en realizaciones ilustrativas, se pueden usar 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 aproximadamente 1×10^7 células/ml), una cámara de salida 50, tal como una bolsa de salida, se puede conectar a un orificio de salida de la cámara de procesamiento 30 y/o el conjunto de filtro 36, dependiendo de la realización específica. Después se puede abrir una rejilla de ventilación, tal como la rejilla de ventilación 32, para facilitar la salida de las células regenerativas concentradas. En una implementación, esta determinación de cuándo se ha alcanzado una concentración mínima se realiza empíricamente después de que se han desarrollado experimentos y programado en los controles electrónicos del dispositivo. La determinación puede ser una aportación al procedimiento de lo que se desea producir, es decir, cuántas células madre/progenitoras se desean o el intervalo de concentración de células. En base a datos científicos, se necesita obtener una cantidad predefinida de tejido adiposo y colocarse en el sistema para conseguir el rendimiento deseado. Con la rejilla de ventilación 32 abierta, una bomba, tal como la bomba 34, puede funcionar 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 accesorio en un extremo. De una forma estéril, el accesorio de la bolsa de salida se puede unir al orificio de salida y las células regenerativas concentradas se pueden transferir a la bolsa de salida.

Como se ilustra en las Figuras 1-3 se puede proporcionar una bomba de vacío 26 en el sistema 10 para cambiar la presión en el sistema, entre otras cosas. Por ejemplo, la bomba de vacío 26 se puede acoplar a la cámara de recolección 20 a través de un conducto, tal como un conducto 12b, para provocar una reducción en la presión dentro de la cámara de recolección 20. La bomba de vacío 26 también se puede acoplar a la cámara de procesamiento 30 por medio de un conducto, tal como un conducto 12g. Con relación a la operación de la bomba de vacío 26 con relación a la bomba 34, se pueden implementar dos bombas o fuentes de vacío separadas o se puede implementar una única usando válvulas que dirigen la succión de vacío a los diferentes conductos que lo necesitan en puntos específicos en el procedimiento. Adicionalmente, la bomba de vacío 26 se puede acoplar al recipiente de desperdicios 40 a través de un conducto, tal como conducto 12f.

Con referencia a las Figuras 10 y 11, la presión generada por la bomba de vacío 26 se puede usar para dirigir el flujo de fluidos, incluyendo las células regenerativas, a través de los conductos 12. Esta presión se puede suministrar en múltiples direcciones, por ejemplo, controlando automáticamente o manualmente la posición de una o más válvulas 14 en el sistema 10. El sistema 10 se puede preparar para funcionar apropiadamente con el uso de presión positiva o a través del uso de presión negativa o combinaciones de las mismas. Por ejemplo, las células regenerativas se pueden succionar a través del primer y segundo filtros descritos anteriormente hacia un recipiente de lado suave que está conectado al tercer filtro. El recipiente de lado suave puede estar en línea (en serie) conectado delante del tercer filtro. La cámara de salida final puede ser un recipiente de lado suave que está en el otro lado (por ejemplo, el lado aguas abajo) del tercer filtro. En la presente realización, la presión se usa para mover las células regenerativas desde un recipiente de lado suave hasta un segundo recipiente de lado suave a través del filtro.

En otro ejemplo del sistema 10, la filtración de las células madre y/o células progenitoras obtenidas de tejido adiposo se puede conseguir usando una combinación de filtración percolativa y sedimentación. Por ejemplo, un sistema de este tipo 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 las células progenitoras obtenidas de tejido adiposo) y después a través de un filtro. Algunas de las variables que están asociadas con la filtración percolativa de células a partir una composición de células regenerativas incluyen, pero sin limitación, tamaño de poro de los medios de filtro, geometría o forma del poro, área de superficie del filtro, dirección de flujo de la composición de células regenerativas que se está filtrando, caudal de la solución salina infundida, presión transmembrana, dilución de la población de células, tamaño y viabilidad celular.

En un ejemplo del sistema 10, la cámara de procesamiento 30 usa un conjunto de filtro 36 que implementa filtración

percolativa y sedimentación para separar y concentrar las células regenerativas. A modo de ejemplo, y no a modo de 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 inferior 30c, como se muestra en la Figura 6. Se proporciona una rejilla de ventilación 32 estéril en la superficie superior 30b.

En el ejemplo de la Figura 6, la cámara de procesamiento 30 se ilustra como que incluye un conjunto de filtro 36, que incluye dos filtros, tal como un filtro de poro grande 36a y un filtro de poro pequeño 36b. Los tamaños de poro de los filtros 36a y 36b típicamente están en el intervalo entre aproximadamente 0,05 micrómetros y aproximadamente 10 micrómetros. El filtro de poro grande 36a puede comprender poros con un diámetro de aproximadamente 5 μm y el filtro de poro pequeño 36b puede comprender poros con un diámetro de aproximadamente 1-3 μm . En un ejemplo, 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. Adicionalmente, la primera cámara 37a se muestra como que es la región de la cámara de procesamiento 30 que tiene un orificio de entrada 31a y un orificio de salida 31b. La cámara de procesamiento 30 ilustrada incluye una pluralidad de orificios que proporcionan vías de comunicación desde un exterior de la cámara de procesamiento 30 hasta el interior de la cámara de procesamiento 30, tales como orificios 31a, 31b y 31c. Los orificios 31a, 31b y 31c, se ilustran como que están dispuestos en la pared lateral 30a de un cuerpo de la cámara de procesamiento 30. Sin embargo, los orificios 31a, 31b y 31c se podrían colocar en otras regiones también. El orificio 31a se ilustra como un orificio de entrada de muestra, que está construido para acoplarse a un conducto de forma que una composición que contiene las células regenerativas se pueda pasar hacia el interior de la cámara de procesamiento 30. El orificio 31b se ilustra como un orificio de salida construido para acoplarse a un conducto de forma que las células separadas y concentradas se puedan retirar desde el interior de la cámara de procesamiento 30. El orificio 31c se ilustra como un orificio de entrada construido para acoplarse a un conducto para suministro de una solución de lavado fresca, tal como solución salina en el interior de la cámara de procesamiento 30.

Durante el funcionamiento, las células regenerativas se pueden introducir en la cámara central 37a a través de un orificio de entrada 31a. Solución salina u otro tampón se introduce en la cámara inferior 37b a través del orificio de entrada 31c. La solución salina se puede dirigir 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 el mismo contrarresta la fuerza de gravedad. El flujo de la solución salina proporciona a las células en la cámara la capacidad de separarse en base a la densidad de las células. Típicamente, a medida que la solución salina se fuerza a través de la composición las células grandes en la composición se sedimentarán hasta el fondo de la cámara central 37a y las células más pequeñas y las proteínas se llevarán a través del segundo filtro 36b a la cámara superior 37c. Esta filtración se consigue ajustando el caudal de la solución salina de forma que las células más grandes se apisonan en el lugar lo que permite que las partículas más pequeñas se liberen y se lleven con la solución salina. La rejilla de ventilación 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 fin del medio absorbente es atrapar las proteínas indeseadas en la solución para asegurar que las mismas no atraviesen el medio de filtro de nuevo hacia la solución de procesamiento si, por ejemplo, el caudal de la solución salina disminuye. Un medio absorbente puede ser un tipo de material de filtro que es absorbente o atrae materiales o componentes para filtrarse. Se puede añadir un orificio de flujo de salida encima del filtro superior para ayudar a extraer los desperdicios. Otra realización de esto puede ser aplicar un vacío suave desde la parte superior para ayudar a sacar los desperdicios. Se puede implementar medio absorbente cuando, como en la realización ilustrada, los caudales son relativamente pequeños. Después la solución salina y las proteínas en exceso se llevan hasta un recipiente de desperdicios.

Cuando las células más grandes (por ejemplo, las células madre y/o células progenitoras obtenidas de tejido adiposo) se han separado satisfactoriamente de las células y proteínas más pequeñas, la composición que contiene las células separadas se puede concentrar, como se ha descrito en el presente documento. La composición se puede concentrar adicionalmente después de que la misma se ha retirado de la cámara 37a a través de un orificio de salida 31b o mientras está en la cámara 37a. En un ejemplo, la concentración de células en la composición se aumenta de la siguiente manera. Después de que las células se han separado suficientemente los filtros, tales como filtros 36a y 36b, se pueden mover el 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 se puede proporcionar un miembro de vibración con relación a la cámara de procesamiento 30 para facilitar la concentración de las células en la composición. En un ejemplo, el miembro de vibración se puede acoplar al filtro 36b (por ejemplo, el filtro de poro pequeño). La vibración puede reducir una incidencia de células que quedan atrapadas en los filtros. La reducción en volumen de la composición permite retirar el exceso de solución salina como desperdicio y que las células se concentren en un volumen más pequeño.

En otro ejemplo, la concentración de las células regenerativas se consigue de la siguiente manera. Después de las células se han separado suficientemente, la composición de células regenerativas se pueden transferir a otra cámara (no mostrada) que usa gravedad para filtrar el exceso de solución salina. En una realización preferida, la sedimentación puede ocurrir en el mismo momento que la percolación. Esta sedimentación se puede conseguir introduciendo la composición en la parte superior de un filtro que tiene un tamaño de poro que varía desde

aproximadamente 10 kD hasta aproximadamente 2 micrómetros. En una realización, un filtro adecuado tiene un tamaño de poro de aproximadamente 1 micrómetro. La fuerza de gravedad permitirá que la solución salina y las partículas más pequeñas pasen a través del filtro a la vez que se evita que las células en la composición fluyan a través del filtro. Después de que la concentración deseada de células se ha obtenido y después de que las partículas más pequeñas filtradas se han eliminado de la parte inferior del filtro, la composición de células regenerativas se puede agitar para retirar las células del filtro y, posteriormente, las células regenerativas concentradas se pueden transferir a la bolsa de salida. Las partículas más pequeñas se pueden extraer como desperdicios a través de una salida.

En un ejemplo particular, la composición de células regenerativas a partir de la cámara de recolección 20 se transporta a la cámara de procesamiento 30 en la que la composición se puede centrifugar para separar y concentrar las células regenerativas. Los principios de 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, componentes y parámetros de centrifugación convencionales reconocidos en la técnica. Una cámara de procesamiento ilustrativa para uso como parte de un dispositivo centrífugo se muestra en las Figuras 7 y 8. Típicamente, un dispositivo centrífugo provoca que una cámara centrífuga (tal como la que se muestra en la Figura 7) gire alrededor de un eje para de ese modo aumentar la fuerza sobre las células en la solución para que sea mayor que la gravedad. Los materiales más densos o más pesados en la solución típicamente se sedimentan hasta un extremo de la cámara centrífuga, es decir, una cámara de salida 50 de la Figura 7, para formar un sedimento de células regenerativas. Después el sedimento se puede resuspender 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 tanto centrífuga como gravitacional. Específicamente, durante la centrifugación, la fuerza centrífuga dirige los componentes más densos de la composición de células regenerativas, por ejemplo, las células regenerativas, hacia los extremos más exteriores de la cámara centrífuga. A medida que la cámara centrífuga disminuye la velocidad y eventualmente se detiene, la fuerza gravitacional ayuda a las células regenerativas a permanecer en los extremos más exteriores de la cámara centrífuga y formar un sedimento celular. Por consiguiente, los componentes indeseados de la composición de células regenerativas, es decir, los desperdicios, se pueden eliminar sin alterar el sedimento celular.

En otro ejemplo adicional, la cámara de procesamiento puede comprender un concentrador de células en forma de un filtro de membrana giratoria. En un ejemplo adicional del procedimiento de centrifugación, también se puede aplicar elutriación centrífuga. En el presente ejemplo, las células se pueden separar en base al índice de sedimentación celular individual de forma que la fuerza direccional (por ejemplo, hacia fuera) aplicada mediante la centrifugación provoque que las células y los solutos se sedimenten a velocidades diferentes. En la elutriación, un caudal opuesto (por ejemplo, hacia adentro) aplicado bombeando solución en la dirección opuesta a la fuerza centrífuga se opone al índice de sedimentación de la población de células diana. El contraflujo se ajusta de forma que las células y partículas dentro de la solución se separen. La elutriación se ha aplicado en muchos casos de separación celular (Inoue, Carsten y col. 1981; Hayner, Braun y col. 1984; Noga 1999) y los principios y prácticas usados para optimizar el flujo y los parámetros centrífugos se pueden aplicar 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 elutriación de acuerdo con la presente invención. La realización de elutriación puede ser similar a la implementación de centrifugación hasta el alcance de que una fuerza se aplica a la solución usando un rotor giratorio. Algunas de las variables que se asocian con la separación de elutriación incluida actualmente incluyen, pero sin limitación, el tamaño y la forma de la cámara giratoria, el diámetro del rotor, la velocidad del rotor, el diámetro de la tubería de contraflujo, el caudal del contraflujo, así como el tamaño y la densidad de las partículas y las células que se tienen que eliminar de la solución. Al igual que en la centrifugación, las células regenerativas se pueden separar en base a densidades celulares individuales.

En una realización la composición de células regenerativas, por ejemplo, la solución que contiene las células regenerativas y la collagenasa, se introduce en una cámara de un rotor giratorio, como se muestra en la Figura 9.1. Después de que la solución se añade a la cámara se añade solución salina adicional a la cámara a un caudal predeterminado. El caudal de la solución salina se puede predeterminar como una función de la velocidad del rotor, el diámetro celular 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 fin de la solución salina adicional es proporcionar una condición dentro de la cámara de rotor donde las partículas más grande se moverán a un lado de la cámara y las partículas más pequeñas se moverán hacia el otro, como se ilustra en la Figura 9.2. El flujo se ajusta de manera que, en esta aplicación, las partículas más pequeñas saldrán de la cámara y se moverán hasta un recipiente de desperdicios, como se muestra en la Figura 9.3. Este movimiento da como resultado que la solución en la cámara de rotor tenga una población de células sustancialmente homogénea, tal como células madre. Después de que se ha determinado que las células madre se han separado del resto de los artículos en la solución (habiéndose eliminado de la cámara las proteínas y lípidos libres indeseados), se detiene el contraflujo. Las células dentro de la cámara después formarán 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 pueden incluir uno o más orificios, por ejemplo, orificio 51 ó 52. Uno o más de estos orificios se puede

diseñar para transportar las células regenerativas obtenidas usando cualquier combinación de procedimientos descritos anteriormente o una parte de los mismos, a través de conductos u otros dispositivos quirúrgicos, dispositivos de cultivo celular, dispositivos de maceración celular, dispositivos de terapia génica o dispositivos de purificación. Estos orificios también se pueden diseñar para transportar las células regenerativas a través de conductos a cámaras adicionales o recipientes dentro del sistema o como parte de otro sistema con los mismos fines descritos anteriormente. Los orificios de conductos también se pueden usar para añadir uno o más aditivos, por ejemplo, factores de crecimiento, fluidos de resuspensión, reactivos de expansión celular o reactivos de modificación celular incluyendo agentes que transfieren genes a las células. Los orificios de conductos también se pueden usar para transportar las células regenerativas a otras dianas tales como materiales de implante (por ejemplo, matrices o fragmentos óseos) así como otros implantes y dispositivos quirúrgicos.

El procesamiento adicional de las células también se puede iniciar mediante la reconfiguración de las interconexiones de los conjuntos desechables del sistema existente, reprogramando el dispositivo de procesamiento del sistema existente, proporcionando recipientes diferentes o adicionales y/o cámaras para el sistema existente, transportando las células a uno o más sistemas adicionales o dispositivos y/o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, el sistema se puede reconfigurar mediante cualquiera de los medios descritos anteriormente de forma que las células regenerativas obtenidas usando el sistema se puedan someter a uno o más de los siguientes: expansión celular (de uno o más tipos de células regenerativas) y mantenimiento celular (incluyendo enjuague de la lámina celular y cambio de medio); transfección transitoria; medición de la viabilidad celular; aplicación de terapia celular; aplicaciones de terapia génica; aplicaciones de ingeniería de tejido, medición de crecimiento, lisis, inoculación, infección o inducción celular.

Durante el procesamiento, uno o más aditivos se pueden añadir a o proporcionarse con las diversas cámaras o recipientes según sea necesario para potenciar los resultados. Estos aditivos también se pueden proporcionar como parte de otro sistema asociado con el sistema existente o separado del sistema existente. Por ejemplo, los aditivos se añaden o proporcionan sin la necesidad de eliminar las células regenerativas del sistema. En otros ejemplos, los aditivos se añaden o proporcionan conectando un nuevo recipiente o cámara que comprende los aditivos en un orificio no usado del sistema de una manera estéril. Como alternativa, los aditivos se añaden o proporcionan en un segundo sistema o dispositivo que no está conectado al 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 las poblaciones celulares de interés (mediante adherencia diferencial a restos de fase sólida o de otra manera promueven la reducción sustancial o el enriquecimiento de poblaciones celulares) como se ha descrito en el presente documento.

Por ejemplo, para obtener una población de células regenerativas homogénea, se puede emplear cualquier procedimiento adecuado para separar y concentrar el tipo de células regenerativas particular, tal como el uso de anticuerpos específicos de células 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 (seleccionar la eliminación de células indeseadas) o combinaciones de los mismos. También se pueden usar marcadores intracelulares tales como enzimas en la selección usando moléculas que emiten fluorescencia cuando actúan sobre ellas enzimas específicas. Adicionalmente, se podría insertar un material de fase sólida con propiedades adhesivas seleccionado para permitir la adherencia diferencial y/o la elución de una población particular de células regenerativas dentro del sedimento celular en la cámara de salida del sistema.

El enfoque de adherencia diferencial puede incluir el uso de anticuerpos y/o combinaciones de anticuerpos que reconocen moléculas de superficie expresadas diferencialmente en células regenerativas diana y células indeseadas. La selección en base a la expresión de marcadores de superficie de células específicas (o combinaciones de los mismos) es otra técnica aplicada comúnmente en la que los anticuerpos se unen (directamente o indirectamente) a una estructura de soporte de fase sólida (Geiselhart y col., 1996; Formanek y col., 1998; Graepler y col., 1998; Kobari y col., 2001; Mohr y col., 2001).

En otro ejemplo el sedimento celular se podría resuspender, aplicarse como una capa encima (o debajo) de un material fluido formado en un gradiente de densidad continuo o discontinuo y colocarse en una centrífuga para separación de poblaciones celulares en base a la densidad celular. En un ejemplo similar también se pueden emplear enfoques de flujo continuo tales como aféresis (Smith, 1997), y elutriación (con o sin contracorriente) (Lasch y col., 2000) (Ito y Shinomiya, 2001).

Otros ejemplos de aditivos pueden incluir componente biológicos o estructurales adicionales, tales como factores de diferenciación celular, promotores del crecimiento, agentes inmunosupresores, dispositivos médicos o cualquier combinación de los mismos, como se ha descrito en el presente documento. Por ejemplo, se pueden añadir otras células, tejidos, fragmentos de tejido, factores de crecimiento tales como VEGF y otros factores del crecimiento angiogénicos o arteriogénicos conocidos, compuestos biológicamente activos o inertes, matrices reabsorbibles u otros aditivos que tienen por objeto potenciar el suministro, la eficacia, la tolerabilidad o la función de la población de células regenerativas. La población de células regenerativas también se puede modificar mediante inserción de ADN o mediante colocación en un sistema de cultivo celular (como se ha descrito en el presente documento o como se

conoce en la técnica) de una manera tal de cambiar, potenciar o complementar la función de las células regenerativas para la obtención de un fin estructural o terapéutico. Por ejemplo, los expertos en la técnica conocen técnicas de transferencia génica para células madre, como se describe 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 adenoasociado, como se describe en (Walther y Stein, 2000) y (Athanasopoulos y col., 2000). También se pueden realizar técnicas basadas en no virus como se describe en (Muramatsu y col., 1998). Un gen que codifica uno o más factores de diferenciación celular, por ejemplo, un factor o factores de crecimiento o una citoquina o citoquinas, también se podría añadir. Los ejemplos de diversos agentes de diferenciación celular se describen 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 se podrían añadir genes que codifican factores o agentes antiapoptóticos. La adición de genes (o combinación de genes) podría ser mediante cualquier tecnología conocida en la técnica incluyendo pero sin limitación transducción adenoviral, "pistolas de genes", transducción mediada por liposoma y transducción mediada por retrovirus o lentivirus, plásmido, virus adenoasociado. Después estas células regenerativas se podrían implantar junto con un material de vehículo que porta un vehículo de administración de gen capaz de liberar y/o presentar genes a las células en el tiempo, de forma que la traducción pueda continuar o iniciarse *in situ*.

Cundo el medicamento de la invención es para administración a un paciente diferente al paciente a partir del cual se han obtenido las células y/o tejido, se pueden administrar uno o más agentes inmunosupresores al paciente que recibe las células y/o tejidos para reducir y preferentemente evitar el rechazo de trasplante. Como se usa en el presente documento, la expresión "fármaco o agente inmunosupresor" tiene por objeto incluir agentes farmacéuticos que inhiben o interfieren con la función inmune normal. Los ejemplos de agentes inmunosupresores adecuados con los procedimientos descritos en el presente documento incluyen agentes que inhiben las rutas de coestimulación de células T/células B, tales como agentes que interfieren con el acoplamiento de células T y células B a través de las rutas de CTLA4 y B7, como se describe en la Patente de los Estados Unidos Publicada N° 20020182211. Un agente inmunosupresor preferido es ciclosporina A. Otros ejemplos incluyen micofenilato de mofetilo, rapamicina y globulina anti-timocito. En una realización, el fármaco inmunosupresor se administra con al menos un agente terapéutico diferente. El fármaco inmunosupresor se administra en una formulación que es compatible con la vía de administración y se administra a un sujeto a una dosis suficiente para conseguir el efecto terapéutico deseado. En otra realización, el fármaco inmunosupresor se administra transitoriamente durante un tiempo suficiente para inducir la tolerancia a las células regenerativas de la invención.

En estas realizaciones, las células regenerativas se pueden poner en contacto, combinar, mezclar o añadir a los aditivos a través de cualquier manera reconocida en la técnica, incluyendo dispositivos tales como dispositivos de agitación y procedimientos asociados descritos en el presente documento. Por ejemplo, se puede usar balanceo, inversión, compresión pulsátil o rodillos móviles.

En otro aspecto, la población celular se podría colocar en el recipiente y rodearse mediante una envuelta plástica reabsorbible u otros materiales y componentes relacionados tales como aquellos fabricados por MacroPore Biosurgery, Inc. (véanse, por ejemplo, las Patentes de los 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).

Al menos una parte de las células regenerativas separadas y concentradas se puede criopreservar, como se ha descrito en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N° 10/242.094, titulada PRESERVATION OF NON EMBRYONIC CELLS FROM NON HE-MATOPOIETIC TISSUES, presentada el 12 de septiembre de 2002, que reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos 60/322.070 presentada el 14 de septiembre de 2001, que está transferida legalmente.

Al final del procesamiento, las células regenerativas se pueden recuperar manualmente a partir de la cámara de salida. El medicamento que comprende la célula se puede cargar en un dispositivo de suministro, tal como una jeringa, para colocación en el receptor mediante la vía subcutánea, intramuscular u otra técnica que permita el suministro de las células al sitio diana dentro del paciente. En otras palabras, el medicamento que comprende las células se puede colocar en el paciente mediante cualquier medio conocido por un experto en la materia incluyendo la colocación mediante aguja o catéter o mediante implante quirúrgico directo. En otras realizaciones, las células se pueden transportar automáticamente a una cámara de salida que puede estar en forma de un recipiente, jeringa o catéter, etc., que se puede usar para colocar las células en el paciente. El recipiente también se puede usar para almacenar las células para uso posterior o para criopreservación. Todos los métodos de recuperación se realizan de una manera estéril.

Los componentes del sistema pueden ser desechables (denominados en este documento "conjunto o conjuntos desechables"), de forma que partes del sistema se puedan desechar después de un uso único. Esta implementación puede ayudar a asegurar que cualquier superficie que se pone en contacto con el tejido del paciente se desechará apropiadamente después de usarse. Un conjunto desechable ilustrativo se ilustra en la Figura 13. En una realización preferida, los componentes desechables del sistema se esterilizan previamente y se envasan de forma de ser utilizables "listos para su uso" que son fáciles de usar y fáciles de cargar y que eliminan la necesidad de muchas conexiones de tubería y enrutamiento complejo de las conexiones de tubería. Tales componentes desechables son relativamente poco costosos de fabricar y por lo tanto, no crean un gasto sustancial debido a su desecho. En una

realización, el sistema desechable (denominado de manera intercambiable en el presente documento "conjunto o conjuntos desechables") comprende, consiste básicamente en o consiste en, la cámara de recolección 20, la cámara de procesamiento 30, la cámara de desperdicios 40, la cámara de salida 50, los conjuntos de filtro 36, la bolsa de la muestra 60 y los conductos asociados 12 o tubería. En realizaciones preferidas de los conjuntos desechables del sistema, la cámara de recolección 20 y la cámara de procesamiento 30 están conectadas por medio de conductos 12 que están alojados en un marco rígido. La red de sello giratorio (Figuras 7 y 8) de una cámara de procesamiento también se puede alojar en el mismo marco rígido. En otra realización preferida, las diversas cámaras y recipientes del conjunto desechable comprenden las interfaces necesarias que son capaces de comunicar con el dispositivo de procesamiento del sistema de forma que las bombas, válvulas, sensores y otros dispositivos que automatizan el sistema se activen o desactiven apropiadamente según sea necesario sin la intervención del usuario. Las interfaces también reducen el tiempo y la experiencia necesarios para configurar el sistema y también reducen errores indicando cómo configurar apropiadamente el sistema y alertar al usuario en el caso de una configuración errónea.

La mayoría de los conjuntos desechables de la invención tendrán muchos elementos comunes. Sin embargo, el experto en la materia reconocerá que aplicaciones diferentes del sistema pueden necesitar componentes adicionales que pueden ser parte de los conjuntos desechables. Por consiguiente, los conjuntos desechables pueden comprender además una o más agujas o jeringas adecuadas para obtener tejido adiposo u otro tejido a partir del paciente y devolver las células regenerativas al paciente. El tipo, número y variedad de las agujas y jeringas incluidas dependerá del tipo y cantidad del tejido que se esté procesando. Los conjuntos desechables pueden comprender además uno o más recipientes rígidos o flexibles para contener fluidos de lavado y otros reactivos de procesamiento usados en el sistema. Por ejemplo, los conjuntos desechables pueden comprender recipientes para contener solución salina, enzimas y cualquier otro tratamiento o fluidos de reemplazo necesarios para el procedimiento. Adicionalmente, se pueden proporcionar soluciones de lavado adecuadas, fluidos de resuspensión, aditivos, agentes o materiales de trasplante con los conjuntos desechables para su uso junto con los sistemas y procedimientos de la invención.

Cualquier combinación de componentes de sistema, equipo, o suministros descritos en el presente documento o necesarios de otra manera para practicar la invención se pueden proporcionar en la forma de un kit. Por ejemplo, un kit de la invención puede incluir, por ejemplo, la aguja de longitud y calibre óptimo para la liposucción basada en jeringa y jeringas estériles que contienen el medio de filtro preferido que permiten el procesamiento de pequeños volúmenes de tejido. Otro equipo y suministros ilustrativos que se pueden usar con la invención y que se pueden incluir con los kits de la invención se enumeran en las Tablas II y III.

La Tabla II más adelante identifica ejemplos de suministro que se pueden usar para obtener células regenerativas obtenidas 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
Envase de Sangre Individual (600ml)	Baxter Fenwal	1	Bolsa de procesamiento de células principal; la bolsa tiene un adaptador de espiga en línea y dos orificios de espiga libres
Envase de transferencia con acoplador (150ml)	Baxter Fenwal	1	Conjunto de bolsa quad
Envase de transferencia con acoplador (1l)	Baxter Fenwal	1	Bolsa de desperdicios
Acoplador de sitio de muestra	Baxter Fenwal	2	
Solución salina al 0,9% (para inyección)	Baxter Fenwal	1	
Aguja afilada 14GA	Monoject	Según se requiera	Para añadir tejido de liposucción a la bolsa
Aguja afilada 20GA	Monoject	3	Para añadir collagenasa y eliminar células PLA
Filtro Sterflip de 0,2 µm	Millipore	1	Para filtrar collagenasa
Clips de sellado de Aluminio Teruflex	Terumo	4	ME*ACS121 para sellado de tubo temporal
Almohadilla prep de yoduro de povidona	Triadine	Según se requiera	10-3201
Collagenasa Liberasa H1	Roche		Véase la Nota del Procedimiento
ObleasTSCD	Terumo	2	1SC*W017 para uso con Soldador de Tubería Estéril TSCD

La tabla III, dada más adelante, identifica equipo que se puede usar con los sistemas y procedimientos descritos en el presente documento.

Tabla III

Descripción	Proveedor	Cantidad	Nota
Centrífuga Sorvall Legend T Easy Set	Fisher Scientific	1	75-004-367
Rotor	Kendro/Sorvall	1	rotor TTH-750
Cubos de rotor	Kenro/Sorvall	4	Cubos redondos 75006441
Adaptador para bolsas de 150 ml	Kendro/Sorvall	4	00511
Separador de Plasma	Baxter Fenwal	1	4R4414
Sellador de Tubo	Sebra	1	Modelo 1060
Soldador de Tubería Estéril TSCD	Terumo	1	3ME*SC201AD
Oscilador Térmico LabLine	LabLine	1	4637
Abrazadera de estilo hemostático plástica "Desechable"	Davron	3	
Conjuntos de Bolsas de Equilibrio		2	Bolsas llenas de agua para balancear la centrífuga
Cámara Biohazard Sharps		1	
Cámara Biohazard Waste		1	

5 El componente reutilizable del sistema comprende, consiste básicamente en o consiste en el mecanismo de agitación para la cámara de recolección, la bomba y la variedad de sensores que activan válvulas y controles de bomba, el motor de centrífuga, el marco giratorio del motor de centrífuga, la pantalla de interfaz de usuario y puertos USB, un dispositivo de enclavamiento o de acoplamiento o configuración para conectar el conjunto desechable de forma que el conjunto desechable se una de forma segura a y forme una interfaz con el componente de hardware reutilizable y otros dispositivos asociados. Un componente reutilizable ilustrativo se ilustra en la Figura 14. En 10 realizaciones preferidas, el componente reutilizable incluye un medio para separar y concentrar las células regenerativas a partir de la composición de células regenerativas, por ejemplo, una centrífuga giratoria. En la presente realización, el componente reutilizable se diseña, conecta a y forma interfaz con una parte de la cámara de procesamiento (que comprende una cámara centrífuga) del conjunto desechable como se muestra en la Figura 15A. 15 Se entiende que los medios para separar y concentrar células regenerativas en el componente reutilizable no se limitan a una centrífuga giratoria sino que también pueden incluir cualquier otra configuración descrita en el presente documento, incluyendo un filtro de membrana de giro. El componente reutilizable también puede alojar el dispositivo de procesamiento descrito en el presente documento que contiene software preprogramado para realizar diferentes procedimientos de procesamiento de tejido y activar selectivamente las diversas bombas y válvulas del sistema en consecuencia. El procesador también puede incluir capacidad de almacenamiento de datos para almacenar 20 información del donante/paciente, información de procesamiento o recolección y otros datos para su descarga o recopilación posterior. El componente reutilizable se puede usar con una diversidad de conjuntos desechables. El conjunto desechable se conecta al componente reutilizable a través, por ejemplo, de un dispositivo de enclavamiento o configuración para conectar el conjunto desechable de forma que el conjunto desechable se una de forma segura a y forme interfaz con el componente de hardware reutilizable de una manera que el dispositivo de procesamiento 25 presente en el componente reutilizable pueda controlar, es decir, enviar y recibir señales hacia y desde los diversos componentes del conjunto desechable así como diversos componentes del conjunto desechable y otros dispositivos y sistemas asociados.

30 En un ejemplo, un conjunto desechable para su uso en el sistema comprende una cámara de recolección 20 que puede alojar 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 recolección 20; una cámara de salida 50 que puede alojar al menos 0,5 ml de células regenerativas y un recipiente de residuos 40 que puede alojar aproximadamente 10 l de residuos. En la presente realización, el dispositivo de hardware no es más grande que 60,96 cm L por 45,72 cm An X 91,44 cm Al. Se pueden construir 35 dimensiones alternativas de los diversos componentes de los conjuntos desechables así como el dispositivo de hardware según sea necesario y tienen por objeto estar incluidas 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 ensamblado junto con un componente reutilizable correspondiente se ilustra en la Figura 15A. El sistema preferentemente se diseña de forma que pueda detectar un componente desechable cargado de forma 40 inapropiada. Por ejemplo, los componentes de cada conjunto desechable pueden tener marcas guiadas por color

para alinear e insertar apropiadamente la tubería, las cámaras, etc. en lugares apropiados en el sistema. En ejemplos adicionales, el sistema utilizado en el presente documento es una unidad portátil. Por ejemplo, la unidad portátil puede ser capaz de moverse desde un emplazamiento en el que se ha producido la recolección de tejido adiposo, hasta otro emplazamiento para la recolección de tejido adiposo. En determinadas implementaciones, la unidad portátil es adecuada para recoger y procesar el tejido adiposo a pie de cama del paciente. Por tanto, una unidad portátil puede ser parte de un sistema que se puede mover de paciente a paciente. Por consiguiente, la unidad portátil puede tener ruedas que se bloquean en un sitio y, por tanto, se pueden colocar y usar fácilmente en un emplazamiento práctico en una posición estable y segura durante todo el procedimiento. En otras realizaciones, la unidad portátil se diseña para configuración y funcionamiento en una superficie plana tal como la superficie de una mesa. La unidad portátil también puede estar incluida en una unidad de carcasa. La unidad portátil además puede comprender 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, el dispositivo de procesamiento, la pantalla de visualización se pueden montar en la unidad portátil del sistema.

Un ejemplo manual del sistema útil para la invención se puede practicar de acuerdo con las siguientes etapas e información, que se proporcionan a modo de ejemplo y no a modo de limitación. En primer lugar, se recoge el tejido adiposo de un paciente. Una línea de recuperación de tejido o un acoplador de sitio de toma de muestra se abre y una espiga se inserta en un orificio lateral de la bolsa sanguínea de 600 ml. Aproximadamente 10 ml de tejido adiposo se recogen en una jeringa de 10 ml a través de la cánula roma. La cánula roma se reemplaza con una aguja relativamente afilada (14G). El sitio de toma de la muestra se limpia con un trapo de yodo. El tejido adiposo se inyecta en la bolsa de 600 ml a través del sitio de toma de la muestra. La jeringa y la aguja después se desechan en una cámara de objetos punzantes. Estas etapas se repiten para colocar tejido suficiente en la bolsa. El tejido suficiente se determina en una base de caso por caso en base a las especificaciones clínicas del paciente y la aplicación.

En segundo lugar, el tejido adiposo aspirado se lava. Una bolsa de solución salina calentada previamente (37 °C) se conecta por encima de la superficie de trabajo. Una pinza hemostática azul se coloca en la tubería entre la bolsa de 600 ml y la espiga. La pinza se cierra para sellar la tubería. La espiga en la bolsa de 600 ml se usa para entrar en la bolsa de solución salina (en esta composición se usa la aguja en la bolsa de 600 ml para entrar en la bolsa de solución salina a través del tabique de goma, limpiar 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 el volumen deseado de solución salina ha entrado en la bolsa de 600 ml. La bolsa de 600 ml se invierte 10-15 veces durante aproximadamente 15 segundos. Una segunda pinza azul se aplica a la tubería que conduce desde la bolsa de desperdicios de 3 l hasta la espiga. La espiga 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 repose durante aproximadamente 1 minuto. La pinza azul que conduce a la bolsa de 3 l se libera. Se permite que el fluido de desperdicio fluya en la bolsa de 3 l. La pinza azul se aplica para detener el flujo antes de que el tejido entre en la tubería. La bolsa de 600 ml se baja hasta la superficie de trabajo. Estas etapas se repiten dos o más veces. Si el desperdicio de solución salina aún se observa marcadamente rojo, se indica un tercer ciclo adicional. Se usa un sellador de calor para sellar la tubería entre la bolsa de desperdicios de 3 l y la bolsa de 600 ml. El sellado se realiza en un punto a aproximadamente medio camino de la tubería. La bolsa de desperdicios de 3 l se elimina y desecha. La bolsa de 600 ml se regresa a la superficie de trabajo.

En tercer lugar, el tejido adiposo lavado se digiere. La pinza azul en la tubería entre la solución salina y la bolsa de 600 ml se libera para permitir que aproximadamente 150 ml de solución salina entren en la bolsa de 600 ml. El sitio de toma de la muestra en la bolsa de 600 ml se limpia con un trapo de yodo. Se inyecta colagenasa a través del sitio de toma de la muestra en la bolsa de 600 ml. La colagenasa se prepara descongelando un vial de colagenasa en un baño de agua a 37 °C o equivalente, por un medio diferente a microondas. Una jeringa de 1 ml con una aguja de 22G se inserta en el vial. La colagenasa se retira en la aguja. La aguja se retira y se reemplaza con un filtro de 0,2 µm y una segunda aguja de 22G. Después la colagenasa se expulsa de la jeringa a través del filtro de 0,2 µm y la aguja. La digestión del tejido adiposo se realiza a una concentración de colagenasa final de 0,1-0,2 unidades Wünsch/ml. La almohadilla de calentamiento se coloca en el balancín. Durante este tiempo, la bolsa de solución salina, mientras continua unida, se coloca a un lado del balancín. Se tiene cuidado de asegurar que la tubería que conduce a la bolsa de solución salina se coloque en una manera tal que la misma no quede atrapada en el balancín durante el movimiento. El controlador de la almohadilla de calentamiento se ajusta a 37 °C. La bolsa de 600 ml se coloca en el balancín. El balancín se ajusta a un máximo. La bolsa se observa para asegurar que la misma sea estable y se permite que se balancee durante aproximadamente 1 hora (55 ± 10 min).

En cuarto lugar, la composición de células regenerativas se recupera. La bolsa se retira del balancín. Una pinza azul se aplica a la tubería cerrada que conducía anteriormente a la bolsa de desperdicios. El dispositivo de conexión estéril se usa para unir el conjunto de bolsa quad (preparado previamente de acuerdo con las siguientes instrucciones) a la tubería que estaba unida anteriormente a la bolsa de desperdicios. El envase quad se puede conservar como dos envases quad unidos. Identificar la tubería que se divide en dos envases, plegar la tubería de nuevo sobre sí misma y deslizar un anillo metálico sobre la tubería plegada (sobre ambas piezas de la tubería). Deslizar el anillo hacia abajo aproximadamente 1,27 centímetros. El engarce formado al plegamiento actúa para sellar la tubería. Usar un hemostato para engarzar parcialmente el anillo cerrado. El anillo no se prensa con

demasiada fuerza debido a que el anillo 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 la tubería que conduce al conjunto quad se libera para drenar la fracción de células (la capa por debajo de la capa de grasa amarilla/naranja) en el conjunto quad. Se tiene cuidado de evitar que la capa de grasa entre en la tubería. Durante este procedimiento, la tubería se puede prensar manualmente para ralentizar el flujo a medida que la capa de grasa se acerca a la tubería. La tubería que conduce al conjunto de bolsa quad después se cierra con una pinza azul, la bolsa de 600 ml se regresa a la superficie de trabajo y la bolsa de solución salina se cuelga. La pinza azul en la tubería entre la solución salina y la bolsa de 600 ml se libera para permitir que aproximadamente 150 ml de solución salina entren 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 después se cuelga invertida sobre la superficie de trabajo y se permite que se asiente durante aproximadamente 3-5 minutos. La pinza azul en la tubería que conduce al conjunto quad se libera y la fracción de células (la capa por debajo de la capa de grasa amarilla/naranja) se drena en el conjunto quad. Se tiene cuidado de evitar que la capa de grasa entre en la tubería. Por ejemplo, el flujo se puede ralentizar a medida que la capa de grasa se acerca a la tubería prensando la tubería manualmente. La tubería que conduce al conjunto de bolsa quad se cierra con una pinza azul. La tubería que conduce del conjunto quad a la bolsa de 600 ml después se sella por calor. La bolsa de 600 ml después se retira y se desecha.

En quinto lugar, la composición de células regenerativas se lava. Un clip metálico se coloca en la tubería entre las dos bolsas llenas para sellar la tubería. El conjunto quad se coloca en equilibrio. Se añade agua a un segundo conjunto quad "simulado" para equilibrar el conjunto quad. El conjunto y el conjunto quad equilibrado se colocan en cubos opuestos de la centrífuga. Para el filtro hueco, las células se lavan y se colocan en la bolsa y la tubería se sella 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 filtro y el concentrado de células se recoge en una bolsa en el extremo aguas abajo. Se tiene cuidado de asegurarse de que las bolsas del conjunto quad no están comprimidas y están verticales. La centrífuga se hace funcionar a 400 xg durante 10 minutos. El conjunto quad se retira de la centrífuga y se coloca en el separador de plasma. Se tiene cuidado de colocar las muestras en el separador en una manera tal que la tubería dura en la parte superior de la bolsa está justo en la parte superior de la placa posterior. Si la bolsa está muy elevada, se retendrá mucha solución salina, si está muy baja la tubería interferirá con la capacidad de la placa frontal para cerrar y de nuevo se retendrá mucha solución salina. Una pinza azul se aplica a cada una de las líneas que conduce desde el conjunto quad lleno hasta el vacío. Los anillos metálicos y las pinzas azules se retiran para permitir que el sobrenadante fluya en el conjunto quad vacío. Se vierte tanta solución salina como sea posible, pero se tiene cuidado de no desalojar el sedimento celular. La tubería que entra en cada una de las bolsas que contienen sobrenadante se sella por calor. Las bolsas de desperdicios que contienen el sobrenadante se retiran. Se aplican pinzas azules a la tubería que conduce a cada una de las bolsas de conjunto quad que contienen células. Las bolsas se extraen del separador de plasma. Se usa un dispositivo de conexión estéril para conectar la tubería que conduce al envase quad hasta la bolsa de solución salina. La pinza azul que conduce a una de las bolsas de conjunto quad se retira para permitir que aproximadamente 150 ml de solución salina fluyan en la bolsa y después la pinza se vuelve a aplicar para detener el flujo de solución salina. La bolsa de conjunto quad llena después se invierte aproximadamente 10-15 veces durante aproximadamente 15 segundos. La pinza azul que conduce a la bolsa de conjunto quad vacío después se retira y todo el contenido de la bolsa llena se drena en la bolsa vacía. La pinza de anillo metálico se vuelve a aplicar para sellar la tubería entre dos bolsas de conjunto quad. La tubería después se sella por calor y la bolsa de solución salina se retira. La bolsa de conjunto quad llena después se invierte aproximadamente 10-15 veces durante aproximadamente 15 segundos. Otro conjunto quad simulado se coloca en una balanza y se vuelve a balancear con el conjunto quad celular. Las bolsas de conjunto quad (una llena, una vacía) después se colocan en la centrífuga de forma que las bolsas de conjunto quad no se compriman y estén verticales.

La centrífuga se hace funcionar a aproximadamente 400 xg durante 10 minutos. El conjunto quad después se retira de la centrífuga y se coloca cuidadosamente en el separador de plasma de una manera tal que la tubería dura en la parte superior de la bolsa esté justo en la parte superior de la placa posterior. Si la bolsa está demasiado elevada se retendrá mucha solución salina, si está demasiado baja la tubería interferirá con la capacidad de la placa frontal de cierre y de nuevo se retendrá demasiada solución salina. El anillo metálico se retira para verter todo el sobrenadante desde la bolsa llena en la bolsa vacía teniendo cuidado de no desalojar el sedimento de células regenerativas. La tubería entre las bolsas se sella y la bolsa (de desperdicios) llena se retira y se desecha. Después un acoplador de sitio de toma de la muestra nuevo se inserta en la bolsa restante. Las células del sedimento celular después se resuspenden en la solución salina residual (si existe alguna) para obtener una concentración de células regenerativas. La resuspensión se puede realizar mediante manipulación suave de la bolsa (por ejemplo, apretando y frotando).

Un ejemplo particular del sistema se muestra en la Figura 4. La Figura 4 ilustra un sistema automatizado y un procedimiento para separar y concentrar células regenerativas a partir de tejido, por ejemplo, tejido adiposo, adecuado para reinfusión dentro de un paciente. En determinadas formas del sistema mostrado en la Figura 4, el sistema incluye además una etapa automatizada para aspirar una cantidad determinada de tejido del paciente. El sistema mostrado en la Figura 4 comprende el conjunto desechable mostrado en la Figura 13 que se conecta al componente reutilizable del sistema mostrado en la Figura 14 para llegar a un ejemplo automatizado del sistema mostrado en la Figura 15A. El conjunto desechable se conecta al componente reutilizable a través, por ejemplo, de

un dispositivo de enclavamiento o de acoplamiento o configuración, que conecta el conjunto desechable al componente reutilizable de forma que el conjunto desechable se una de forma segura a y se asocie con el componente de hardware reutilizable de una manera que el dispositivo de procesamiento presente en el componente reutilizable puede controlar y formar una interfaz con, es decir, enviar y recibir señales hacia 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 determinados parámetros usando la interfaz de usuario, por ejemplo, el volumen de tejido que se está recogiendo, unir el sistema al paciente y el sistema automáticamente realiza todas las etapas mostradas en la Figura 4 en una secuencia ininterrumpida usando parámetros pre-programados y/o introducidos por el usuario. Una secuencia de este tipo se ilustra en la Figura 15B. Como alternativa, el tejido se puede aspirar manualmente a partir del paciente mediante el usuario y transportarse al sistema para procesamiento, es decir, separación y concentración de células regenerativas.

Específicamente, como se muestra en la Figura 4, tejido, por ejemplo, tejido adiposo, se puede retirar del paciente usando conducto 12 e introducir en la cámara de recolección 20. Una ilustración detallada de la cámara de recolección de la Figura 4 se muestra en la Figura 5. Como se ilustra en la Figura 5, la cámara de recolección 20 puede comprender una línea de vacío 11 que facilita la retirada de tejido usando una cánula convencional. El usuario puede introducir el volumen estimado de tejido dirigido a la cámara de recolección 20 en este punto. El tejido se introduce en la cámara de recolección 20 a través de un orificio de entrada 21 que es parte de una ruta de fluido cerrada que permite que el tejido, la solución salina y otros agentes se añadan al tejido de una manera aséptica. Un sensor óptico del sistema, por ejemplo, sensor 29, puede detectar cuándo el volumen de tejido de aportación de usuario está presente la cámara de recolección 20. En determinadas realizaciones, si está presente menos tejido en la cámara de recolección que la aportación del usuario, el usuario tendrá la opción de comenzar el procesamiento del volumen de tejido que está presente la cámara de recolección 20. En determinadas realizaciones, una parte del tejido retirado del paciente se puede dirigir a la cámara de la muestra 60 a través del uso de una bomba, por ejemplo, una bomba peristáltica, a través de un conducto, que se puede activar a través de aportación de usuario utilizando la interfaz de usuario.

Un sensor 29 puede enviar señales al 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 preestablecido de agente de lavado en base al volumen de tejido recogido usando válvulas y bombas automatizadas. Este ciclo se puede repetir en la cámara de recolección hasta que el sensor óptico determina que el líquido efluente es suficientemente limpio y desprovisto de material indeseado. Por ejemplo, un sensor óptico 29 a lo largo del conducto que conduce hacia afuera de la cámara de recolección 12b o 12d puede detectar que los materiales indeseados se han retirado y puede enviar una señal al dispositivo de procesamiento para cerrar las válvulas necesarias e iniciar la etapa siguiente.

A continuación, el dispositivo de procesamiento puede introducir una cantidad pre-programada de agente de disgregación en base al volumen de tejido recogido. El dispositivo de procesamiento también puede activar la agitación del tejido en la cámara de recolección durante un periodo preestablecido de tiempo en base al volumen inicial de tejido recogido o en base a aportación de usuario. En el ejemplo mostrado en la Figura 4, una vez que se añade el agente de disgregación, por ejemplo, colagenasa, a la cámara de recolección 20 a través de la fuente de colagenasa 24, el motor de la cámara de recolección 20 se activa a través del dispositivo de procesamiento. El motor activa el eje giratorio 25 que comprende un agitador magnético y un dispositivo similar a paleta en el que una o más paletas 25a están unidas rigidamente a la jaula de filtro 27 de un filtro prefijado a la cámara de recolección 28. Las paletas agitan el en presencia del agente de disgregación de forma que las células regenerativas se separan del tejido.

La solución en la cámara de recolección 20 se permite que se asiente durante un periodo de tiempo preestablecido. La parte boyante de la solución se permite que se eleve hasta la parte superior de la solución. Una vez que ha transcurrido el periodo de tiempo preestablecido, las válvulas y bombas necesarias se activan mediante el dispositivo de procesamiento para retirar la parte no boyante a la cámara de desperdicios 40. La transferencia a la cámara de desperdicios 40 continúa hasta que un sensor 29 a lo largo del conducto que conduce hacia fuera de la cámara de recolección 12b o 12d puede detectar que la fracción boyante de la solución está a punto de transferirse a la cámara de desperdicios 30. Por ejemplo, un sensor 29 a lo largo del conducto que conduce hacia afuera de la cámara de recolección 12b o 12d puede detectar que los materiales indeseados se han retirado y puede enviar una señal al dispositivo de procesamiento para cerrar las válvulas necesarias.

En este momento, la fracción no boyante 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 y bombas peristálticas necesarias. En determinados ejemplos, antes de la transferencia de la composición de células regenerativas a la cámara de procesamiento 30, se puede añadir un volumen adicional de solución salina a la fracción boyante de solución restante en la cámara de recolección 20. Se puede repetir otro ciclo de lavado. Después de este ciclo, la solución se permite que se asiente y la fracción no boyante (que contiene las células regenerativas) se transporta a la cámara de procesamiento 30 y la fracción boyante se drena a la cámara de desperdicios 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 conductos 12, la composición se puede someter a una o más etapas de lavado adicionales antes del inicio de la fase de concentración. Esto asegura la eliminación de residuos y contaminantes residuales de la cámara de recolección

5 20. De forma similar, posteriormente a la etapa de concentración, la composición de células regenerativas se puede someter a una o más etapas de lavado adicionales para retirar contaminantes residuales. Los materiales indeseados se pueden retirar de la cámara de procesamiento 30 a la cámara de residuos 40 de la misma manera, es decir, control de válvulas y bombas a través de señales del dispositivo de procesamiento, como se ha descrito anteriormente.

10 Las diversas realizaciones de la cámara de procesamiento 30 mostradas en la Figura 4 se describen con más detalle a continuación. La cámara de procesamiento 30 mostrada en la Figura 4 está en forma de una cámara centrífuga. Una ilustración detallada de la cámara de procesamiento de la Figura 4 se muestra en las Figuras 7 y 8. Una cámara de procesamiento 30 de este tipo generalmente comprende una red de sello giratorio 30.1 que comprende una carcasa exterior 30.2, uno o más sellos 30.3, uno o más rodamientos 30.4 y un punto de unión 30.6 para conectar la

15 cámara de procesamiento al dispositivo centrífugo presente en el componente reutilizable del sistema; una o más vías de fluido 30.5 en forma de conductos que se extienden desde el sello giratorio y que terminan en una cámara centrífuga en cada extremo que está en forma de una cámara de salida 50 alojada en un marco 53 en el que el marco comprende uno o más orificios 52 y una o más manivelas para recolocar manualmente la cámara de salida 50.

20 La red de sello giratorio 30.1 se incluye para asegurar que las vías de fluido de la cámara de procesamiento se pueden mantener en una condición estéril. Adicionalmente, se puede acceder a las vías 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 centrífuga de la cámara de procesamiento está girando.

La red de sello giratorio 30.1 mostrada en la Figura 7 y 8 incluye un eje giratorio que comprende dos o más

25 rodamientos 30.4, tres o más sellos de labios 30.3 y una carcasa exterior 30.2. En la presente realización, los rodamientos 30.4 comprenden además un eje exterior e interior (no mostrado) denominado en el presente documento rodadura. Estas rodaduras se pueden separar mediante esferas de tierra de precisión. Las rodaduras y esferas que comprenden los rodamientos preferentemente se fabrican con material adecuado para contactar con fluido corporal o están revestidas con un material adecuado para contacto con fluido corporal. En un ejemplo

30 preferido, las rodaduras y esferas se fabrican usando, por ejemplo, nitruro de silicón o circonia. Adicionalmente, en la presente realización, los tres sellos de labio comprenden un canal circular en forma de "U" (no mostrados) así como un muelle circular (no mostrado). El canal circular en forma de "U" preferentemente se fabrica usando material flexible de forma que se forma una junta a prueba de fugas con el eje giratorio de la red de sello giratorio 30.1. Adicionalmente, los sellos de labio preferentemente se orientan de una manera de forma que la presión de la

35 composición de células regenerativas que fluye a través de la cámara de procesamiento provoca que el conjunto de sello refuerce su unión con el eje giratorio a modo de tensión aumentada. Los sellos se pueden asegurar en posición por medio de uno o más clips circulares (no mostrados) que son capaces de expandirse y/o colapsarse según sea necesario con el fin de engranar una ranura en la carcasa exterior 30.2 de la red de sello giratorio 30.1. El calor generado por o cerca de la red de sello giratorio 30.1 se tiene que controlar para evitar la lisis de las células en la

40 solución que se está moviendo a través del pasaje. Esto se puede conseguir, por ejemplo, seleccionando un material duro para construir el eje giratorio, puliendo el área del eje giratorio que se pone en contacto con los sellos minimizando el contacto entre el eje giratorio y el sello.

En otro ejemplo la red de sello giratorio 30.1 comprende un sello de goma único 30.3 y una junta de aire (no mostrada). Este sello y junta proporcionan un camino tortuoso para cualquier materia biológica que pudiera

45 comprometer la esterilidad del sistema. En otro ejemplo la red de sello giratorio 30.1 comprende múltiples sellos con carga de muelle 30.3 que aíslan los pasajes de fluido individuales. Los sellos 30.3 se fabrican de un material que se puede esterilizar así como sellar el eje giratorio sin lubricante. En otro ejemplo la red de sello giratorio 30.1 comprende un par de discos cerámicos (no mostrados) que crean las diferentes vías de fluido y pueden soportar la rotación del sistema y no provocar lisis celular. En otro ejemplo la vía de fluido es flexible y se permite que se enrolle y desenrolle respecto a la cámara de procesamiento. Esto se consigue haciendo que la vía de fluido flexible gire a

50 una revolución por cada dos revoluciones de la cámara de procesamiento 30. Esto elimina la necesidad de un sello giratorio completo.

La composición de células regenerativas se bombea desde la cámara de recolección 20 a lo largo de una vía de fluido a través del eje giratorio de la red de sello giratorio 30.1 y después se divide en un mínimo de dos vías de

55 fluido 30.5 cada una de las cuales irradian hacia fuera del eje central de la cámara de procesamiento 30 y terminan cerca de los extremos exteriores de la cámara de procesamiento 30, es decir, dentro de las cámaras centrífugas que alojan las cámaras de salida 50 (Figura 7 y 8). Por consiguiente, en un ejemplo preferido, la cámara de procesamiento 30 comprende dos o más cámaras de salida 50 como se muestra en las Figuras 7 y 8. Estas cámaras de salida 50 se colocan de forma que las mismas estén en una orientación durante el procesamiento 30.7 y

60 otra orientación para la recuperación de células regenerativas concentradas 30.8. Por ejemplo, los cambios de salida se inclinan en un ángulo durante el procesamiento y en 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 se pueden manipular manualmente a través de una manivela 53 que protruye hacia fuera de la cámara de procesamiento 30. Las células regenerativas se pueden recuperar manualmente a partir de las cámaras de salida 50 cuando las mismas están en orientación de recuperación 30.8 usando una jeringa. En otro ejemplo, la vía de fluido 30.5 se construye de forma que la misma se divide fuera de la cámara de procesamiento y después se conecta a los extremos exteriores de la cámara de procesamiento 30, es decir, dentro de las cámaras centrífugas que alojan las cámaras de salida 50 (no mostrado). En este ejemplo, se pueden transportar grandes volúmenes de composición de células regenerativas y/o aditivos, soluciones etc. a la cámara centrífuga y/o a las cámaras de salida directamente.

Con referencia a las Figuras 4 y 7-9, entre la cámara de recolección 20 y la cámara de procesamiento 30, se puede proporcionar una bomba 34 y una o más válvulas 14. En un ejemplo preferido, las válvulas 14 son válvulas electromecánicas. Adicionalmente, se pueden proporcionar sensores, tales como sensor de presión 29 en línea con la cámara de procesamiento 30 y la cámara de recolección 20. Las válvulas, bombas y sensores actúan en concierto 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 centrífugas y activan el dispositivo centrífugo a través de comunicación con el dispositivo de procesamiento del sistema. La composición de células regenerativas después se somete a una carga pre-programada durante un tiempo pre-programado en base a la cantidad de tejido recogido originalmente y/o aportado por el usuario. En determinadas situaciones, esta etapa se puede repetir automáticamente o a través de aportación de usuario. Por ejemplo, la composición se somete a una carga de aproximadamente 400 veces la fuerza de gravedad durante un periodo de aproximadamente 5 minutos. La cámara de salida 50 se construye de forma que los extremos exteriores de la cámara forman un pequeño depósito para las partículas densas y células. La cámara de salida 50 conserva las partículas densas en lo que se denomina un 'sedimento celular', a la vez que permite que el sobrenadante más ligero se elimine a través de una vía de fluido, por ejemplo, una vía de fluido que está a lo largo del eje giratorio de la red de sello giratorio 30.1 y viaja desde el punto bajo en el centro de la cámara de procesamiento 30 a través de la red de sello giratorio 30.1 hasta el recipiente de desperdicios 40. Las válvulas 14 y bombas 34 envían una señal al dispositivo de procesamiento para activar las etapas para retirar el sobrenadante al recipiente de desperdicios 40 sin alterar el sedimento celular presente en la cámara de salida 50.

El sedimento celular que se obtiene usando el sistema mostrado en la Figura 4 comprende las células regenerativas concentradas de la invención. En algunas realizaciones, después de que el sobrenadante se retira y se dirige a la cámara de desperdicios 40, se puede usar una vía de fluido 30.5 para re-suspender el sedimento celular que se forma después de la centrifugación con soluciones adicionales y/u otros aditivos. La re-suspensión del sedimento celular de esta manera permite el lavado adicional de las células regenerativas para retirar proteínas indeseadas y compuestos químicos así como aumentar el flujo de oxígeno a las células. La suspensión resultante se puede someter a otra carga de aproximadamente 400 veces la fuerza de gravedad durante otro periodo de aproximadamente 5 minutos. Después de que se ha formado un segundo sedimento celular y el sobrenadante resultante se retira a la cámara de desperdicios 40, se puede realizar un lavado final en la manera descrita anteriormente con solución salina o alguna otra solución tampón apropiada. Este lavado repetido se puede realizar múltiples veces para potenciar la pureza de la solución de células regenerativas. En determinadas realizaciones, la solución salina se puede añadir en cualquier etapa según se considere necesario para potenciar el procesamiento. Las concentraciones de células regenerativas obtenidas usando el sistema mostrado en la Figura 4 pueden variar dependiendo de la cantidad de tejido recogido, la edad del paciente, el perfil del paciente etc. Los rendimientos ilustrativos se proporcionan en la tabla 1.

El sedimento final presente en la cámara de salida 50 después se puede recuperar de una manera aséptica usando una jeringa apropiada después de que la cámara de salida 50 se coloca en la orientación apropiada para la retirada de células. En otras realizaciones, el sedimento final se puede mover automáticamente hasta un recipiente en la cámara de salida 50 que se puede retirar y almacenar o usarse según sea necesario. Este recipiente puede estar en cualquier forma o tamaño apropiado. Por ejemplo, el recipiente puede ser una jeringa. En determinadas realizaciones, el propio recipiente de salida 50 se puede sellar por calor (automáticamente o manualmente) y aislarse de los otros componentes de la cámara de procesamiento para recuperación posterior y uso de las células regenerativas según se ha descrito en el presente documento. Las células también se pueden someter a procesamiento adicional como se ha descrito en el presente documento antes de la recuperación a partir de la cámara de salida o después de la transferencia a un segundo sistema o dispositivo. El componente re-utilizable mostrado en la Figura 14 se construye de forma que se puedan conectar uno o más sistemas o dispositivos adicionales para procesamiento adicional según sea necesario.

Como se ha descrito en el presente documento, la población concentrada de células regenerativas obtenidas de tejido adiposo obtenida usando los sistemas se usan en la preparación de un medicamento para promover la epitelización y formación de neodermis en un sitio de herida, en el que dicha población concentrada de células se tiene que administrar a un paciente que necesita la misma sin cultivar las células antes de administrarlas al paciente. Por ejemplo, las células regenerativas tienen la capacidad de expresar factores de crecimiento angiogénicos y citoquinas, secretar citoquinas relacionadas con la cicatrización de heridas, secretar colágeno *in vitro* y promover la cicatrización de heridas *in vivo*. Por consiguiente, las células regenerativas se obtienen a partir del tejido adiposo de

un donante usando los sistemas y procedimientos útiles para la presente invención y se usan en la preparación de medicamento para promover la epitelización y formación de neodermis en un sitio de herida a través de uno o más de los mecanismos demostrados en el presente documento. En una realización preferida las células se obtienen a partir de tejido adiposo de la persona en el que las mismas se tienen que implantar, reduciendo de este modo las complicaciones potenciales asociadas con respuestas antigénicas y/o inmunogénicas al trasplante. Los pacientes típicamente se evalúan para determinar un trastorno de cicatrización de heridas mediante, por ejemplo, examen físico y la historia del paciente.

El procedimiento de recolección se realiza antes de que el paciente reciba cualquier producto diseñado para reducir la coagulación sanguínea. Sin embargo, algunas veces, el paciente puede haber recibido aspirina antes del procedimiento de recolección. Adicionalmente, la recolección de tejido adiposo con frecuencia se realiza antes de intentar cualquier procedimiento. Sin embargo, como comprenderán los expertos en la materia, el tiempo de la recolección se espera que varíe y dependerá de varios factores incluyendo, entre otras cosas, la estabilidad del paciente, el perfil de coagulación del paciente, la disponibilidad del proveedor y los estándares de atención de calidad. En última instancia, el tiempo de recolección se determinará por el facultativo responsable de la gestión de atención al paciente afectado.

El volumen de tejido adiposo recogido a partir del paciente puede variar de aproximadamente 0 cc hasta aproximadamente 2000 cc y en algunas realizaciones hasta aproximadamente 3000 cc. El volumen de grasa retirado variará de paciente en paciente y dependerá de varios factores incluyendo pero sin limitación: edad, hábito corporal, perfil de coagulación, estabilidad hemodinámica, gravedad de la enfermedad, co-morbididades y preferencia del médico.

La población concentrada de células regenerativas obtenidas de tejido adiposo que comprende células madre puede ser para la administración a un paciente en cualquier entorno en el que se produce una cicatrización de herida anormal. Como se describe en el presente documento, las células pueden ser para administración al paciente o aplicarse directamente al tejido dañado o en proximidad del tejido dañado, sin procesamiento adicional o procedimientos adicionales siguientes para purificar, modificar, estimular adicionalmente o cambiar de otra manera las células. El medicamento que comprende una población concentrada de células regenerativas obtenidas de tejido adiposo que comprende células madre obtenido a partir de un paciente es para administrarse a un paciente que necesita las mismas sin cultivar las células antes de administrarlas al paciente. En un ejemplo, el tejido adiposo se obtiene a pie de cama de un paciente. Se puede usar la supervisión hemodinámica para supervisar el estado clínico del paciente.

De acuerdo con la invención, las células regenerativas se pueden usar para preparación de un medicamento para promover la epitelización y formación de neodermis en un sitio de herida para administrarla al paciente poco después de recoger el tejido adiposo del paciente. Por ejemplo, las células pueden ser para administración inmediatamente después del procesamiento del tejido adiposo para obtener una composición de células regenerativas. En una realización puede variar si las células que se han de infundir nuevamente al paciente se someten a modificación, purificación, estimulación u otra manipulación adicional, como se describe en el presente documento. Adicionalmente, las células regenerativas pueden ser para administración en múltiples momentos. Por ejemplo, el medicamento puede ser para administración continua a lo largo de un periodo de tiempo extendido (por ejemplo horas) o puede ser para la administración en múltiples inyecciones de bolo extendidas a lo largo de un periodo de tiempo. En determinadas realizaciones, una administración inicial de células será la administración dentro de 12 horas después, tal como 6 horas y una o más dosis de células se administrarán en intervalos de 12 horas.

El número de células administradas a un paciente puede estar relacionado con, por ejemplo, el rendimiento de células después de procesamiento de tejido adiposo. Una parte de la cantidad total de células se puede conservar para uso posterior o criopreservar. Adicionalmente, la dosis suministrada dependerá de la vía de administración de las células al paciente.

El medicamento que comprende las células regenerativas también puede ser para aplicación con aditivos para potenciar, controlar o dirigir de otra manera el efecto terapéutico pretendido. Por ejemplo, en una realización, como se ha descrito en el presente documento, las células se pueden purificar adicionalmente mediante el uso de selección celular positiva y/o negativa mediada por anticuerpo para enriquecer la población celular para aumentar la eficacia, reducir la morbilidad o facilitar la facilidad del procedimiento. De forma similar, el medicamento que comprende las células puede ser para aplicación con una matriz biocompatible que facilita la ingeniería de tejido *in vivo* soportando y/o dirigiendo el destino de las células implantadas. De la misma manera, el medicamento puede ser para la administración a continuación de manipulación genética de forma que las mismas expresen productos génicos que se cree o que tienen por objeto promover la respuesta o respuestas terapéuticas proporcionadas por las células. Los ejemplos de manipulación incluyen manipulaciones para controlar (aumentar o disminuir) la expresión de factores que promueven la angiogénesis o vasculogénesis (por ejemplo VEGF).

En un ejemplo, se prefiere la administración directa de células al sitio de beneficio pretendido. Esto se puede conseguir mediante inyección intravenosa. Las vías de administración conocidas por un experto en la materia, incluyen pero sin limitación, vía subcutánea, dérmica o intramuscular y pueden o no incluir un mecanismo de administración basado en catéter. El medicamento de la invención puede ser para inyección de un bolo único, a

través de una infusión lenta o a través de una serie escalonada de aplicaciones separadas por varias horas o, siempre y cuando las células se almacenen apropiadamente, varios días o semanas. En una realización, la vía de administración incluirá administración intravenosa a través de un catéter intravenoso periférico convencional o un catéter venoso central. El flujo de células se puede controlar mediante inflación/deflación en serie de globos distales y proximales localizados dentro de la vasculatura del paciente, creando de este modo zonas de no flujo temporales que promueven el injerto celular o la acción terapéutica celular. En otro ejemplo, las células se pueden resuspender en un medio artificial o natural o matriz de tejido antes de administrarse al paciente. La terapia sistémica implicaría inyección en el sistema vascular.

Partes del lipoaspirado procesado se pueden almacenar antes de administrarse a un paciente. Para almacenamiento a corto plazo (menos de 6 horas) las células se pueden almacenar a o por debajo de temperatura ambiente en un recipiente sellado con o sin complementación con una solución nutritiva. El almacenamiento a mediano plazo (menos de 48 horas) preferentemente se realiza a 2-8 °C en una solución isosmótica tamponada (por ejemplo Plasmalyte®) en un recipiente compuesto de o revestido con un material que evita la adhesión celular. El almacenamiento a largo plazo preferentemente se realiza mediante criopreservación apropiada y almacenamiento de células en condiciones que promueven la retención de función celular, tales como las divulgadas en la solicitud PCT del mismo solicitante y transferida legalmente número PCT/US02/29207 presentada el 13 de Septiembre de 2002 y la solicitud Provisional de los Estados Unidos N° 60/322.070, presentada el 14 de Septiembre de 2001.

De acuerdo con un aspecto de la invención, el medicamento para promover la epitelización y formación de neodermis en un sitio de herida que comprende una población concentrada de células regenerativas obtenidas de tejido adiposo que comprende células madre, las células obtenidas de tejido adiposo que se administran a un paciente pueden actuar como vehículos de suministro del factor de crecimiento. Por ejemplo, sometiendo las células a ingeniería genética para expresar uno o más factores del crecimiento adecuados para promover la cicatrización de heridas, las células se pueden administrar a un paciente y someter a ingeniería genética para liberar uno o más de los factores de crecimiento. La liberación se puede proporcionar en una manera controlada durante periodos de tiempos extendidos. Por ejemplo, la liberación se puede controlar de forma que el factor o factores de crecimiento se liberen de una manera pulsátil o periódica de forma que existan elevaciones locales en factor de crecimiento y/o recesiones locales en la cantidad del factor de crecimiento en proximidad a un área lesionada de tejido.

El medicamento no sólo ayuda a restablecer la función de tejidos dañados o de otra manera enfermos, sino también facilita la remodelación de los tejidos dañados. El medicamento puede ser para administración al paciente en los siguientes emplazamientos: clínica, oficina clínica, departamento de urgencias, salas de hospitalización, unidad de cuidados intensivos, quirófanos, salas de cateterización y salas radiológicas. Los pacientes típicamente se supervisan antes de y durante la administración de las células. Los procedimientos de supervisión incluyen, y no se limitan a: estudios de coagulación, supervisión de saturación de oxígeno y hemodinámica. Después del suministro del medicamento, los pacientes pueden necesitar un periodo de aproximadamente 24 horas de supervisión para determinar acontecimientos adversos.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar situaciones particulares y entornos en los que esta tecnología se puede aplicar y no tienen por objeto limitar el alcance de la invención y las reivindicaciones incluidas en la presente divulgación.

Ejemplos

Las ADC o células regenerativas usadas a través de los ejemplos expuestos más adelante se pueden obtener mediante el procedimiento o procedimientos descritos en la presente divulgación y/o el procedimiento o los procedimientos descritos en la Solicitud de los Estados Unidos N° de Serie 10/316.127, titulada SYSTEMS AND METHODS FOR TREATING PATIENTS WITH PROCESSED LIPOASPIRATE CELLS, presentada el 9 de Diciembre de 2002, que reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos N° 60/338.856, presentada el 7 de Diciembre de 2001, así como los procedimientos descritos en la Solicitud de los Estados Unidos N° _____ titulada SYSTEMS AND METHODS FOR SEPARATING AND CONCENTRATING REGENERATIVE CELLS FROM TISSUE, presentada el 25 de Junio de 2004, que reivindica la prioridad de la Solicitud de los Estados Unidos con N° de Serie 10/316.127, titulada SYSTEMS AND METHODS FOR TREATING PATIENTS WITH PROCESSED LIPOASPIRATE CELLS, presentada el 9 de Diciembre de 2002.

EJEMPLO 1: Expresión de Factor del Crecimiento Angiogénico, VEGF, mediante Células Regenerativas

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 Placentario, otro miembro de la familia de VEGF, juega un papel similar tanto en la angiogénesis como en la arteriogénesis. Específicamente, el trasplante de células de tipo silvestre (PIGF +/-) en un ratón knockout de PIGF restablece la capacidad de inducir recuperación rápida de isquemia del miembro posterior (Scholz y col., 2003).

Dada la importancia de la angiogénesis y arteriogénesis en el procedimiento de revascularización, la expresión de PIGF y VEGF mediante las células regenerativas de la presente invención se examinó usando un ensayo de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) usando células regenerativas obtenidas de tejido adiposo de tres donantes. Un

donante tenía una historia de hiperglucemia y diabetes de Tipo 2 (una afección altamente asociada con enfermedad microvascular y macrovascular). Las células regenerativas de cada donante se sembraron a 1000 células/cm² en medio DMEM/F-12 complementado con FCS al 10% y HS al 5% y se cultivaron hasta confluencia. Se tomaron muestras de sobrenadante y se ensayaron para determinar la expresión de proteína de PIGF y VEGF. Como se muestra en las Figuras 16A y 16B, los resultados demuestran una expresión marcada tanto de VEGF (Figura 16A) como de PIGF (Figura 16B) mediante las células regenerativas obtenidas de tejido adiposo de la invención.

En un estudio separado, se midió la cantidad relativa de citoquinas relacionadas angiogénicas secretadas por células regenerativas cultivadas a partir de ratones adultos normales. Las células regenerativas se cultivaron en alfa-MEM con FBS al 10% hasta cinco días más allá de la confluencia celular, momento en el cual el medio de cultivo celular se recogió y se evaluó mediante un análisis de matriz de anticuerpos (RayBio® Mouse Cytokine Antibody Array II (RayBiotech, Inc.). Se detectaron los siguientes factores de crecimiento relacionados con la 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 de crecimiento relacionados con angiogénesis o citoquinas estaban elevados al menos dos veces en comparación con 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 serie amplia de factores de crecimiento angiogénicos y arteriogénicos. Además, el hallazgo de que un paciente diabético expresaba VEGF y P1GFa niveles equivalentes a los de pacientes normales sugiere que los pacientes diabéticos pueden ser candidatos a la terapia angiogénica mediante células regenerativas obtenidas de tejido adiposo autólogo.

EJEMPLO 2: Las Células Regenerativas Contienen Poblaciones Celulares que Participan en Angiogénesis

Las células endoteliales y sus precursores, células progenitoras endoteliales (CPE) se conoce que participan en la angiogénesis. Para determinar si las CPE están presentes en células regenerativas obtenidas de tejido adiposo, se evaluaron células regenerativas obtenidas de tejido adiposo humano para los marcadores de superficie de células CPE, por ejemplo, CD-34.

Las ADC se aislaron mediante digestión enzimática de tejido adiposo subcutáneo humano. ADC (100 μ l) se incubaron en tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene suero fetal bovino al 0,2% (FBS) y se incubaron durante 20 ó 30 minutos a 4°C con anticuerpos marcados fluorescentemente dirigidos hacia los marcadores endoteliales humanos CD-31 (marcador celular endotelial diferenciado) y CD-34 (marcador de CPE), así como ABCG2 humano (transportador de casete de unión a ATP), que se expresa selectivamente en células multipotenciales. Después del lavado, las células se analizaron en un FACSria Sorter (Beckton Dickinson - Immunocytometry). La adquisición de datos y los análisis después se realizaron mediante software FACSDiva (BD-Immunocytometry, CA). Los resultados (no mostrados) demostraron que las células regenerativas obtenidas de tejido adiposo a partir de un adulto sano expresaban el marcador de CPE CD-34 y ABCG2, pero no el marcador de células endoteliales CD-31. Las células que expresan el marcador CPE CD-34 y ABCG2 se detectaron a frecuencias similares en células regenerativas obtenidas a partir de un donante con una historia de diabetes.

Para determinar la frecuencia de CPE en células regenerativas obtenidas de tejido adiposo humano después de su cultivo en medio de diferenciación de células endoteliales, las células regenerativas se sembraron en placas revestidas con fibronectina y se cultivaron en medio de células endoteliales durante tres días para eliminar las células endoteliales maduras. Las células no adherentes se eliminaron y se volvieron a sembrar. Después de 14 días, las colonias se identificaron mediante tinción con Ulex europaeus Agglutinin-1 conjugado con FITC (Vector Labs, Burlingame, CA) y LDL acetilado marcado con Dil (Molecular Probes, Eugene, OR). Como se muestra en la Figura 17, los resultados indican una frecuencia de CPE de aproximadamente 500 CPE/10⁶ células ADC.

La presencia de CPE dentro de las células regenerativas obtenidas de tejido adiposo indica que estas células pueden participar directamente en el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos y potenciar la angiogénesis y la perfusión.

EJEMPLO 3: Desarrollo *In Vitro* de Estructuras Vasculares en Células Regenerativas

Un ensayo reconocido en la técnica para angiogénesis es uno en el que las células endoteliales cultivadas en una capa alimentadora de fibroblastos desarrolla una red compleja de tubos positivos a CD-31 reminiscentes de una red capilar naciente (Donovan y col., 2001). Debido a que las células regenerativas obtenidas de tejido adiposo contienen células endoteliales, CPE y otros precursores de células estromales, se ensayó la capacidad de estas células regenerativas de formar estructuras similares a capilares *en la ausencia de una capa alimentadora*. Las células regenerativas obtenidas a partir de almohadillas de grasa inguinales de ratones normales desarrollaron redes capilares dos semanas después del cultivo (Figura 18A). En particular, células regenerativas de ratones hiperglicémicos con diabetes de tipo 1 inducida por estreptozotocina (STZ) ocho semanas a continuación de la administración de STZ formaron redes capilares equivalentes a aquellas formadas por células de ratones normales (Figura 18B).

En un estudio posterior, células regenerativas obtenidas de tejido adiposo se cultivaron 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. Adicionalmente, las estructuras vasculares formadas tiñeron positivo para los marcadores de células endoteliales CD-31, CD-34, VE-caderina y factor de von Willebrand/factor VIII, pero no para el marcador panlinfocítico, CD-45.

- 5 Para comparar la capacidad de células regenerativas a partir de ratones jóvenes frente a ratones de edad avanzada de formar redes capilares, células regenerativas de ratones normales jóvenes y de edad avanzada (de 1, 12 ó 18 meses de edad) se cultivaron durante 2 semanas en medio de cultivo completo ((α -MEM complementado con FCS al 10%) y sin factores de crecimiento adicionales. Se observaron redes similares a capilares equivalentes en los cultivos de células regenerativas de todos los donantes (no mostrado).
- 10 Los datos anteriores demuestran que las células regenerativas obtenidas de tejido adiposo de pacientes normales y diabéticos, así como también jóvenes y de edad avanzada pueden formar estructuras vasculares en consonancia con la formación de redes capilares nacientes.

EJEMPLO 4: Desarrollo *In Vivo* de Estructuras Vasculares en Células Regenerativas

- 15 El potencial angiogénico *in vitro*, aunque prometedor, tiene poco valor si las células no ejercen actividad angiogénica *in vivo*. La inducción quirúrgica de isquemia de miembros posteriores es un modelo *in vivo* capaz de identificar el potencial angiogénico de una terapia dada. Este modelo se desarrolló en ratones inmunodeficientes (NOD-SCID) en los que la capacidad de células humanas de activar la reperfusión se pudo observar.

Los valores de flujo sanguíneo pre-operatorios se determinaron para ambas extremidades posteriores como se ha descrito más adelante. La vasculatura de los ratones anestesiados se ató con una ligadura de seda 4-0 en los siguientes sitios: 1) arteria ilíaca proximal a su bifurcación, 2) inmediatamente distal al origen de la arteria femoral profunda, 3) inmediatamente proximal a la ramificación de la arteria femoral superficial. Después de la ligadura la vasculatura se retiró *en bloc*. Antes del cierre de la herida, también se ligaron las ramificaciones colaterales observables a simple vista de las arterias femorales ligadas. Veinticuatro horas más tarde, ratones 129S se inyectaron con 5×10^6 células regenerativas obtenidas de tejido adiposo de ratón singénico y ratones SCID NOD se inyectaron con células regenerativas obtenidas de tejido adiposo humano a través de las venas de la cola. El flujo se sometió a formación de imágenes inmediatamente después de la cirugía y en intervalos a continuación de tratamiento usando un Laser Doppler Flow Imager (Moor Instruments Inc., Wilmington, DE). Las mediciones, tomadas tres veces por semana durante 24 días, se normalizaron al valor pre-operatorio para ese miembro y se presentaron con relación al miembro de control (no operado).

- 30 El modelo de isquemia de miembro posterior es extremadamente sensible a la cepa de ratón usada. Los ratones SCID NOD son animales inmunodeficientes, que carecen de la capacidad de iniciar una respuesta inflamatoria aguda. Para estos ratones, este enfoque quirúrgico genera isquemia grave de forma que dos tercios de animales no tratados perdieron estructuras de miembros posteriores por debajo del sitio de la escisión femoral. Ninguno de los animales tratados con células perdió ninguna estructura por encima de los dedos. Sin embargo, para ratones 129S inmunocompetentes, ninguno de los animales no tratados perdió ninguna estructura por encima de las falanges y presentaron una capacidad endógena de regenerar parcialmente la reperfusión. Esto podría deberse a la angiogénesis intrínseca asociada con una respuesta inflamatoria aguda. Esto puede explicar por qué la reperfusión fue menos extrema cuando se compararon los animales tratados frente a los de control de cepas diferentes.

Sin embargo, los resultados mostraron que los ratones tratados con células regenerativas obtenidas de tejido adiposo mostraron perfusión significativamente mejorada en comparación con ratones no tratados de ambas cepas. Para el día 12, el flujo sanguíneo se restableció hasta $50 \pm 11\%$ en ratones NOD-SCID tratados con células regenerativas humanas, en comparación con $10 \pm 10\%$ en ratones no tratados ($p < 0,05$). De forma similar, ratones 129S inmunocompetentes mostraron $80 \pm 12\%$ de restablecimiento del flujo el día 14, en comparación con $56 \pm 4\%$ en ratones no tratados. Adicionalmente, la disección macroscópica de ratones reveló la aparición de vasos colaterales en los miembros posteriores de ratones tratados con células regenerativas, pero no en aquellos de ratones no tratados o en las extremidades sanas de ningún ratón.

EJEMPLO 5: El Aumento de la Dosis de ADC Está Asociado con Supervivencia de Injerto Mejorada y Angiogénesis

- 50 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 suministro vascular y, como un resultado, la supervivencia del injerto depende de la neovascularización (Coleman, 1995; Eppley y col., 1990). Por tanto, de una manera limitada, el tejido trasplantado representa un tejido isquémico.

Se realizó un estudio en ratas de Fisher en el que fragmentos de tejido adiposo se trasplantaron en el espacio subcutáneo sobre los músculos de la parte externa del muslo. La pata derecha se trasplantó con 0,2 g de fragmentos de tejido adiposo en solitario, la pata izquierda con 0,2 g de fragmentos de tejido adiposo complementado con la adición de células madre obtenidas de tejido adiposo a tres dosis diferentes ($1,7 \times 10^5$ - $1,3 \times 10^6$

células/injerto; tres animales por dosis). De esta manera la pierna del lado contrario actúa como un control. Después los animales se mantuvieron durante un mes después de lo cual los animales se sometieron a eutanasia y los injertos se recuperaron, pesaron, fijaron en formalina y se impregnaron en parafina para análisis histológico.

Como se muestra en la Figura 9A, los resultados muestran retención mínima de tejido injertado en la pata de control y un aumento dependiente de la dosis en la retención de peso de injerto en la pata tratada. Además, el análisis inmunohistoquímico de los injertos mostró neoangiogénesis considerable y perfusión en los injertos tratados con células madre obtenidas de tejido adiposo (Figura 20B, flechas). Esto también se asoció con la retención de morfología de tejido adiposo (Figura 20B).

Por consiguiente, los Ejemplos 1-5 demuestran que las células regenerativas obtenidas de tejido adiposo de la invención secretan factores de crecimiento angiogénicos y arteriogénicos; forman redes capilares nacientes *in vitro*; potencian la supervivencia de injertos de grasa; y potencian la reperfusión isquémica. Por tanto, las células regenerativas son capaces de promover la angiogénesis y la arteriogénesis y pueden ser funcionales para tratar enfermedades múltiples con insuficiencias circulatorias subyacentes.

EJEMPLO 6: Las Células Regenerativas Secretan Citoquinas Relacionadas con la Cicatrización de Heridas *In Vitro*

Las quimoquinas funcionan en cicatrización de heridas cutáneas. El reclutamiento de subtipos de leucocitos está regulado estrictamente por quimoquinas. Adicionalmente, estas quimoquinas también contribuyen a la regulación de epitelización, remodelación de tejido y angiogénesis.

Por consiguiente, se midió la cantidad relativa de citoquinas relacionadas con cicatrización de heridas secretada por ADC cultivadas a partir de ratones adultos normales. Las ADC se cultivaron en alfa-MEM con FBS al 10% hasta cinco días más allá de la confluencia celular, tiempo en el cual el medio de cultivo celular se recogió y se evaluó mediante análisis de matriz de anticuerpo (RayBio® Mouse Cytokine Antibody Array III (RayBiotech, Inc.).

Los resultados (véase la Tabla A) demuestran que las células regenerativas secretan factores del crecimiento y citoquinas para reclutamiento de neutrófilos, macrófagos, mastocitos y linfocitos *in vitro* que contribuye a la re-epitelización en el procedimiento de cicatrización de heridas. Específicamente, las células regenerativas secretan MIP-1 alfa, RANTES y MCP-1 que funciona en el reclutamiento de macrófagos; mCP-1 que funciona en reclutamiento de monocitos y mastocitos; MIG y TARC que funcionan en reclutamiento de linfocitos; MIP-2 y KC que funcionan en la reparación de heridas y epitelización y TIMP que es un inhibidor de metaloproteinasa-1 de tejido que puede invertir el desequilibrio de metaloproteinasa en herida crónica para ayudar a la curación. Los macrófagos y linfocitos ambos producen factores reguladores y promotores del crecimiento. Adicionalmente, los mastocitos liberan IL-4, que puede estimular la activación de fibroblastos.

TABLA A

	Promedio	Desviación Típica
IL-4	316,95	38,9
IL-6	12546,2	339,8
Linfotactina	673,2	6,7
KC	1154,2	65,4
LIX	1825	183,8
MCP-1	17259,4	1381,7
MCP-5	1638,2	6
MIP-1γ	6632,4	84,1
RANTES	401,7	8,1
SDF-1α	950,7	53,4
TIMP-1	1485,2	234,4

EJEMPLO 7: Las Células Regenerativas Secretan Colágeno *In Vitro*

Células regenerativas se combinaron con fibroblastos de ratón neonatal de ratón Rosa en tres medios de cultivo diferentes, es decir, DMEM, McCoy 5A y AMEM. El medio se cambió dos veces por semana durante 2 semanas. El medio no se cambió durante la tercera semana.

Todo el medio se recogió y se realizó un ensayo de colágeno de acuerdo con el protocolo convencional. En resumen, 100 μ l de sobrenadante + 100 μ l de HCl 6 N, se incuban a 100°C durante 16 horas, se enfrían y reaccionan con reactivo Cloramina-T y dimetilaminobenzaldehído, después se detecta DO a 550.

No se puede observar diferencia significativa de secreción de colágeno entre ADC y fibroblastos, mientras que se puede observar una diferencia significativa entre diferentes medios de cultivo. Específicamente, en medio de McCoy 5A, tanto ADC como fibroblastos secretan más colágeno que en DMEM o AMEM ($p < 0,05$). Véase la Figura 21.

EJEMPLO 8: Las Células Regenerativas Aceleran la Cicatrización de Heridas de Ratones Diabéticos Tratados con STZ

5 Para determinar si las células regenerativas obtenidas de tejido adiposo pueden promover la cicatrización de heridas *in vivo*, 10 ratones se trataron con STZ durante 7 semanas. En ese momento, se crearon heridas de piel de grosor completo de 8 mm bilaterales a través de una biopsia en sacabocados. Después 5 ratones se trataron con ADC mediante inyección directa local de 1×10^6 (de donantes lacZ) por herida en un volumen de 0,05 ml y los otros 5 se trataron con solución salina y se usaron como un control.

10 El día 10, el tamaño de la herida de ambos grupos alcanzó una diferencia significativa ($p=0,002$, $n=10$ heridas, 5 ratones). Véase la Figura 22. Estos resultados demuestran que las células regenerativas obtenidas de tejido adiposo pueden ayudar en la cicatrización de heridas de ratón.

Adicionalmente, para demostrar el injerto de células obtenidas de donante en la herida, se realizó la tinción de β -galactosidasa en las heridas. Los resultados (no mostrados) demostraron que células ADC positivas para Beta gal de donante se pueden localizar alrededor del sitio de inyección, cerca de los capilares y cerca del lecho de la herida.

Ejemplo 9: Las Células Regenerativas Aceleran el Re-crecimiento de Pelo en Ratones con Heridas

15 Diez ratones se trataron con STZ durante 7 semanas. Después de tratarse con removedor de pelo Nair, se crearon heridas en la piel de espesor completo de 8 mm bilaterales a través de una biopsia en sacabocados. Después 5 ratones se trataron con ADC mediante inyección local directa a 1×10^6 por herida en un volumen de 0,05 ml y los otros 5 se trataron con solución salina y se usaron como un control. El procedimiento idéntico se realizó en 8 ratones 129 F1 B6C57 normales, cuatro con tratamiento local de ADC y 4 con tratamiento de solución salina como control.

20 El día 14 el tamaño de la herida de ambos grupos experimentales se midió y se tomaron imágenes para registrar el índice de recuperación de pelo. Los resultados (no mostrados) demostraron que las células regenerativas obtenidas de tejido adiposo no sólo ayudaron en la cicatrización de heridas de ratón, sino que también aceleraron significativamente el índice de crecimiento de pelo ($p<0,05$). El análisis histológico realizado mostró células obtenidas de tejido adiposo obtenidas de donante alrededor del folículo piloso. Por tanto, ADC puede contribuir al restablecimiento normal de pelo simultáneamente con la promoción de cicatrización de heridas.

Equivalentes

Los expertos en la materia reconocerán o serán capaces de determinar usando no más que experimentación de rutina, muchos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención descrita en el presente documento. Tales equivalentes tienen por objeto estar incluidos por las siguientes reivindicaciones.

30

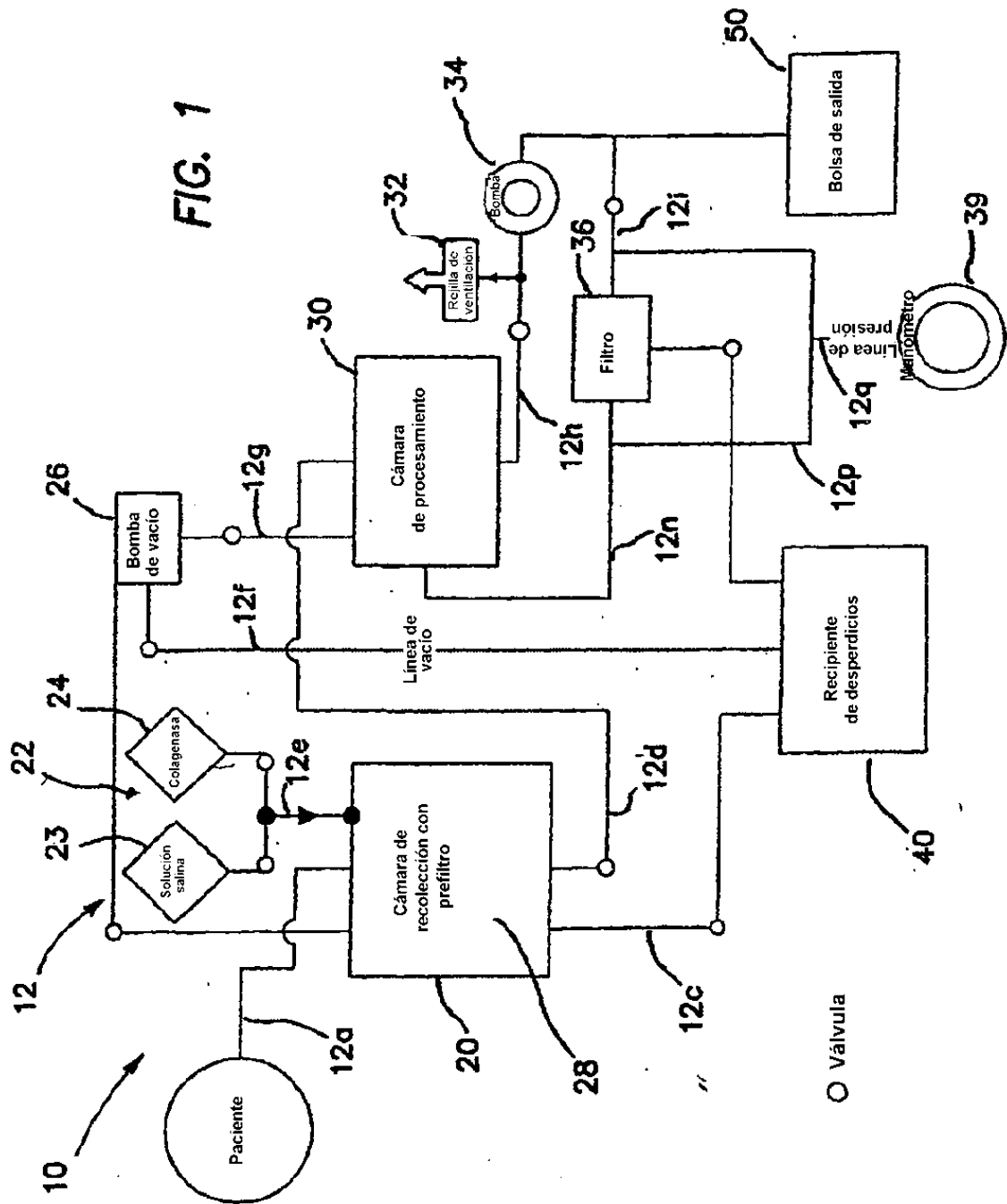
REIVINDICACIONES

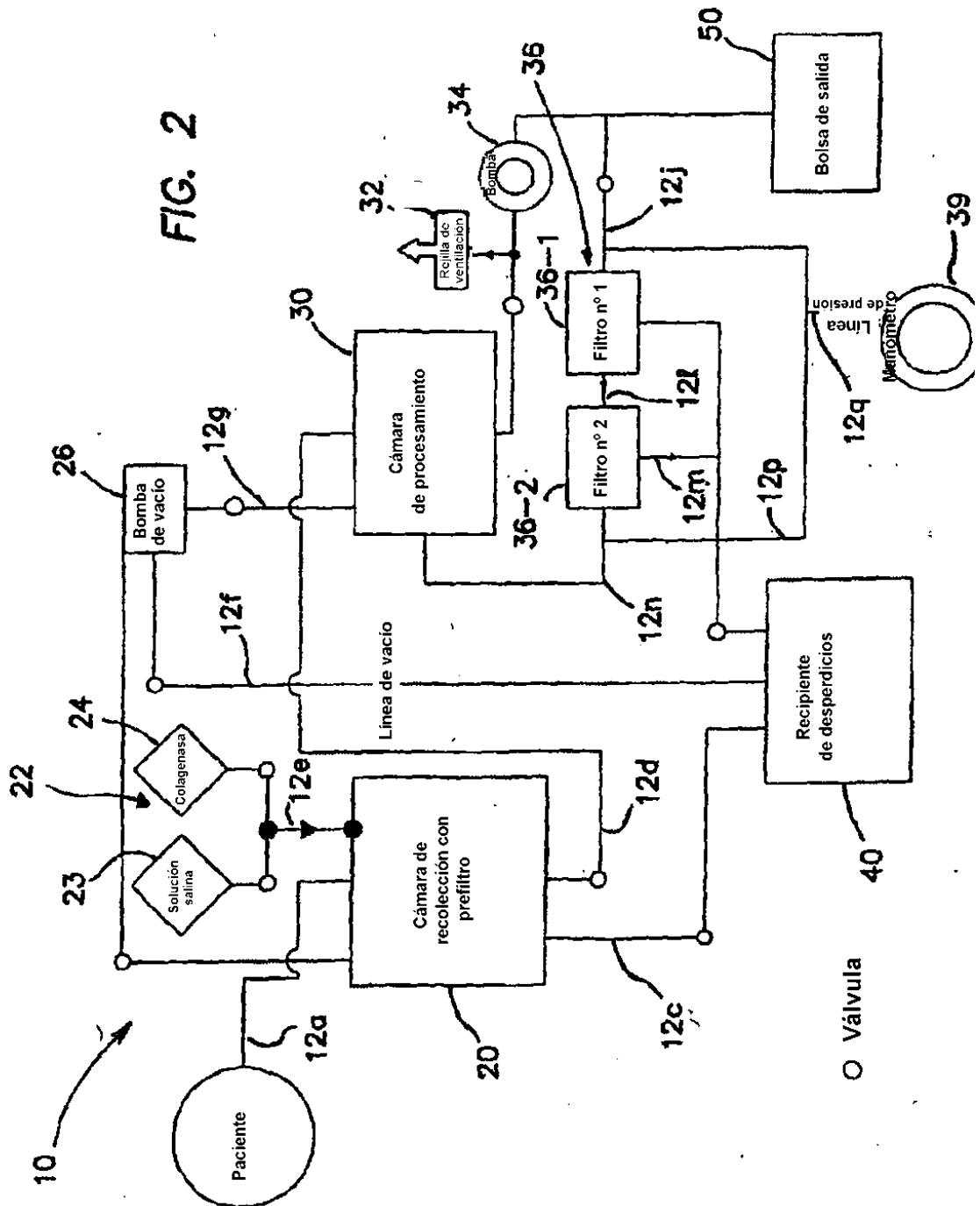
1. Uso de una población concentrada de células regenerativas obtenidas de tejido adiposo que comprende células madre en la preparación de un medicamento para promover la epitelización y la formación de neodermis en un sitio de herida, en el que dicha población concentrada de células se ha de administrar a un paciente que necesita la misma sin cultivar las células antes de que las células se administren.
2. El uso de la reivindicación 1 en el que dicha población concentrada de células regenerativas obtenidas de tejido adiposo que comprenden células madre secretan MIP-1 alfa, RANTES, MCP-1, MIG, TARC, MIC-1, KC y TIMP.
3. El uso de la reivindicación 1, en el que dicha población concentrada de células secreta IL-4, IL-6, Linfotactina, LIX, MIP-1 gamma, RANTES, MCP-1, MCP-5, SDF-1 alfa, KC y TIMP-1.
4. El uso de la reivindicación 1, en el que dicha población concentrada de células regenerativas obtenidas de tejido adiposo secreta colágeno en el sitio de la herida.
5. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha población concentrada de células regenerativas obtenidas de tejido adiposo que comprende células madre comprende además células endoteliales.
6. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha población concentrada de células regenerativas obtenidas de tejido adiposo que comprende células madre comprende además células progenitoras.
7. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha población concentrada de células regenerativas obtenidas de tejido adiposo que comprende células madre comprende además una combinación de células endoteliales y células progenitoras.
8. El uso de la reivindicación 1 en el que dicha población concentrada de células regenerativas obtenidas de tejido adiposo secreta MIP-2 y KC.
9. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medicamento promueve el crecimiento de pelo en dicho sitio de herida.
10. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medicamento está formulado para una introducción por bolo.
11. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medicamento está formulado para introducción en múltiples dosis.
12. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho medicamento comprende además uno o más factores angiogénicos.
13. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho medicamento comprende además uno o más fármacos inmunodepresores.
14. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medicamento está formulado para administración subcutánea, dérmica o intramuscular.
15. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medicamento se formula para administración a la vasculatura.
16. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichas células regenerativas obtenidas de tejido adiposo están modificadas mediante transferencia génica de forma que la expresión de uno o más genes en las células modificadas se altera.
17. El uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la modificación da como resultado la alteración del nivel de angiogénesis.
18. El uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la modificación da como resultado la alteración del nivel de epitelización.
19. El uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la modificación da como resultado la alteración del nivel de MIP-1alfa, RANTES, MCP-1, MIG, TARC, MIP-2, KC y TIMP o cualquier combinación de los mismos.
20. El uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la modificación altera las propiedades de reposición de las células regenerativas obtenidas de tejido adiposo.
21. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el medicamento está formulado a partir de una población concentrada de células regenerativas obtenidas de tejido adiposo a partir del mismo sujeto

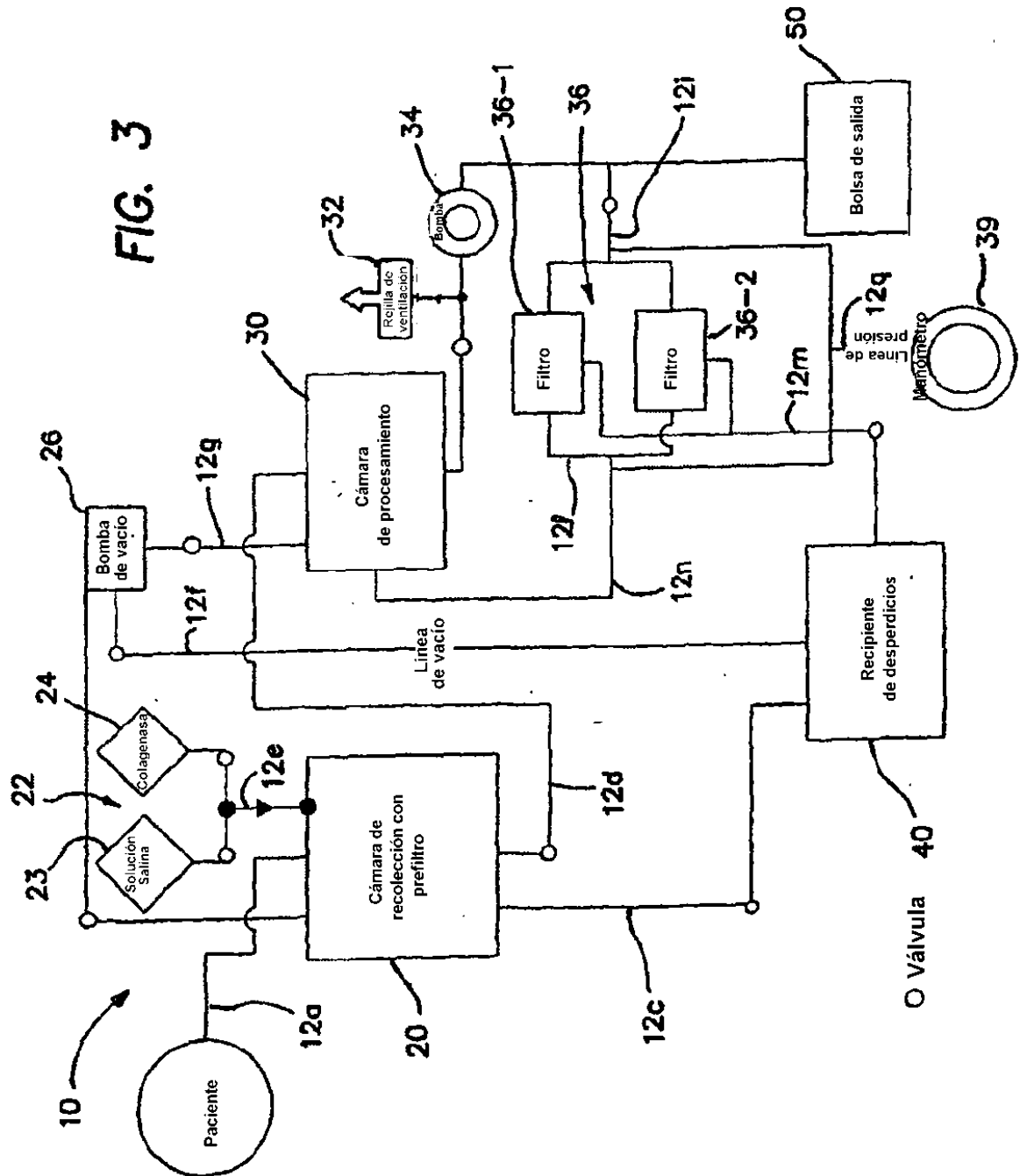
al cual se tiene que administrar el medicamento.

22. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho medicamento proporciona una concentración mínima entre 1×10^5 y 1×10^7 células regenerativas obtenidas de tejido adiposo por ml.

5 23. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha herida es una herida de úlcera isquémica, una herida diabética o una herida traumática.







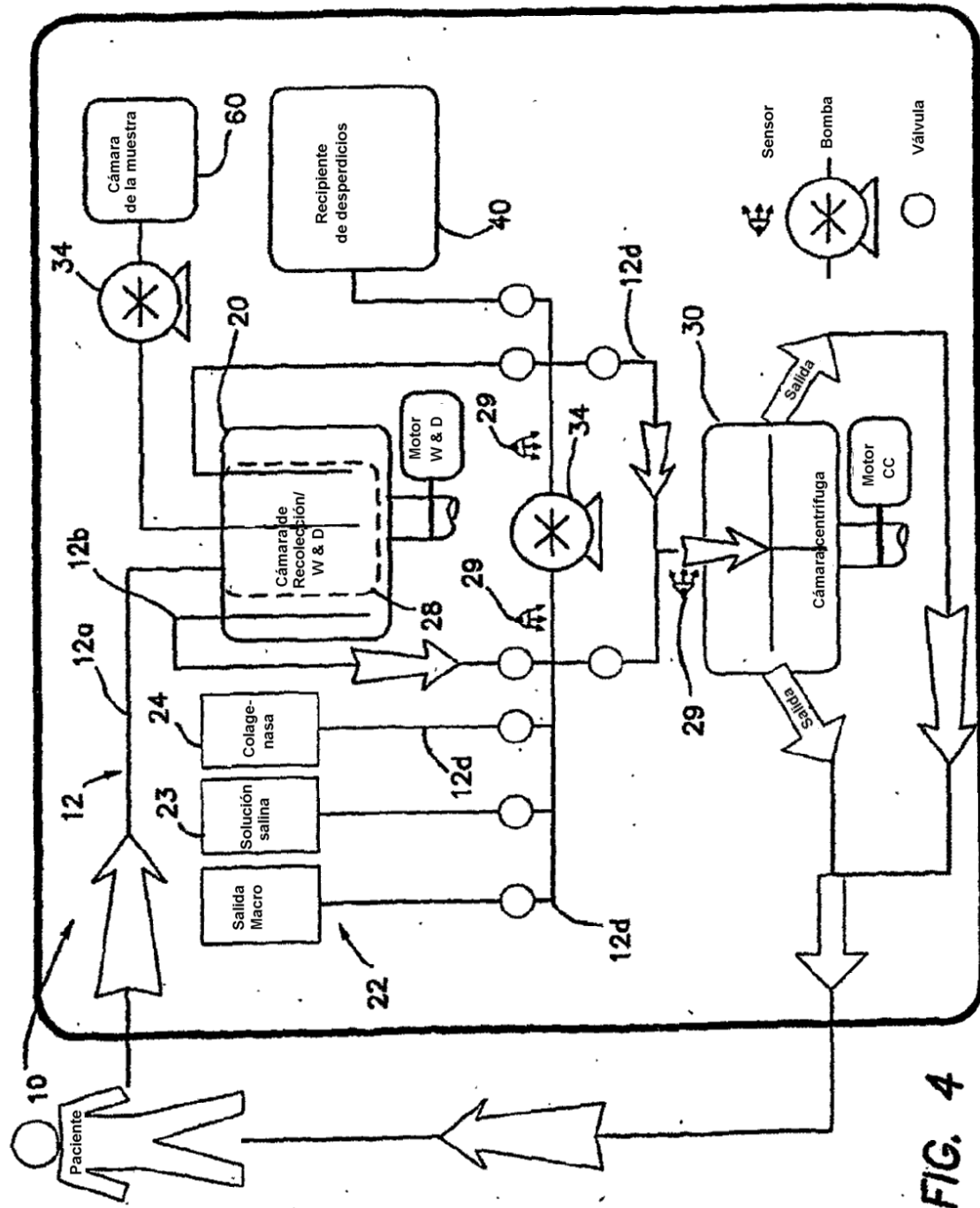
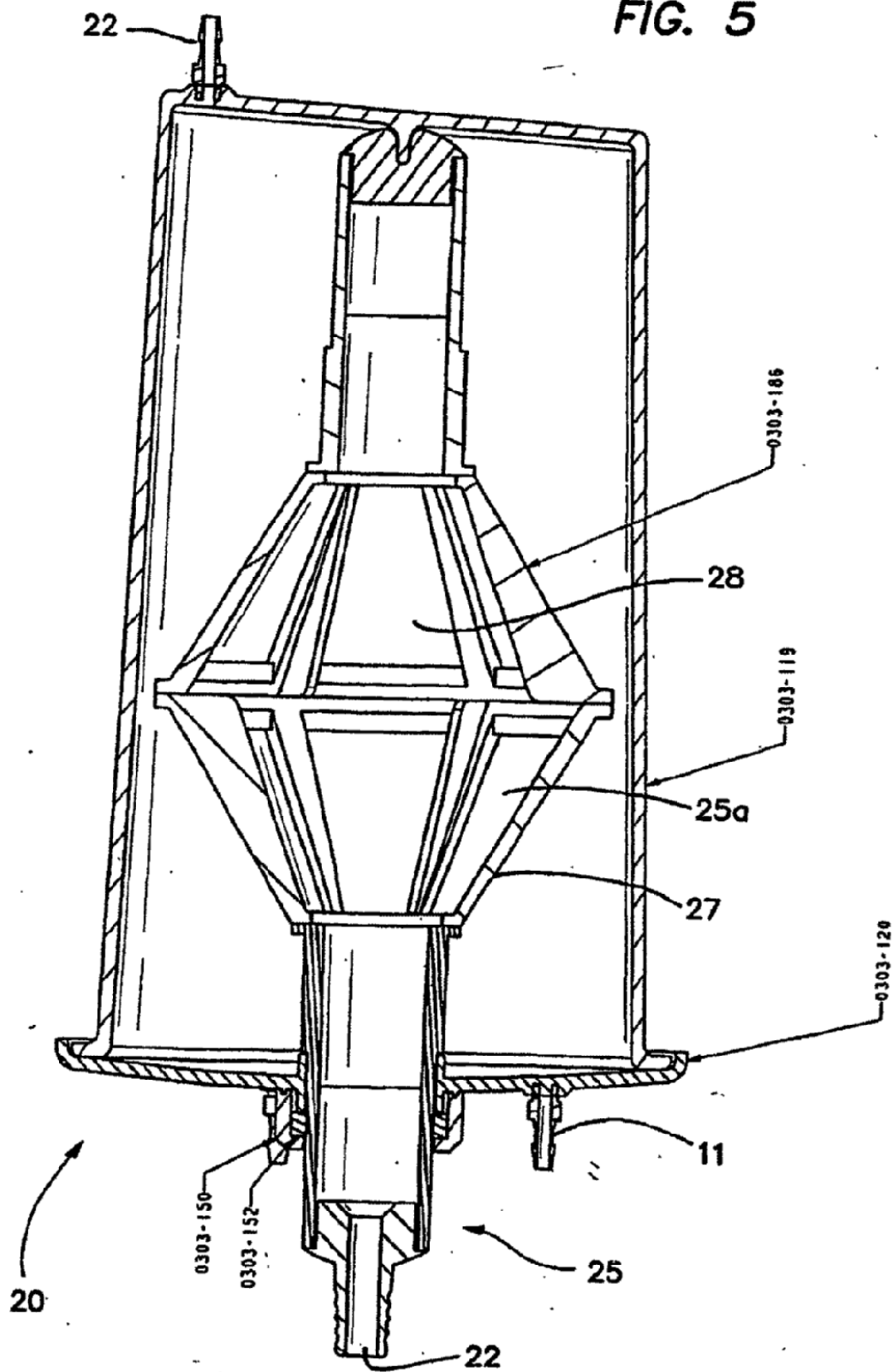


FIG. 4

FIG. 5



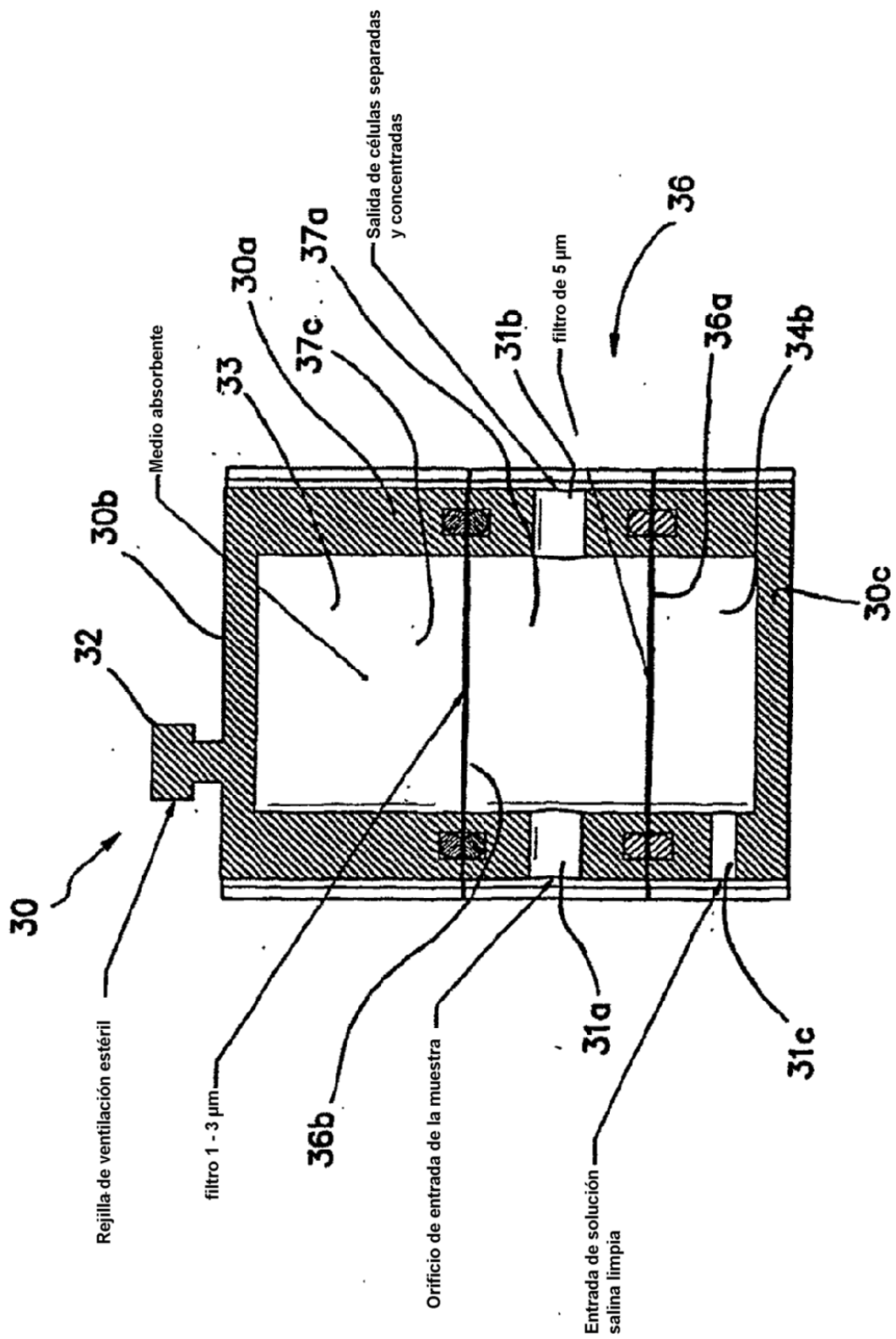
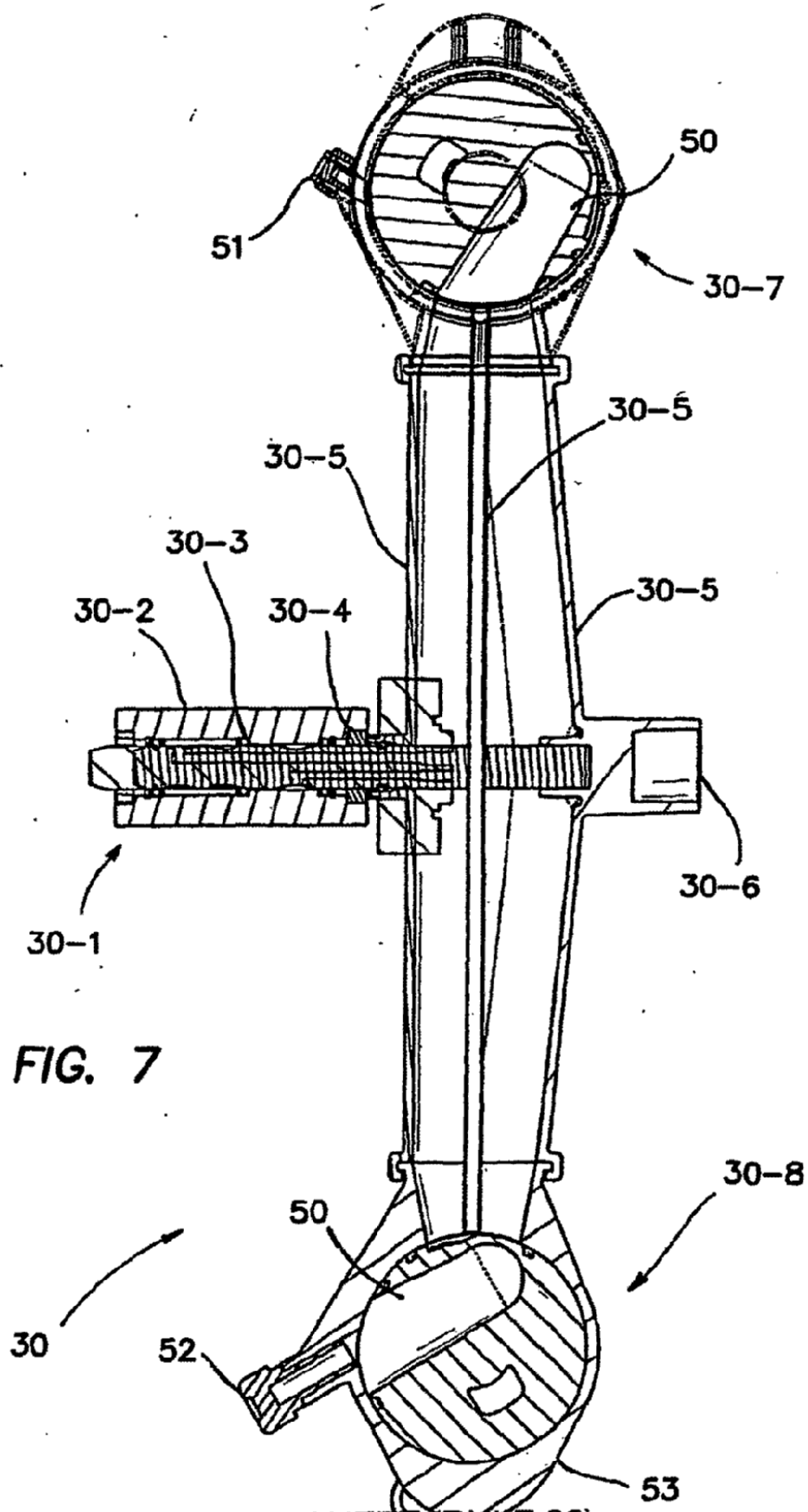
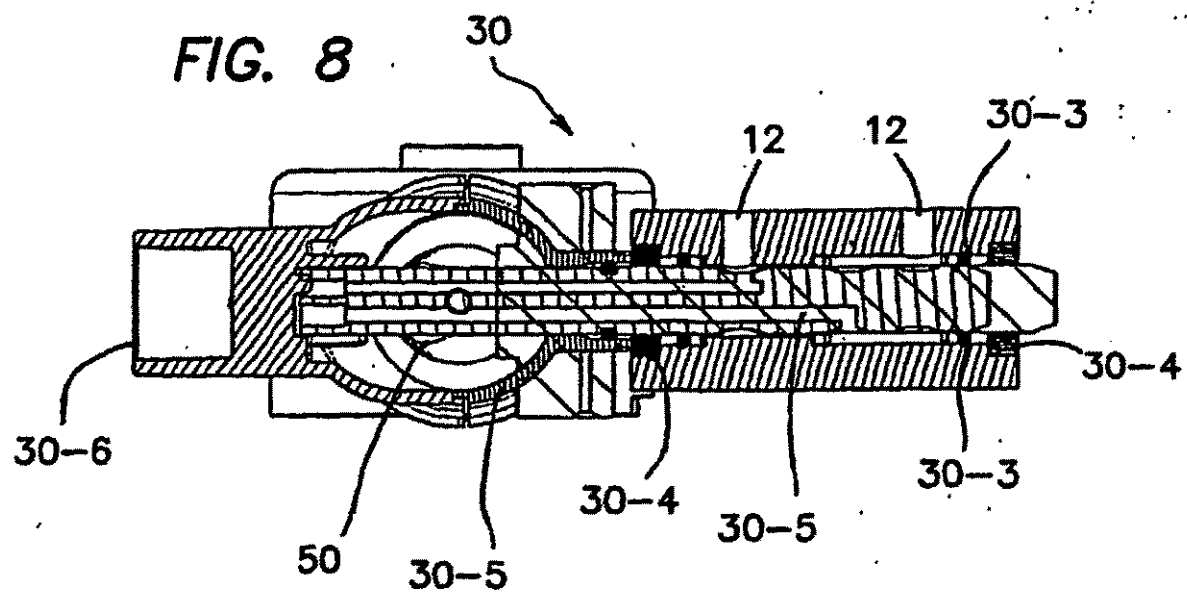
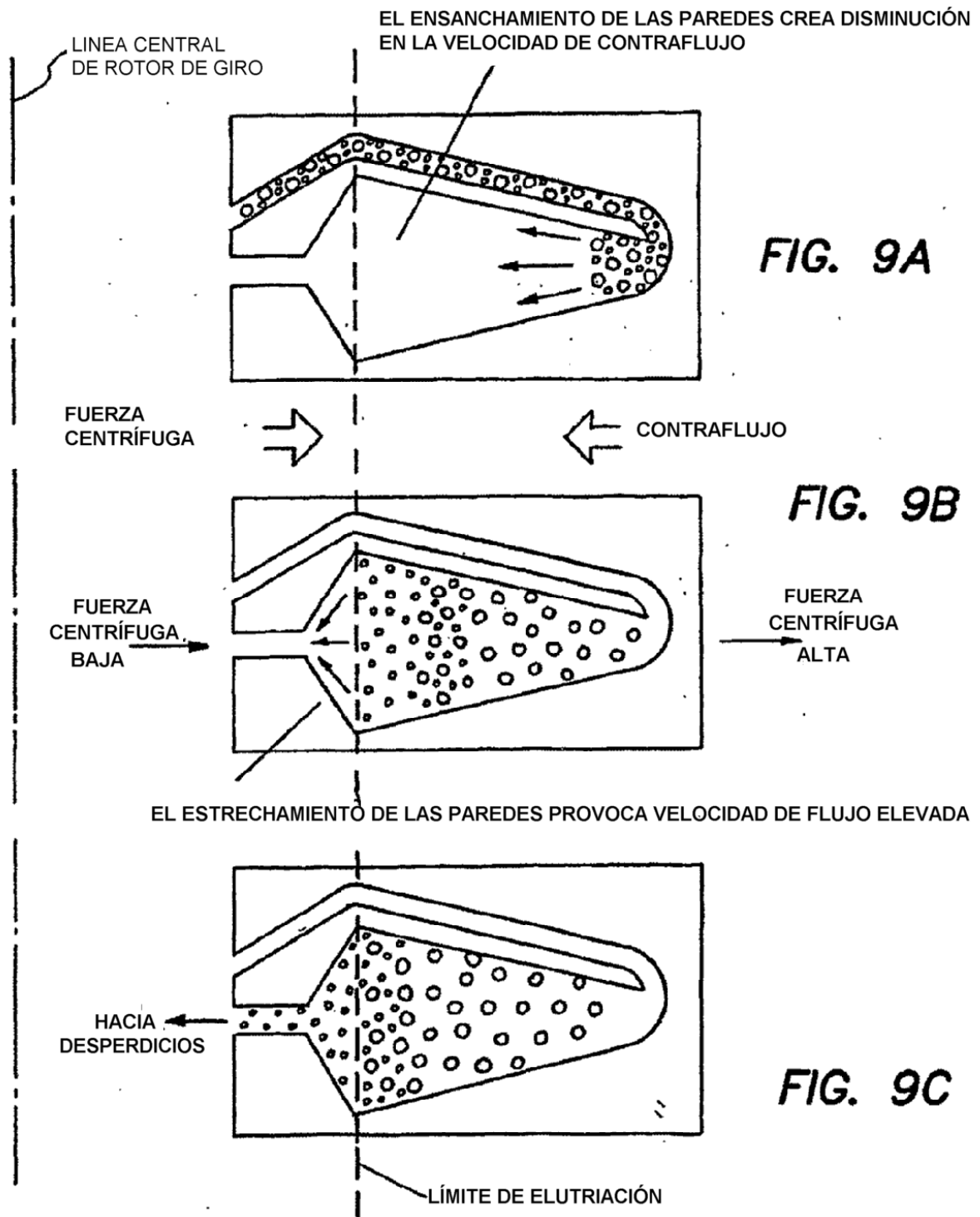


FIG. 6







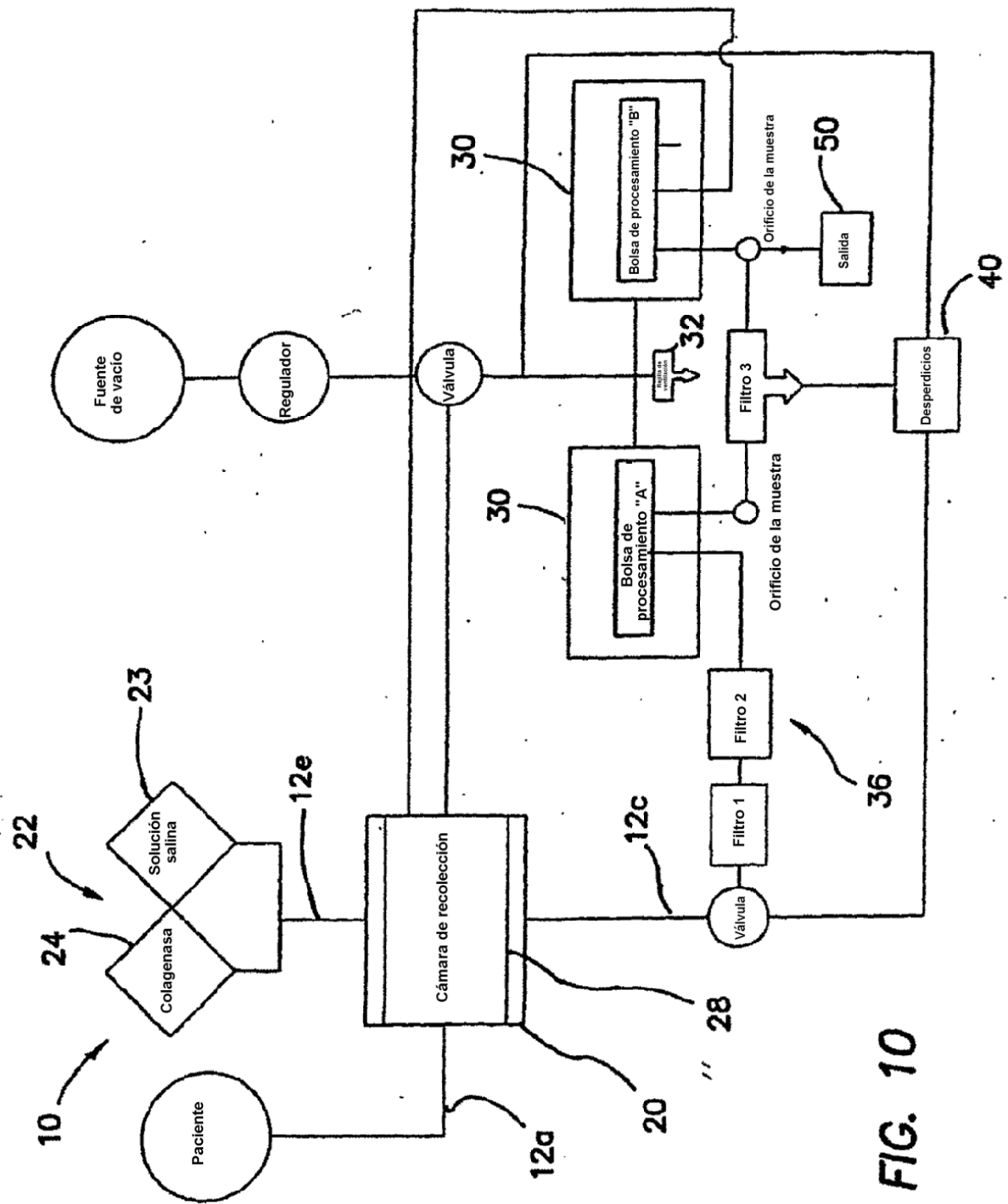
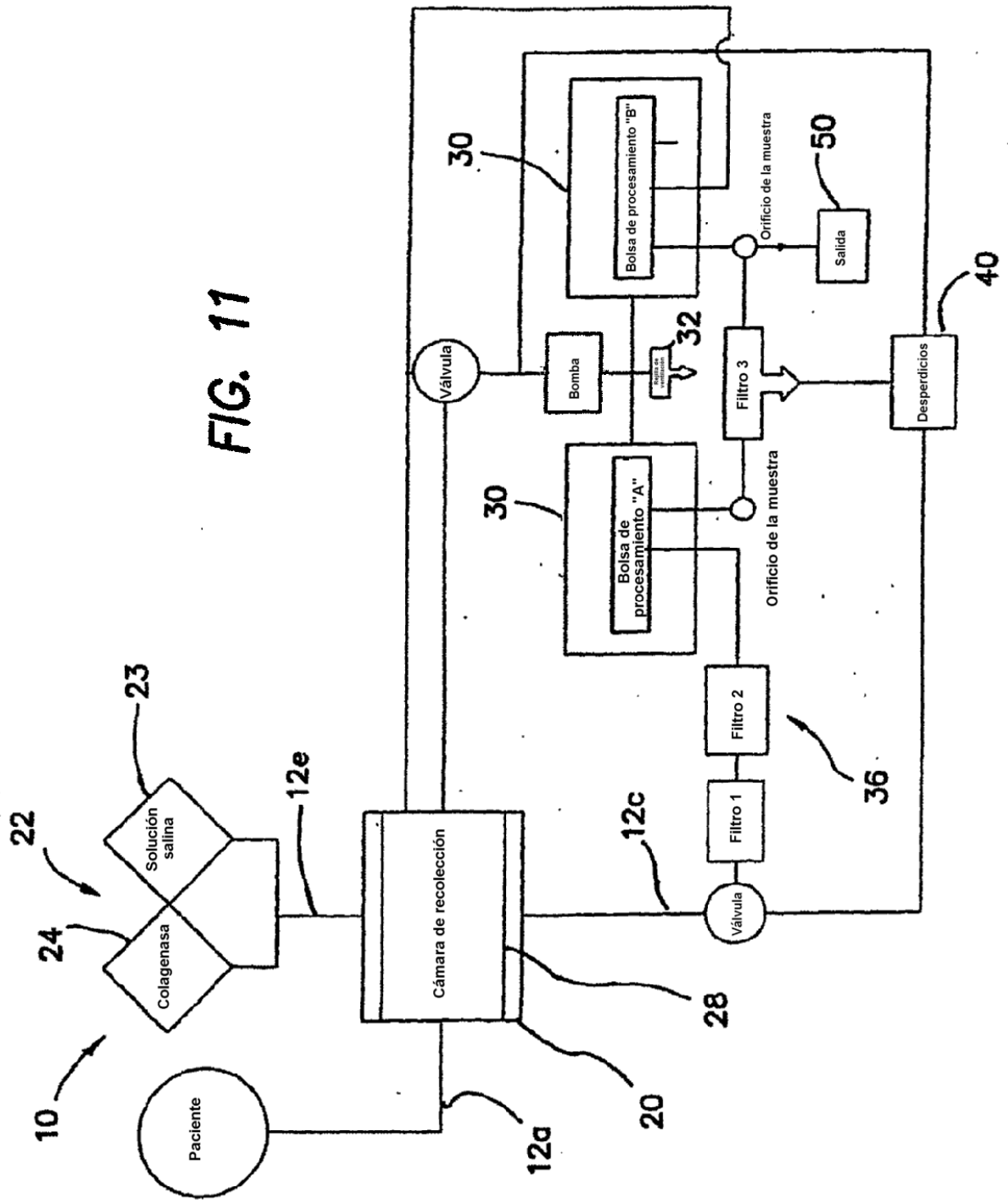


FIG. 10

FIG. 11



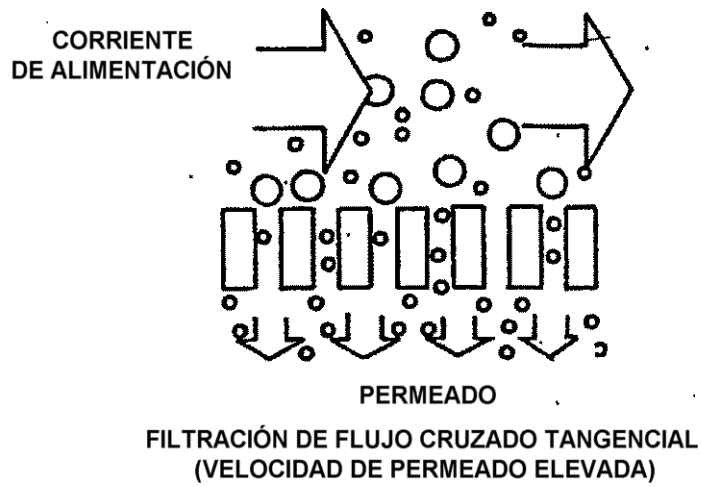


FIG. 12A

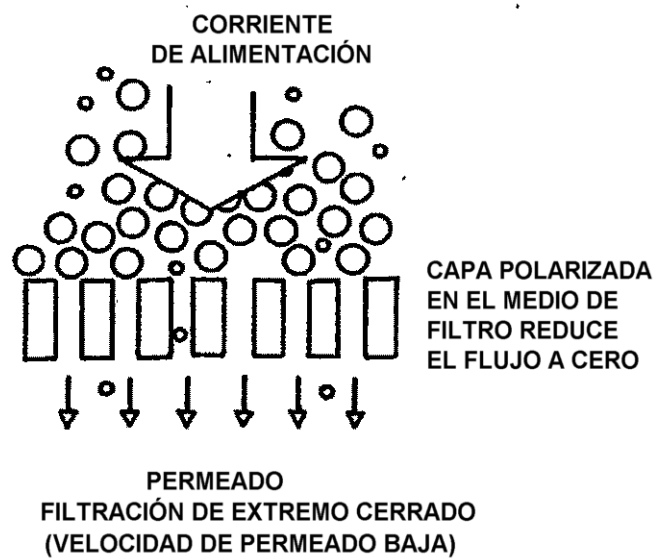
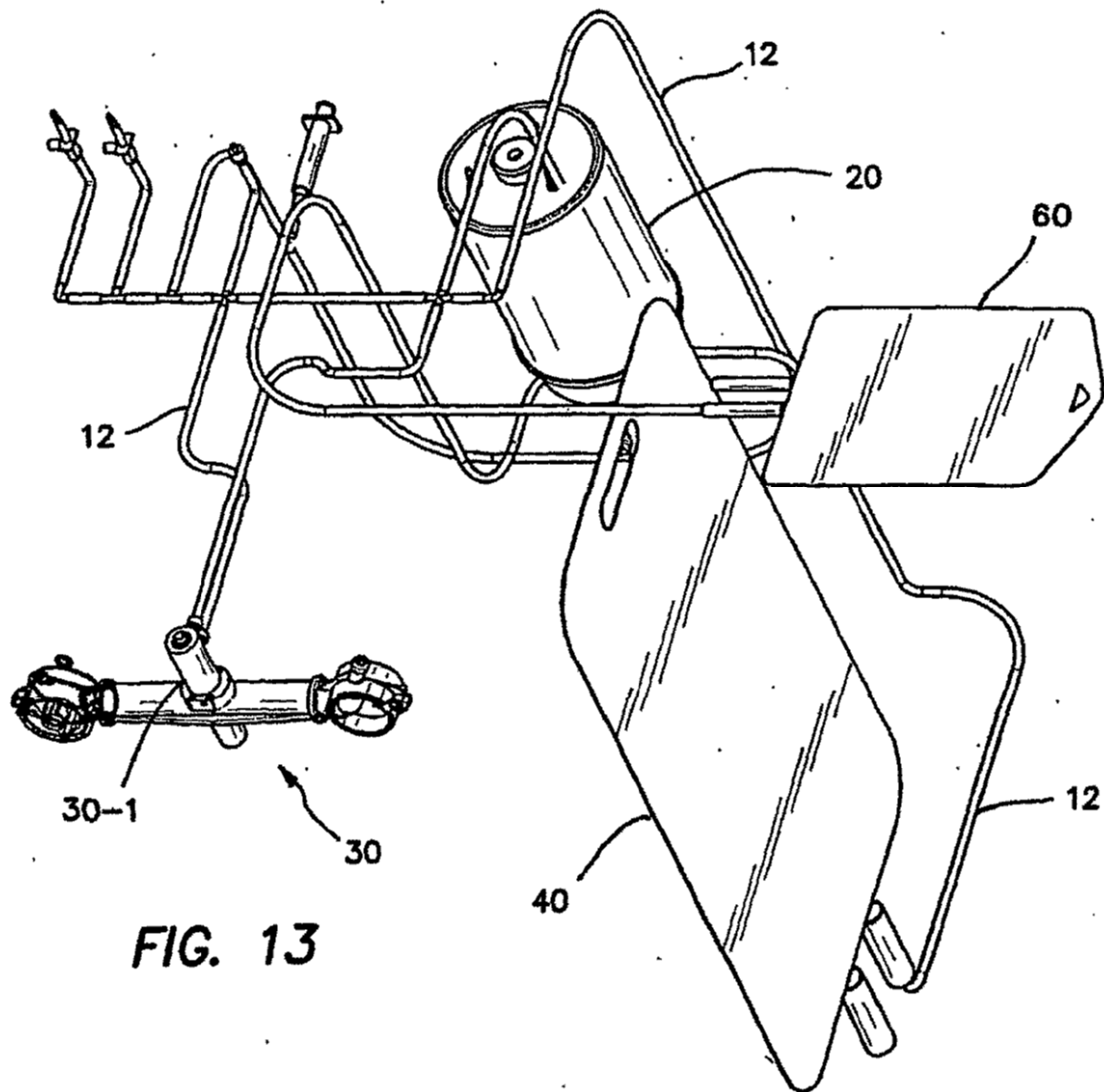


FIG. 12B



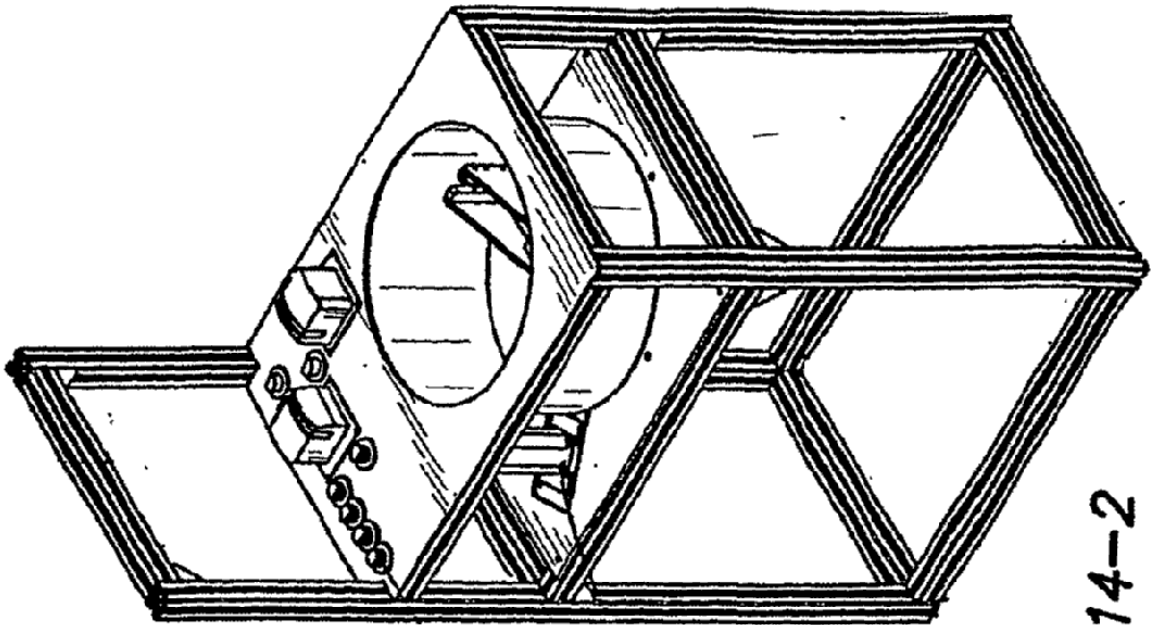


FIG. 14-2

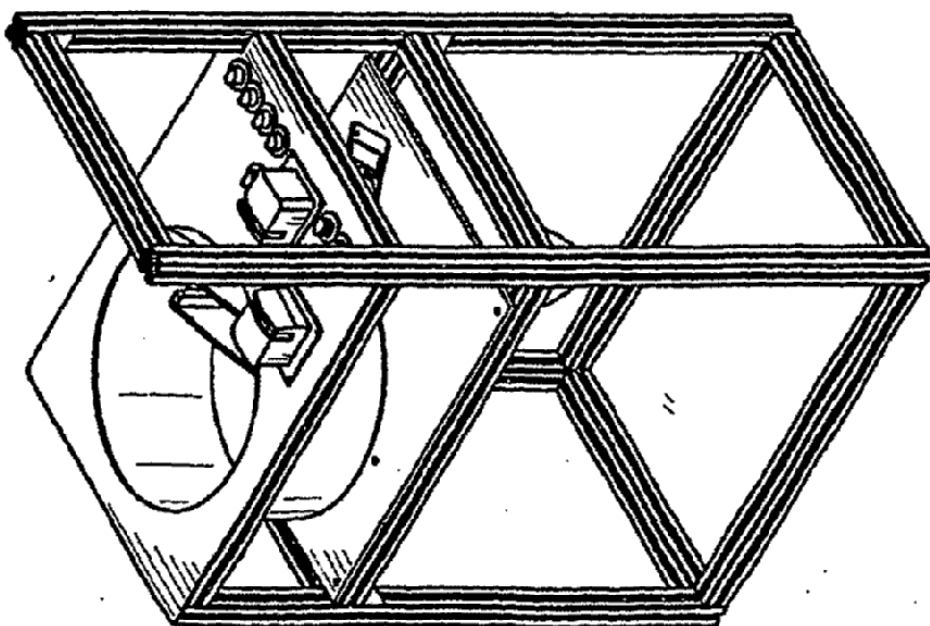


FIG. 14-1

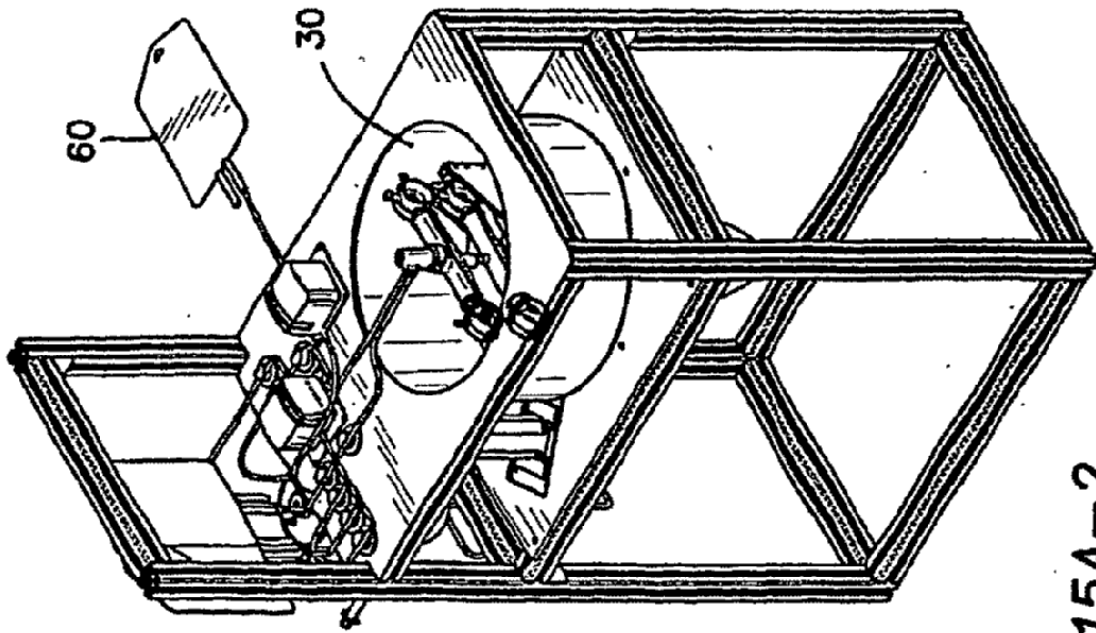


FIG. 15A-2

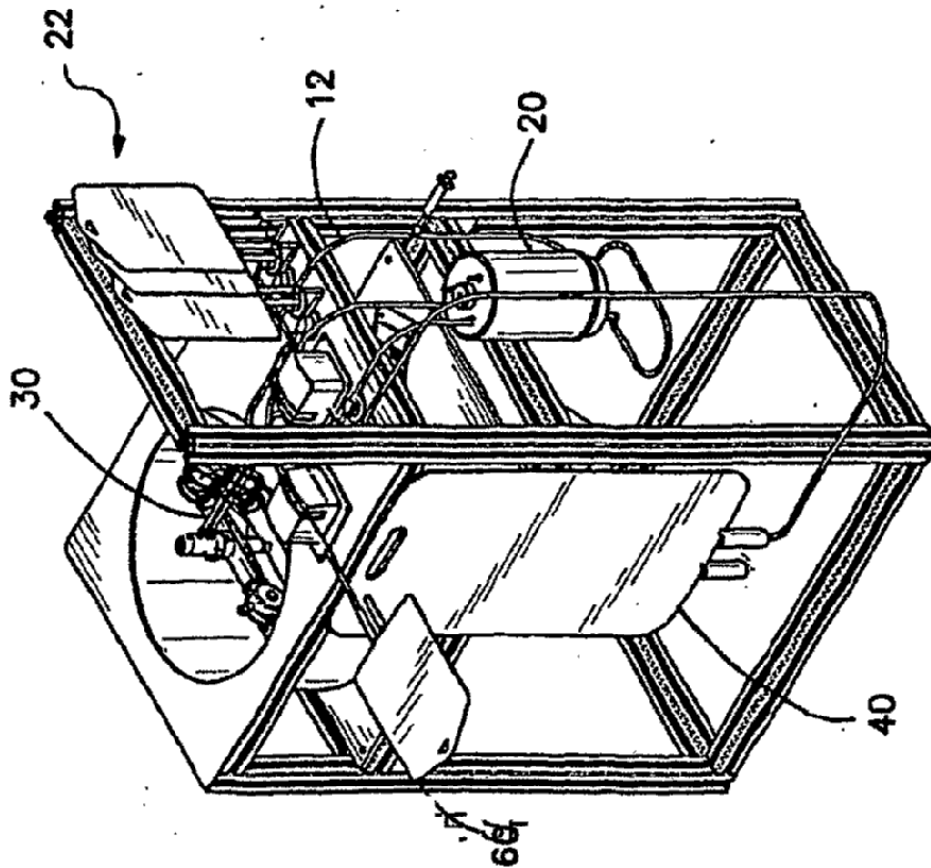
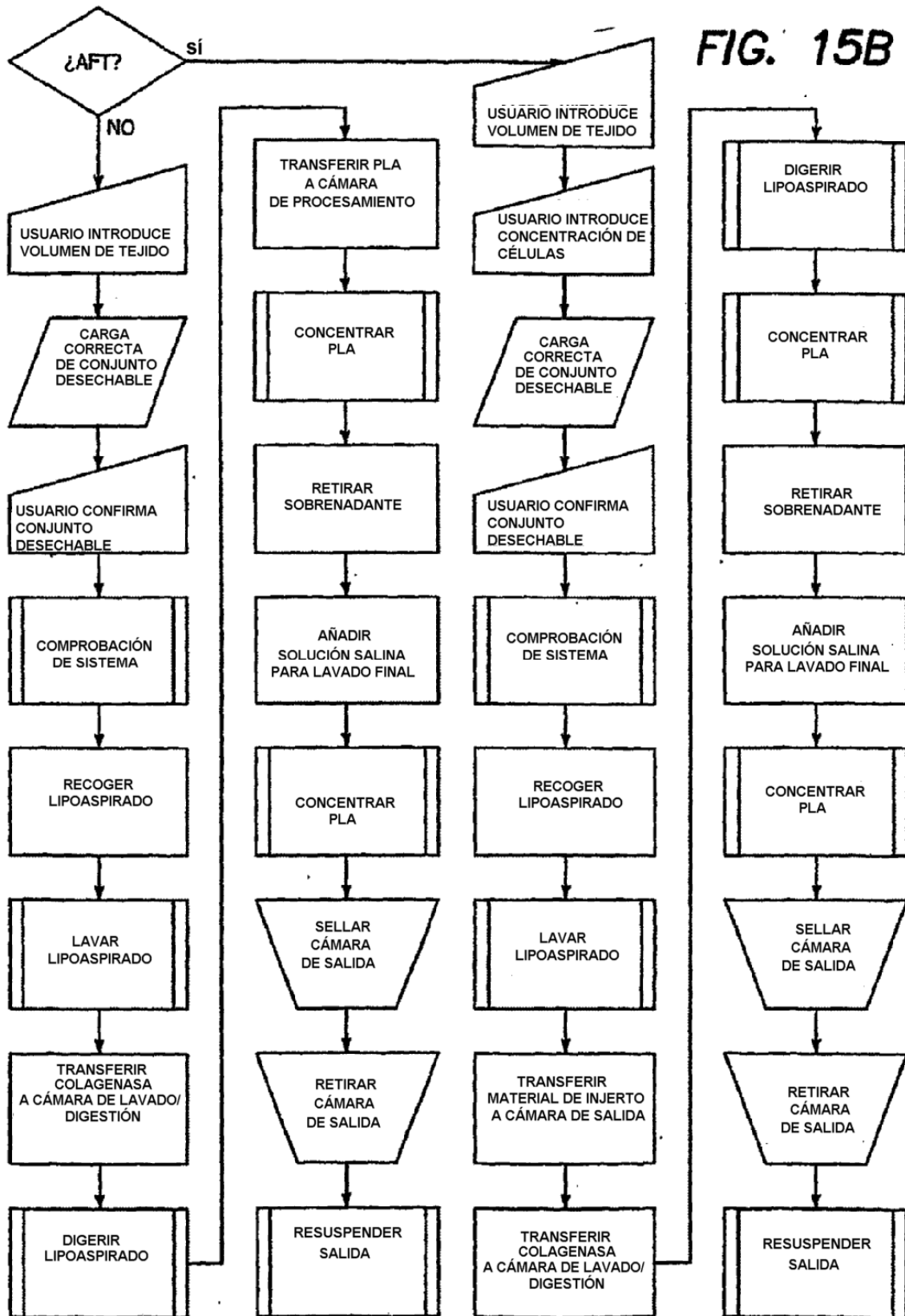


FIG. 15A-1



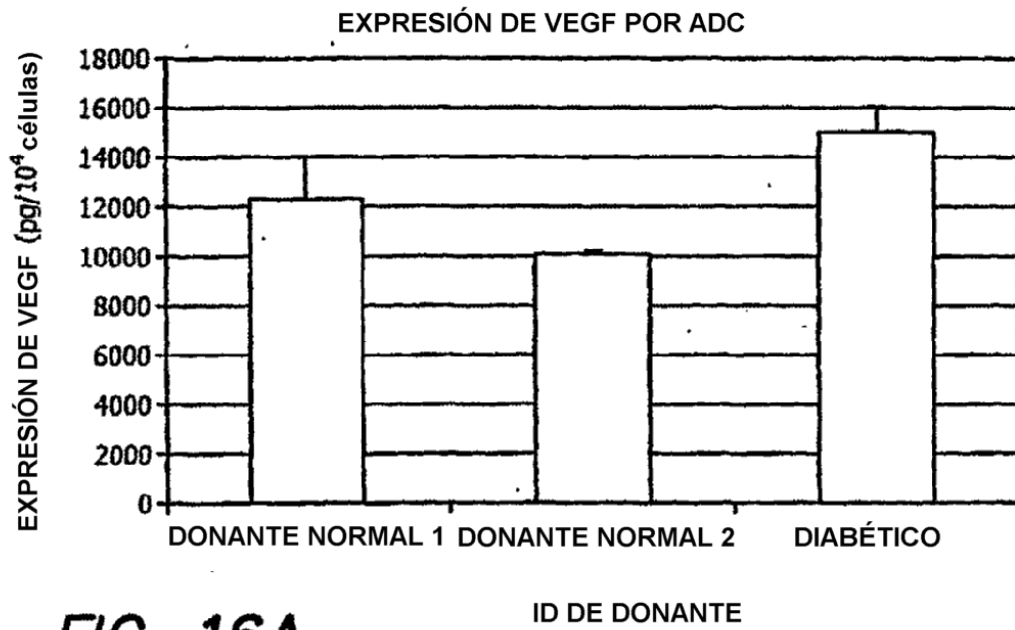


FIG. 16A

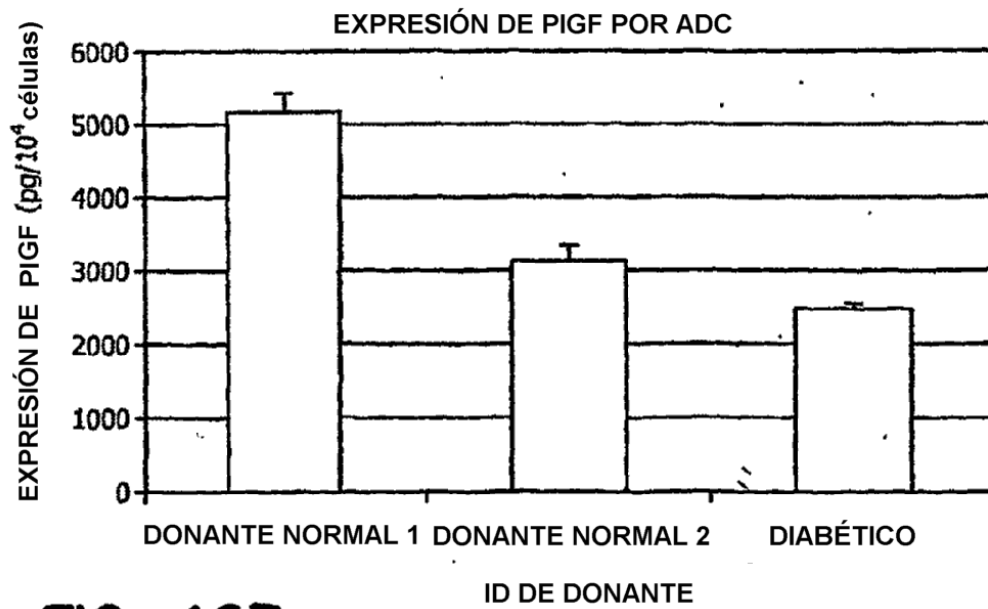


FIG. 16B

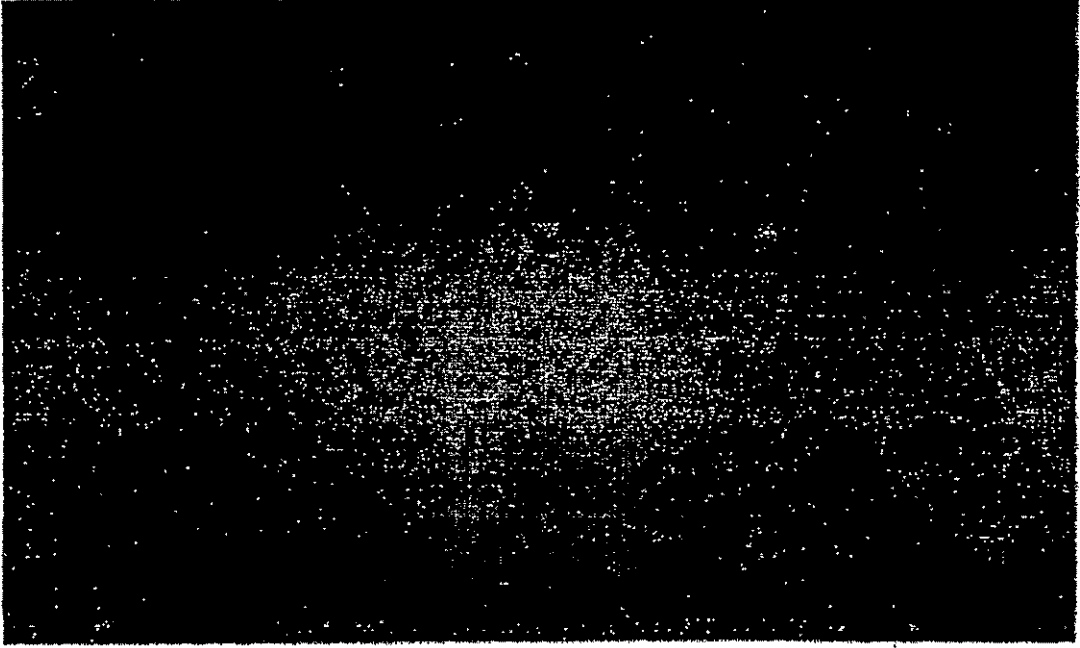


FIG. 17

Crecimiento de Estructuras Vasculares Positivas a CD31 a partir de ADC de Ratones Normales y Tratados con STZ

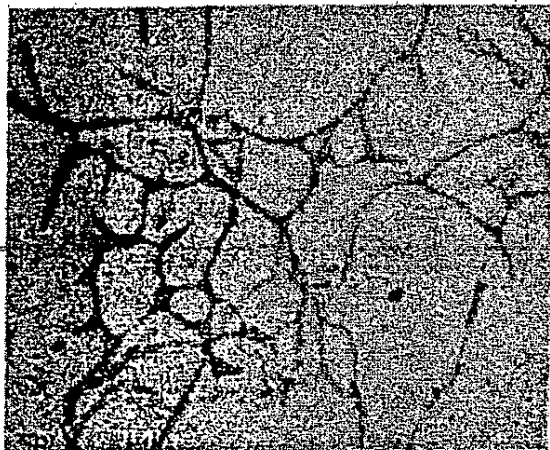


Figura 18A

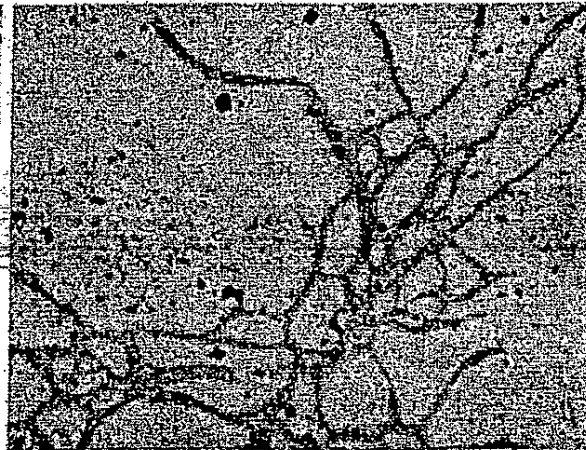


Figura 18B

FLUJO SANGUÍNEO PROMEDIO DE MODELO DE ISQUEMIA DE MIEMBROS POSTERIORES EN RATONES SCID TRATADOS CON PLA HUMANO DIABÉTICO

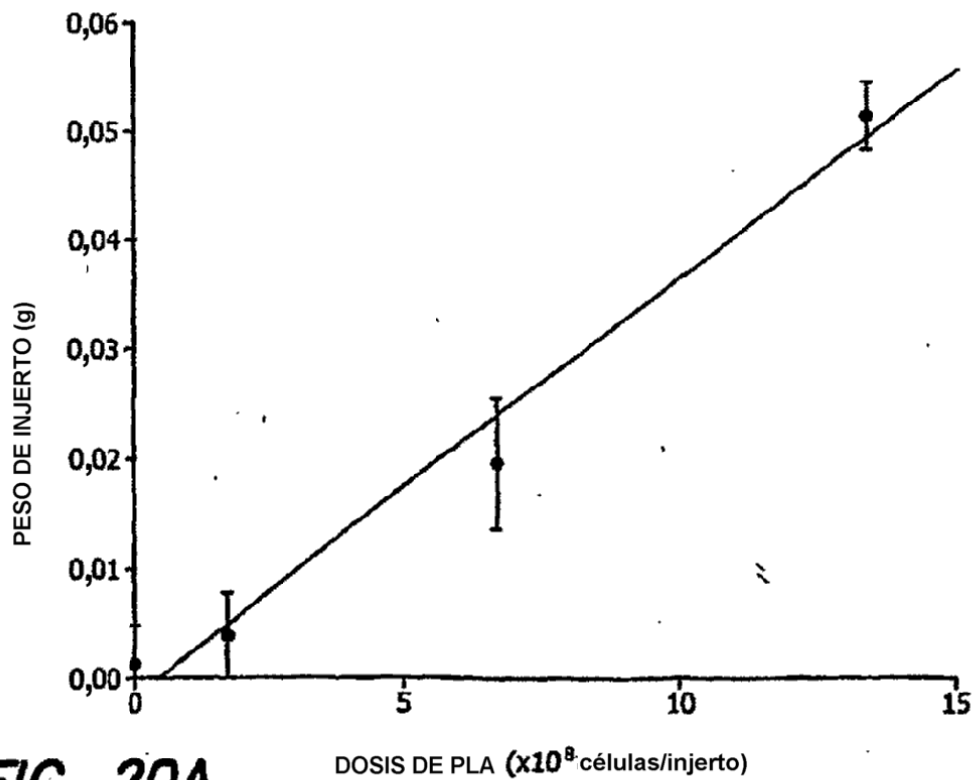
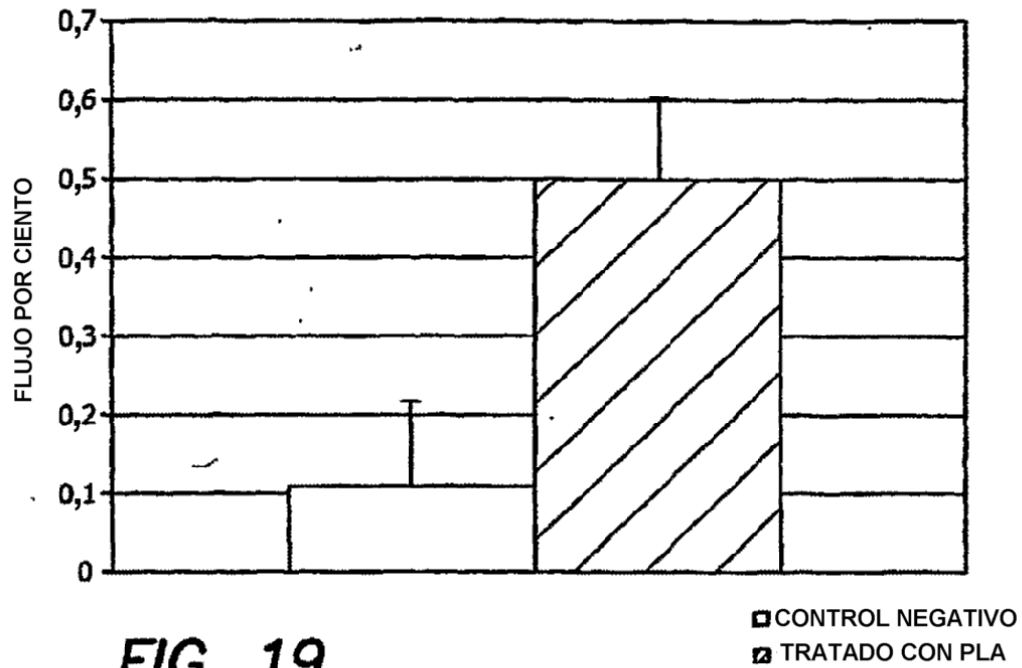


Figura 20B

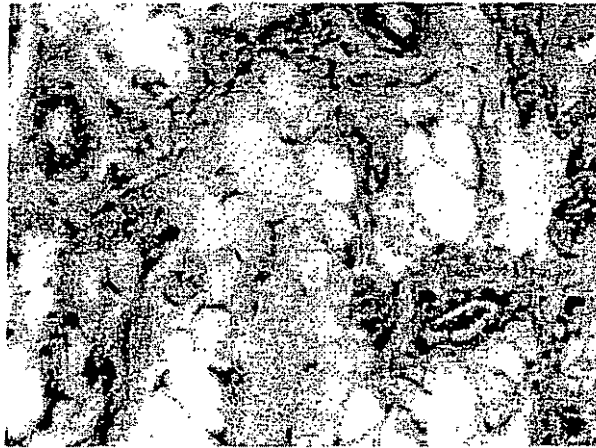


FIGURA 21

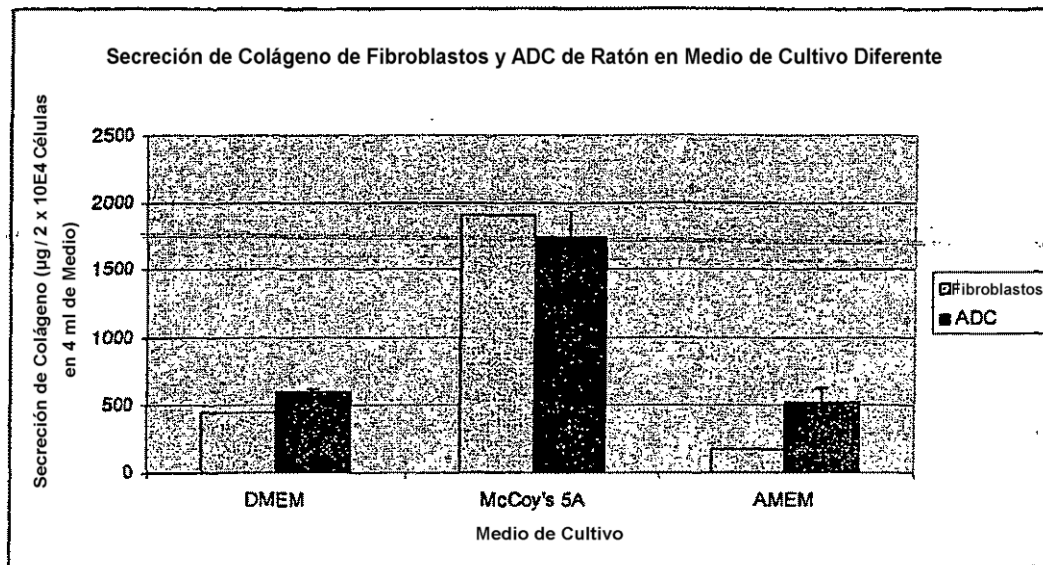


FIGURA 22

