

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 551**

51 Int. Cl.:
A01N 63/00 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04713403 .6**
96 Fecha de presentación: **20.02.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1599575**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.11.2005**

54 Título: **MÉTODOS PARA USAR CÉLULAS DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSEO EN EL TRATAMIENTO DE AFECCIONES CARDIOVASCULARES.**

30 Prioridad:
20.02.2003 US 449279 P
15.04.2003 US 462911 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.02.2012

73 Titular/es:
CYTORI THERAPEUTICS, INC.
3020 CALLAN ROAD
SAN DIEGO, CALIFORNIA 92121, US

72 Inventor/es:
FRASER, John, K.;
HEDRICK, Marc, H.;
ZHU, Min;
STREM, Brian, M.;
DANIELS, Eric y
WULUR, Isabella

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 373 551 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

Métodos para usar células derivadas de tejido adiposo en el tratamiento de afecciones cardiovasculares

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. Campo de la Invención

5 Esta invención se refiere en general al uso de una composición que comprende una población concentrada de células derivadas de tejido adiposo (ADC) en la fabricación de un medicamento para restablecer el flujo sanguíneo en un sujeto que se ha determinado que tiene una isquemia, en la que dicha población concentrada de células derivadas de tejido adiposo (ADC) comprende células progenitoras derivadas de tejido adiposo y células madre de tejido adiposo obtenidas procesando el tejido adiposo de dicho paciente en un sistema que está configurado para mantener una ruta de fluidos/tejidos cerrada estéril, y dicho sistema comprende una cámara de recogida conectada a una cámara de mezcla/procesamiento.

2. Descripción de la Técnica Relacionada

15 Las enfermedades y trastornos cardiovasculares son la causa principal de muerte y discapacidad en todas las naciones industrializadas. Solamente en los Estados Unidos, la enfermedad cardiovascular es responsable de alrededor del 40 por ciento de la tasa de mortalidad, y afecta a 58 millones de americanos (American-Heart-Association, 2002). Uno de los factores principales que hace que la enfermedad cardiovascular sea especialmente devastadora es la incapacidad del corazón de repararse tras la lesión. Debido a que las células musculares cardíacas, es decir, las células miocárdicas, son incapaces de dividirse y repoblar las áreas lesionadas, la pérdida de células cardíacas como resultado de la lesión o la enfermedad es en gran parte irreversible (Abbate et al, 2002; Remme, 2000).

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

30 Una alternativa a la terapia de trasplante es el uso de la medicina regenerativa para reparar y regenerar las células musculares cardíacas dañadas. La medicina regenerativa aprovecha, de una manera dirigida clínicamente, la capacidad de las células madre (es decir, las células maestras sin especializar del cuerpo) de renovarse indefinidamente y desarrollarse hasta células especializadas maduras. Las células madre se hallan en los embriones durante las etapas tempranas del desarrollo, en el tejido fetal y en algunos órganos y tejidos adultos (Pera et al., 2000). Se sabe que las células madre embrionarias (denominadas más adelante en la presente memoria "ESCs") se convierten en muchos, si no todos, los tipos de células y tejidos del cuerpo. Las ESCs no solamente contienen toda la información genética del individuo, sino que también contienen la capacidad nata de convertirse en cualquiera de las más de 200 células y tejidos del cuerpo. Así, estas células tienen un potencial enorme para la medicina regenerativa. Por ejemplo, las ESCs se pueden cultivar hasta tejidos específicos tales como corazón, pulmón o riñón, que se podrían usar después para reparar órganos lesionados y enfermos (Assady et al., 2001; Jacobson et al., 2001; Odorico et al., 2001). Sin embargo, los tejidos derivados de ESCs tienen limitaciones clínicas. Debido a que las ESCs derivan necesariamente de otro individuo, es decir, un embrión, existe el riesgo de que el sistema inmunitario del receptor rechace el material biológico nuevo. Aunque hay disponibles fármacos inmunodepresores para evitar dicho rechazo, se sabe que tales fármacos también bloquean respuestas inmunitarias deseables, tales como hacia las infecciones bacterianas y virus. Además, el debate ético sobre la fuente de las ESCs, es decir, los embriones, está bien documentado y presenta un obstáculo adicional y, quizás, insuperable para un futuro previsible.

45 Las células madre de adulto (denominadas de forma intercambiable "ASCs" más adelante en la presente memoria) representan una alternativa al uso de ESCs. Las ASCs residen discretamente en muchos tejidos no embrionarios, supuestamente esperando para responder a traumatismos u otros procesos patológicos destructivos, de manera que puedan curar el tejido lesionado (Arvidsson et al., 2002; Bonner-Weir y Sharma, 2002; Clarke y Frisen, 2001; Crosby y Strain, 2001; Jiang et al., 2002a). Notablemente, las pruebas científicas emergentes indican que cada individuo porta un grupo de ASCs que pueden compartir con las ESCs la capacidad de convertirse en muchos, si no en todos, los tipos de células y tejidos (Young et al., 2001; Jiang et al., 2002a; Jiang et al., 2002b; Schwartz et al., 2002). Así, las ASCs, como las ESCs, tienen un potencial enorme para las aplicaciones clínicas de la medicina regenerativa.

55 Se ha demostrado que las poblaciones de ASCs están presentes en uno o más de médula ósea, piel, músculo, hígado y cerebro (Jiang et al., 2002b; Alison, 1998; Crosby y Strain, 2001). Sin embargo, la frecuencia de ASCs en estos tejidos es baja. Por ejemplo, se estima que la frecuencia de las células madre mesenquimatosas en la médula ósea es entre 1 en 100.000 y 1 en 1.000.000 de células nucleadas (D'Ippolito et al., 1999; Banfi et al., 2001; Falla et al., 1993). De forma similar, la extracción de ASCs de la piel implica una serie complicada de etapas de cultivo celular durante varias semanas (Toma et al., 2001) y la aplicación clínica de ASCs derivadas de músculo esquelético requiere una fase de cultivo de dos a tres semanas (Hagege et al., 2003). Así, cualquier aplicación clínica propuesta

de las ASCs a partir de tales tejidos requiere incrementar el número de células, la pureza y la madurez mediante procedimientos de purificación celular y de cultivo celular.

Aunque las etapas de cultivo celular pueden proporcionar un número de células, pureza y madurez incrementadas, lo hacen con cierto coste. Este coste puede incluir una o más de las siguientes dificultades técnicas: pérdida de la función celular debido al envejecimiento celular, pérdida de poblaciones de células que no son células madre potencialmente útiles, retrasos en la aplicación potencial de las células a los pacientes, coste económico incrementado y riesgo incrementado de contaminación de las células con microorganismos ambientales durante el cultivo. Los estudios recientes que examinan los efectos terapéuticos de ASCs derivadas de médula ósea han usado esencialmente médula ósea completa para evitar los problemas asociados al cultivo celular (Horwitz et al., 2001; Orlic et al., 2001; Stamm et al., 2003; Strauer et al., 2002). Los beneficios clínicos, sin embargo, han sido subóptimos, un resultado relacionado casi con toda seguridad con la dosis y pureza limitadas de las ASCs disponibles intrínsecamente en la médula ósea.

Recientemente, se ha demostrado que el tejido adiposo es una fuente de ASCs (Zuk et al., 2001; Zuk et al., 2002). El documento WO 00/53795 describe células madre derivadas de tejido adiposo y mallas, p.ej. células madre derivadas de tejido adiposo sustancialmente exentas de adipocitos y eritrocitos sanguíneos y poblaciones clonales de células madre de tejido conectivo. Las células se pueden emplear, solas o en composiciones biológicamente compatibles, para generar tejidos y estructuras diferenciadas, tanto *in vivo* como *in vitro*. A diferencia de la médula ósea, la piel, el músculo, el hígado y el cerebro, el tejido adiposo es comparativamente fácil de recoger en cantidades relativamente grandes (Commons et al., 2001; Katz et al., 2001b). Además, se ha mostrado que las ASCs derivadas de tejido adiposo poseen la capacidad de generar múltiples tejidos *in vitro*, lo que incluye hueso, grasa, cartílago y músculo (Ashjian et al., 2003; Mizuno et al., 2002; Zuk et al., 2001; Zuk et al., 2002). Así, el tejido adiposo representa una fuente óptima de ASCs para su uso en la medicina regenerativa. Los métodos adecuados para recoger ASCs derivadas de tejido adiposo, sin embargo, son escasos en la técnica. Los métodos existentes poseen varios defectos. Por ejemplo, los métodos existentes carecen de la capacidad de acomodar de forma óptima un dispositivo de aspiración para la extracción de tejido adiposo. Los métodos existentes también carecen de automatización parcial o completa desde la fase de recogida del tejido adiposo hasta las fases de procesamiento del tejido (Katz et al., 2001a). Los métodos existentes carecen además de capacidad para un volumen mayor de 100 ml de tejido adiposo. Los métodos existentes carecen además de un sistema parcialmente o completamente cerrado desde la fase de recogida del tejido adiposo hasta las fases de procesamiento del tejido. Finalmente, los métodos existentes carecen de la capacidad de eliminación de los componentes para atenuar los riesgos concomitantes de contaminación cruzada del material de una muestra a otra. En resumen, los métodos de la técnica anterior para la recogida de ASCs de tejido adiposo no superan las dificultades técnicas asociadas a la recogida de ASCs de la piel, músculo, hígado y cerebro descrita anteriormente.

Por lo tanto, dado el potencial terapéutico enorme de las ASCs, existe la necesidad urgente en la técnica de un dispositivo, sistema o método para recoger ASCs de tejido adiposo que produzca una población de ASCs con rendimiento, consistencia y/o pureza incrementados, y que lo haga rápidamente y de forma fiable con una necesidad disminuida o inexistente de manipulación post-extracción. De manera ideal, dicho dispositivo, sistema o método produciría ASCs de una manera adecuada para la colocación directa en un receptor. El acceso a dicho dispositivo, sistema o método en combinación con métodos y composiciones que usan ASCs derivadas de tejido adiposo para el tratamiento de enfermedades y trastornos cardiovasculares revolucionaría el tratamiento de tales trastornos. Dada la prevalencia de la enfermedad cardiovascular y la escasez de opciones de tratamientos actuales, dicho tratamiento se necesita urgentemente.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que se pueden usar células madre adultas derivadas de tejido adiposo para tratar afecciones, enfermedades o trastornos cardiovasculares. La presente invención se basa además en el descubrimiento de dispositivos, sistemas y métodos para la preparación de células madre y progenitoras adultas derivadas de tejido adiposo. La presente invención se basa además en el descubrimiento de métodos y composiciones de células madre y progenitoras adultas derivadas de tejido adiposo para tratar afecciones, enfermedades o trastornos cardiovasculares. Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se dirige al uso de una composición que comprende una población concentrada de células derivadas de tejido adiposo (ADC) en la fabricación de un medicamento para restablecer el flujo sanguíneo en un sujeto que se ha determinado que tiene una isquemia, en la que dicha población concentrada de células derivadas de tejido adiposo (ADC) comprende células progenitoras derivadas de tejido adiposo y células madre adiposas obtenidas procesando el tejido adiposo de dicho paciente en un sistema que está configurado para mantener una ruta de fluidos/tejidos cerrada estéril, y dicho sistema comprende una cámara de recogida conectada a una cámara de mezcla/procesamiento.

El procesamiento del tejido adiposo se da en un sistema que mantiene una ruta de fluidos/tejidos cerrada estéril. Esto se consigue mediante el uso de un grupo unido pre-ensamblado de recipientes y tubos cerrados estériles que posibilitan la transferencia de elementos de tejidos y fluidos dentro de una ruta cerrada. Este equipo de procesamiento puede estar asociado a una serie de reactivos de procesamiento (p.ej., solución salina, enzimas, etc.) insertados en un dispositivo que puede controlar la adición de los reactivos, la temperatura, y el tiempo de procesamiento, por lo que libera así a los operadores de la necesidad de controlar manualmente el proceso. En una aproximación

preferida, el procedimiento completo de extracción de tejido por medio del procesamiento y la preparación para la colocación en el receptor se llevaría a cabo en su totalidad en la misma instalación, de hecho, incluso dentro de la misma habitación del paciente que se somete al procedimiento.

5 El tejido adiposo en bruto se puede procesar para eliminar sustancialmente los adipocitos maduros y el tejido conectivo, por lo que se obtiene una diversidad heterogénea de células derivadas de tejido adiposo adecuadas para la colocación en el organismo de un receptor. Las células se pueden preparar para la colocación en el receptor en combinación con otras células, tejidos, fragmentos de tejidos, u otros estimuladores del crecimiento y/o la diferenciación celular. En una realización preferida, las células, con cualquiera de los aditivos anteriormente mencionados, son para la colocación en una persona de la cual se obtuvieron en el contexto de un único procedimiento operativo con la intención de obtener un beneficio terapéutico para el receptor.

10 Las células de la invención se pueden proporcionar mediante el uso del método que incluye las etapas de: a) proporcionar un sistema de extracción de tejido; b) extraer el tejido adiposo de un paciente mediante el uso del sistema de extracción de tejido, y el tejido adiposo tiene una concentración de células madre; c) procesar al menos una parte del tejido adiposo para obtener una concentración de células madre distinta de la concentración de células madre del tejido adiposo antes del procesamiento, para la administración de las células madre y progenitoras a un paciente sin extraer las células madre y progenitoras del sistema de extracción de tejido antes de administrarlas al paciente mediante el uso de varios métodos conocidos para una persona de experiencia habitual en la técnica, que incluyen, pero sin limitación, la vía intravenosa, intracoronaria y endomiocárdica.

15 Un sistema usado por la invención y descrito incluye a) un recipiente de recogida de tejido que incluye i) un orificio de entrada de recogida de tejido estructurado para recibir el tejido adiposo extraído de un paciente; y ii) un filtro dispuesto dentro del recipiente y que está estructurado para retener el tejido adiposo extraído de un paciente y para hacer pasar el tejido no adiposo extraído del paciente; b) un recipiente de mezcla acoplado al recipiente de recogida de tejido para recibir las células madre obtenidas del tejido adiposo sin la extracción de las células madre del sistema de extracción de tejido, y que incluye un orificio de adición para la administración de al menos un aditivo para mezclarlo con las células madre contenidas en él; y c) una salida estructurada para permitir que las células del recipiente de mezcla se extraigan del sistema de recogida de tejido para la administración a un paciente.

20 Cualquier característica o combinación de características descritas en la presente memoria están incluidas dentro del alcance de la presente invención, con tal de que las características incluidas en cualquier combinación no sean mutuamente incoherentes, como será evidente a partir del contexto, esta memoria descriptiva, y el conocimiento de una persona de experiencia habitual en la técnica. Las ventajas y aspectos adicionales de la presente invención son evidentes en la siguiente descripción detallada.

30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 representa un sistema de extracción de tejido para el procesamiento del tejido adiposo.

La Figura 2 representa un recipiente de recogida de tejido del sistema de extracción de tejido de la Fig. 1.

35 La Figura 3 es una vista transversal parcial del recipiente de recogida de tejido de la Fig. 2.

La Figura 4 representa un dispositivo de procesamiento para automatizar el funcionamiento de un sistema de extracción de tejido.

Las Figuras 5A y 5B representan la expresión de la proteína VEGF (5A) y PIGF (5B) en células madre derivadas de tejido adiposo.

40 La Figura 6 representa la detección de células progenitoras endoteliales en poblaciones de células madre derivadas de tejido adiposo.

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

45 La Figura 8 representa el restablecimiento medio incrementado del flujo sanguíneo en ratones con isquemia de las extremidades posteriores tratados con células madre derivadas de tejido adiposo en comparación con un control negativo.

Las Figuras 9A y 9B demuestran que una dosis creciente de células madre derivadas de tejido adiposo mejora la supervivencia del injerto y la angiogénesis (9A), y representan la retención de la arquitectura del tejido adiposo en una muestra histológica (9B).

50 La Figura 10 representa la evolución histológica en el tiempo del injerto de células madre derivadas de tejido adiposo donante en un área de miocardio infartado.

La Figura 11 representa la tinción positiva doble para beta-galactosidasa y cadena pesada de miosina. Las células destacadas exhiben la tinción azul de beta-galactosidasa, que demuestra su origen a partir de las células de tejido

adiposo donante, y la tinción marrón que indica la expresión de la cadena pesada de la proteína muscular cardíaca miosina. Las células que exhiben tinción tanto marrón como azul (tal como se indica mediante las flechas) son células derivadas de tejido adiposo que han adquirido el fenotipo de células musculares cardíacas.

5 La Figura 12 representa grupos de células madre derivadas de tejido adiposo derivadas de donante en una región de miocardio infartado tras una lesión por oclusión/reperfusión en rata.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 La presente invención proporciona, por primera vez, medicamentos de eficacia probada para el tratamiento de afecciones, enfermedades y trastornos cardiovasculares mediante el uso de células madre y progenitoras derivadas de tejido adiposo. Específicamente, la presente invención demuestra, por primera vez, que las células madre y progenitoras derivadas de tejido adiposo de la invención (1) expresan factores de crecimiento angiogénicos y arteriogénicos, que incluyen factor de crecimiento de placenta (PIGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), (2) contienen células progenitoras endoteliales (EPC) que tienen una función bien establecida en la formación de vasos sanguíneos, (3) se desarrollan hasta vasos sanguíneos *in vitro*, (4) apoyan la supervivencia del tejido isquémico *in vivo*, (5) inducen la reperfusión tras una lesión por oclusión/reperfusión en las extremidades posteriores, (6) cuando se inyectan en animales tras una lesión cardíaca se dirigen al corazón, y (7) cuando se inyectan en animales tras una lesión cardíaca se diferencian hasta células que expresan marcadores coherentes con su diferenciación hasta miocitos cardíacos. Por lo tanto, la presente descripción demuestra de manera concluyente que las células madre y progenitoras derivadas de tejido adiposo inventivas de la presente invención son útiles para el tratamiento de enfermedades y trastornos cardiovasculares.

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

25 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "tejido adiposo" se refiere a un tejido que contiene múltiples tipos celulares, que incluyen adipocitos y células microvasculares. El tejido adiposo incluye células madre y células precursoras endoteliales. Por lo tanto, el tejido adiposo se refiere a la grasa, lo que incluye el tejido conectivo que almacena la grasa.

30 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "unidad de tejido adiposo" se refiere a una cantidad discreta o medible de tejido adiposo. Se puede medir una unidad de tejido adiposo determinando el peso y/o el volumen de la unidad. Basándose en los datos identificados anteriormente, una unidad de lipoaspirado procesado, tal como se extrae de un paciente, tiene un componente celular en el que al menos un 0,1% del componente celular son células madre. Con referencia a la descripción de la presente memoria, una unidad de tejido adiposo puede referirse a la cantidad total de tejido adiposo extraída de un paciente, o a una cantidad que es menor que la cantidad total de tejido adiposo extraída de un paciente. Así, una unidad de tejido adiposo se puede combinar con otras unidades de tejido adiposo para formar una unidad de tejido adiposo que tiene un peso o volumen que es la suma de las unidades individuales.

35 Tal como se usa en la presente memoria, el término "porción" se refiere a una cantidad de un material que es menor que el total. Una porción menor se refiere a una cantidad que es menor del 50%, y una porción mayor se refiere a una cantidad mayor del 50%. Así, una unidad de tejido adiposo que es menor de la cantidad total de tejido adiposo extraída de un paciente es una porción del tejido adiposo extraído.

40 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "célula madre" se refiere a células multipotentes que tienen el potencial de diferenciarse hasta una diversidad de otros tipos celulares, que llevan a cabo una o más funciones específicas y que tienen la capacidad de auto-renovarse. Algunas de las células madre descritas en la presente memoria pueden ser pluripotentes.

45 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "célula progenitora" se refiere a células unipotentes, bipotentes, o multipotentes con la capacidad de diferenciarse hasta uno o más tipos celulares, que llevan a cabo una o más funciones específicas y que tienen una capacidad limitada o inexistente de auto-renovarse. Algunas de las células progenitoras descritas en la presente memoria pueden ser pluripotentes.

50 Tal como se usa en la presente memoria, "número de células madre" o "frecuencia de células madre" se refiere al número de colonias observadas en un ensayo clonogénico en el que se siembran en placas células derivadas de tejido adiposo (ADC) a una densidad baja de células (<10.000 células/pocillo) y se cultivan en un medio de cultivo que soporta el crecimiento de MSC (por ejemplo, medio DMEM/F12 complementado con un 10% de suero bovino fetal, 5% de suero de caballo, y agentes antibióticos/antimicóticos. Las células se cultivan durante dos semanas, tras lo cual los cultivos se tiñen con hematoxilina y las colonias de más de 50 células se cuentan como UFC-F. La frecuencia de células madre se calcula como el número de UFC-F observado por 100 células nucleadas sembradas en las placas (por ejemplo; 15 colonias contadas en una placa iniciada con 1.000 células ADC nucleadas proporciona 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 alto porcentaje (~100 %) de las UFC-F cultivadas a partir de células ADC expresan la molécula de superficie celular CD105, que también se expresa en las células madre derivadas de médula ósea (Barry et al., 1999). CD105 también se expresa en las células madre

derivadas de tejido adiposo (Zuk et al., 2002).

Como se usa en la presente memoria, la expresión "lipoaspirado procesado" se refiere al tejido adiposo que se ha procesado para separar el componente celular activo (p.ej., el componente que contiene células madre y progenitoras) de los adipocitos maduros y del tejido conectivo. Esta fracción se denomina en la presente memoria "células derivadas de tejido adiposo" o "ADC". En general, ADC se refiere al sedimento de células obtenido mediante lavado y separación de las células del tejido adiposo. El sedimento se obtiene generalmente centrifugando una suspensión de células, de forma que las células se agregan en el fondo de un recipiente de centrifuga.

Tal como se usa en la presente memoria, la frase "afección, enfermedad o trastorno cardiovascular" pretende incluir todos los trastornos caracterizados por una función cardíaca insuficiente, indeseada o anormal, p.ej., cardiopatía isquémica, cardiopatía hipertensiva y cardiopatía hipertensiva pulmonar, valvulopatía, cardiopatía congénita, y cualquier afección que conduzca a insuficiencia cardíaca congestiva en un sujeto, en particular un sujeto humano. La función cardíaca insuficiente o anormal puede ser el resultado de una enfermedad, lesión y/o envejecimiento. A modo de antecedentes, una respuesta a la lesión miocárdica sigue una ruta bien definida en la que algunas células mueren mientras otras entran en un estado de hibernación en el que todavía no están muertas, pero son disfuncionales. Esto va seguido de infiltración de células inflamatorias y deposición de colágeno como parte de la cicatrización, todo lo cual sucede a la vez que el crecimiento interno de vasos sanguíneos nuevos y cierto grado de muerte celular continuada. Tal como se usa en la presente memoria, el término "isquemia" se refiere a cualquier isquemia tisular localizada debida a la reducción del flujo de entrada de sangre. La expresión "isquemia miocárdica" se refiere a alteraciones circulatorias provocadas por aterosclerosis coronaria y/o aporte de oxígeno inadecuado al miocardio. Por ejemplo, un infarto de miocardio agudo representa una lesión isquémica irreversible del tejido miocárdico. Esta lesión es el resultado de un suceso oclusivo (p.ej., trombótico o embólico) en la circulación coronaria, y produce un medio en el que las necesidades metabólicas miocárdicas superan el aporte de oxígeno al tejido miocárdico.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "angiogénesis" se refiere al proceso mediante el cual se generan vasos sanguíneos nuevos a partir de la vasculatura y el tejido existentes (Folkman, 1995). La frase "reparar o remodelar" se refiere a la reforma de la vasculatura existente. El alivio de la isquemia tisular depende de forma crítica de la angiogénesis. El crecimiento espontáneo de vasos sanguíneos nuevos proporciona una circulación colateral en y alrededor de un área isquémica, mejora el flujo sanguíneo y alivia los síntomas provocados por la isquemia. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "factor angiogénico" o "proteína angiogénica" se refiere a cualquier proteína conocida capaz de estimular el crecimiento de vasos sanguíneos nuevos a partir de la vasculatura existente ("angiogénesis"). Los factores angiogénicos adecuados para su uso en la invención incluyen, pero sin limitación, Factor de Crecimiento Placentario (Luttun et al., 2002), Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos (Aharinejad et al., 1995), Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos y Granulocitos (Buschmann et al., 2003), Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)-A, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (Mints et al., 2002), neuropilina (Wang et al., 2003), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)-1, FGF-2(bFGF), FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6 (Botta et al., 2000), Angiopoietina 1, Angiopoietina 2 (Sundberg et al., 2002), eritropoietina (Ribatti et al., 2003), BMP-2, BMP-4, BMP-7 (Carano y Filvaroff, 2003), TGF-beta (Xiong et al., 2002), IGF-1 (Shigematsu et al., 1999), Osteopontina (Asou et al., 2001), Pleiotropina (Beecken et al., 2000), Activina (Lamouille et al., 2002), Endotelina-1 (Bagnato y Spinella, 2003) y combinaciones de los mismos. Los factores angiogénicos pueden actuar de forma independiente, o en combinación entre sí. Cuando están en combinación, los factores angiogénicos pueden actuar también de forma sinérgica, por lo que el efecto combinado de los factores es mayor que la suma de los efectos de los factores individuales tomados por separado. La expresión "factor angiogénico" o "proteína angiogénica" también abarca los análogos funcionales de tales factores. Los análogos funcionales incluyen, por ejemplo, las porciones funcionales de los factores. Los análogos funcionales también incluyen anticuerpos anti-idiotípicos que se unen a los receptores de los factores y, así, imitan la actividad de los factores en la estimulación de la angiogénesis y/o la remodelación de los tejidos. Los métodos para generar tales anticuerpos anti-idiotípicos 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 se pueden producir de forma sintética o mediante expresión recombinante. Los factores se pueden administrar a pacientes en forma de una composición proteica. De manera 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.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "arteriogénesis" se refiere al proceso de aumentar el crecimiento de arterias colaterales y/u otras arterias a partir de conexiones arteriolares preexistentes (Carmeliet, 2000; Scholz et al., 2001; Scholz et al., 2002). Más en particular, la arteriogénesis es el reclutamiento *in situ* y la expansión de arterias mediante la proliferación de las células musculares lisas y endoteliales a partir de las conexiones arteriolares preexistentes que suministran sangre al tejido isquémico, tumor o sitio de inflamación. Estos vasos crecen principalmente fuera del tejido afectado y son importantes para el suministro de nutrientes en la zona isquémica, el tumor o el sitio de inflamación. La arteriogénesis es parte de la respuesta normal a la isquemia miocárdica (Mills et al., 2000; Monteiro et al., 2003). Además, la técnica quirúrgica habitual de un injerto de derivación aortocoronaria

(CABG) es, en efecto, nada más que la creación de un vaso colateral artificial (Sergeant et al., 1997). Así, los procesos que favorecen la arteriogénesis tras un infarto mejorarán el flujo sanguíneo al tejido isquémico, lo que da como resultado una muerte celular disminuida y un tamaño de infarto disminuido. Estas mejoras darán como resultado una función cardíaca mejorada y un beneficio terapéutico.

5 Tal como se usa en la presente memoria, el término "tratar" incluye reducir o aliviar al menos un efecto adverso o síntoma de una afección, enfermedad o trastorno cardiovascular, es decir, cualquier trastorno caracterizado por una función cardíaca insuficiente o indeseada. Los efectos adversos o síntomas de los trastornos cardíacos son muy conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, disnea, dolor torácico, palpitaciones, mareos, síncope, edema, cianosis, palidez, fatiga y muerte.

10 Tal como se usan en la presente memoria, los términos "administrar", "introducir" y "trasplantar" se usan de forma intercambiable en la presente memoria, y se refieren a la colocación de las ADC de la invención en un sujeto mediante un método o vía que da como resultado al menos la localización parcial de las ADC en un sitio deseado. Las ADC se pueden administrar mediante cualquier ruta adecuada que dé como resultado el suministro en una localización deseada en el sujeto, en la que al menos una porción de las células o componentes de las células siguen siendo viables. El periodo de viabilidad de las células tras la administración a un sujeto puede ser tan corto como unas pocas horas, p.ej., veinticuatro horas, hasta varios días, o tan largo como varios años.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "sujeto" incluye animales de sangre caliente, preferentemente mamíferos, lo que incluye seres humanos. En una realización preferida, el sujeto es un primate. En una realización aún más preferida, el sujeto es un ser humano.

20 Ahora se hará referencia en detalle a las realizaciones actualmente preferidas de la invención, cuyos ejemplos se ilustran en las Figuras adjuntas. Siempre que sea posible, se usan los mismos o similares números de referencia en los dibujos y la descripción para referirse a las mismas partes o a partes similares. Se debería indicar que los dibujos están en una forma simplificada, y no están a una escala precisa. En referencia a la descripción de la presente memoria, por comodidad y claridad únicamente, los términos direccionales, tales como parte superior, parte inferior, izquierda, derecha, arriba, abajo, sobre, por encima, debajo, por debajo, parte trasera y parte frontal, se usan con respecto a los dibujos adjuntos. No se debería interpretar que tales términos direccionales limiten el alcance de la invención de ninguna manera.

Aunque la descripción de la presente memoria se refiere a ciertas realizaciones ilustradas, se debe entender que estas realizaciones se presentan a modo de ejemplo, y no a modo de limitación. Se debe considerar que la intención de la siguiente descripción detallada, aunque trata las realizaciones ejemplares, cubre todas las modificaciones, alternativas y equivalentes de las realizaciones que se pueden hallar dentro del espíritu y del alcance de la invención, tal como se define mediante las reivindicaciones adjuntas. La presente invención se puede poner en práctica junto con diversas técnicas de separación de células o tejidos que se usan convencionalmente en la técnica, y en la presente memoria se incluyen solamente tantas etapas de los procesos puestos en práctica habitualmente como sean necesarias para facilitar el entendimiento de la presente invención.

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se dirige al uso de una composición que comprende una población concentrada de células derivadas de tejido adiposo (ADC) en la fabricación de un medicamento para restablecer el flujo sanguíneo en un sujeto que se ha determinado que tiene una isquemia, en el que dicha población concentrada de células derivadas de tejido adiposo (ADC) comprende células progenitoras derivadas de tejido adiposo y células madre adiposas obtenidas procesando el tejido adiposo de dicho paciente en un sistema que está configurado para mantener una ruta de fluidos/tejidos cerrada estéril, y dicho sistema comprende una cámara de recogida conectada a una cámara de mezcla/procesamiento. Las células de la población se pueden administrar a un paciente que padece una enfermedad o trastorno cardiovascular sin otros adipocitos o tejido conectivo.

En particular, la presente invención se dirige al uso de una composición que comprende una población concentrada de células derivadas de tejido adiposo para la preparación de un medicamento para minimizar la lesión y estimular la reparación y la regeneración miocárdica durante este proceso. Estas incluyen, entre otras: la capacidad de sintetizar y secretar factores de crecimiento que estimulan la formación de vasos sanguíneos nuevos; la capacidad de sintetizar y secretar factores de crecimiento que estimulan la supervivencia y la proliferación celular; la capacidad de proliferar y diferenciarse hasta células que participan directamente en la formación de vasos sanguíneos nuevos; la capacidad de realizar un injerto en el miocardio lesionado e inhibir la cicatrización (deposición y reticulación de colágeno); la capacidad de proliferar y diferenciarse hasta células musculares capaces de contribuir a la contractilidad miocárdica; y la capacidad de proliferar y diferenciarse hasta células miocárdicas.

I. Métodos descritos en la presente memoria

1. Métodos de Obtención de un Lipoaspirado Procesado (ADC)

55 Se ha descubierto que el tejido adiposo es una fuente especialmente rica de células madre y progenitoras. Este hallazgo puede ser debido, al menos en parte, a la facilidad de eliminación del componente mayoritario que no es de células madre del tejido adiposo, el adipocito. Así, tanto en estudios en seres humanos como en animales, el lipoaspirado procesado (ADC) contiene células madre con una frecuencia de al menos un 0,1%, y más en general más de

un 0,5%. En ciertas realizaciones de la invención, se han obtenido ADC que contienen alrededor de un 2-12% de células madre. En otras realizaciones adicionales, las ADC se procesan para obtener una población de células en la que las células madre constituyen hasta un 100% de las células de la población. La pureza/frecuencia de las células madre obtenidas de acuerdo con la invención descrita en la presente memoria es sustancialmente mayor que la frecuencia publicada de 1 en 100.000 (0,001%) en médula ósea (D'Ippolito et al., 1999; Banfi et al., 2001; Falla et al., 1993; Muschler et al., 2001). Además, la recogida de tejido adiposo está asociada a una morbilidad menor que la recogida de un volumen similar de médula ósea (Nishimori et al., 2002). Además, el tejido adiposo contiene células precursoras endoteliales, que son capaces de proporcionar una terapia a los pacientes (véase (Asahara et al., 1999; Kaushal et al., 2001; Kawamoto et al., 2003; Kawamoto et al., 2001)).

Las células que son para la administración a un paciente se obtienen del tejido adiposo. El tejido adiposo se puede obtener mediante cualquier método conocido para una persona de experiencia habitual en la técnica. Por ejemplo, se puede extraer el tejido adiposo de un paciente mediante lipoplastia asistida por succión, lipoplastia asistida por ultrasonidos, y lipectomía de escisión. Además, los procedimientos pueden incluir una combinación de tales procedimientos, tal como una combinación de lipectomía de escisión y lipoplastia asistida por succión. Debido a que el tejido o cierta fracción del mismo se destina a la re-implantación en un paciente, el tejido adiposo se debería recoger de una manera que preserve la viabilidad del componente celular y que minimice la probabilidad de contaminación del tejido con organismos potencialmente infecciosos, tales como bacterias y/o virus. Así, la extracción del tejido se debería llevar a cabo de una manera estéril o aséptica para minimizar la contaminación. Puede ser deseable la lipoplastia asistida por succión para extraer el tejido adiposo de un paciente, ya que proporciona un método mínimamente invasivo de recogida del tejido con una probabilidad mínima de lesión de las células madre que puede estar asociada a otras técnicas, tales como la lipoplastia asistida por ultrasonidos.

Para los procedimientos lipoplásticos asistidos por succión, el tejido adiposo se recoge mediante la inserción de una cánula en o cerca de un depósito de tejido adiposo presente en el paciente, seguido por la aspiración del tejido adiposo hasta un dispositivo de succión. Se puede acoplar una cánula pequeña a una jeringa, y el tejido adiposo se puede aspirar mediante el uso de una fuerza manual (Asken, 1990). Mediante el uso de una jeringa o de otro dispositivo similar puede ser deseable recoger cantidades relativamente moderadas de tejido adiposo (p.ej., de 0,1 ml a varios cientos de mililitros de tejido adiposo). Los procedimientos que emplean estos dispositivos relativamente pequeños tienen la ventaja de que los procedimientos se pueden llevar a cabo con anestesia local solamente, en vez de anestesia general. Los volúmenes mayores de tejido adiposo por encima de este intervalo (p.ej., más de varios cientos de mililitros) pueden requerir anestesia general según el criterio del donante y de la persona que lleva a cabo el procedimiento de recogida. Cuando se desea extraer volúmenes mayores de tejido adiposo, se pueden emplear cánulas relativamente mayores y dispositivos de succión automatizados en el procedimiento (Commons et al., 2001).

Los procedimientos de lipectomía de escisión incluyen, y sin limitación, los procedimientos en los que se extraen tejidos que contienen tejido adiposo (p.ej., piel) como parte secundaria del procedimiento; es decir, en los que el propósito principal de la cirugía es la extracción de tejido (p.ej., piel en la cirugía bariátrica o cosmética) y en los que se extrae el tejido adiposo junto con el tejido de interés principal.

El tejido adiposo que se obtiene de un paciente se recoge en un dispositivo para su procesamiento adicional. Tal como se discute en la presente memoria, el dispositivo está diseñado y dedicado al propósito de recoger tejido para la fabricación de una población celular de tejido adiposo procesado, que incluye células madre y/o células precursoras endoteliales. El dispositivo puede ser cualquier dispositivo convencional para la recogida de tejido que usan en general los médicos que llevan a cabo el procedimiento de extracción.

La cantidad de tejido recogido dependerá de varias variables que incluyen, pero sin limitación, el índice de masa corporal del donante, la disponibilidad de sitios para la recogida de tejido adiposo accesibles, las medicaciones y afecciones concomitantes y pre-existentes (tales como la terapia anticoagulante), y el propósito clínico para el que se recoge el tejido. La experiencia con el trasplante de células madre hematopoyéticas (células madre derivadas de médula ósea o de sangre de cordón umbilical usadas para regenerar la capacidad de formación de células sanguíneas del receptor) demuestra que el injerto depende de la dosis de células con efectos de umbral (Smith y Sweetenham, 1995; Barker et al., 2001). Así, es probable que el principio general de "más es mejor" se aplique dentro de los límites establecidos por otras variables, y que cuando sea factible la recogida recolecte tanto tejido como sea posible.

Se ha descubierto que el porcentaje de células madre de 100 ml de tejido adiposo extraído de un individuo delgado es mayor que el extraído de un donante obeso (Tabla 1). Esto refleja un efecto de dilución del contenido de grasa incrementado en el individuo obeso. Por lo tanto, puede ser deseable obtener cantidades mayores de tejido de donantes con sobrepeso en comparación con las cantidades que se extraerían de pacientes más delgados. Esta observación también indica que la utilidad de esta invención no se limita a individuos con grandes cantidades de tejido adiposo.

Tabla 1: Efecto del Índice de Masa Corporal sobre el Rendimiento Tisular y Celular

Estado del Índice de Masa Corporal	Cantidad de Tejido Obtenido (g)	Rendimiento Celular Total (x10 ⁷)
Normal	641 ± 142	2,1 ± 0,4
Obeso	1.225 ± 173	2,4 ± 0,5
Valor de p	0,03	0,6

5 Las células madre concentradas pueden ser para la administración de una composición que comprende células madre derivadas de tejido adiposo y/o células precursoras endoteliales sustancialmente exentas de adipocitos maduros y tejido conectivo. En ciertas realizaciones, la composición tiene un componente celular en el que al menos un 0,1 % de las células son células madre. En otras realizaciones, la composición tiene un componente celular en el que las células madre comprenden entre alrededor del 2% y el 12% del componente celular. Las concentraciones mayores de células madre, tales como hasta un 100%, también se incluyen en composiciones diferentes. La composición puede incluir componentes adicionales, tales como factores de diferenciación celular, estimuladores del cultivo, agentes inmunodepresores, o dispositivos médicos, tal como se discute en la presente memoria. Para obtener 10 ciertas composiciones en las que la composición contiene principalmente un tipo de célula (p.ej., células madre derivadas de tejido adiposo o células precursoras endoteliales derivadas de tejido adiposo), se puede emplear cualquier método adecuado para la separación de los diferentes tipos de células, tal como el uso de anticuerpos específicos de células que reconocen y se unen a antígenos presentes en las células madre o en las células precursoras endoteliales.

15 Para la mayoría de aplicaciones, la preparación de la población celular activa requerirá la eliminación del componente de adipocitos maduros cargados de grasa del tejido adiposo. Esto se lleva a cabo en general mediante una serie de etapas de lavado y de disgregación, en las que primero se lava el tejido para reducir la presencia de lípidos libres (liberados por los adipocitos rotos) y de elementos de la sangre periférica (liberados por los vasos sanguíneos cortados durante la recogida del tejido), y después se disgregan para liberar los adipocitos intactos y otras poblaciones celulares de la matriz de tejido conectivo. En ciertas realizaciones, se separa todo el componente de adipocitos, o componente de células que no son células madre, del componente de células madre del tejido adiposo. En otras 20 realizaciones, solamente se separa una porción o porciones del componente de adipocitos de las células madre. Así, en ciertas realizaciones, las células madre se pueden administrar con células precursoras endoteliales.

25 El lavado es una etapa opcional, pero preferida, en la que el tejido se mezcla con disoluciones para eliminar mediante lavado los lípidos libres y los componentes celulares individuales, tales como los componentes de la sangre, dejando fragmentos intactos de tejido adiposo. En una realización, el tejido adiposo que se extrae del paciente se mezcla con solución salina isotónica u otra(s) solución(es) fisiológica(s) (p.ej., Plasmalyte®, de Baxter Inc. o Normoso® de Abbott Labs). Los fragmentos de tejido adiposo intactos se pueden separar de los lípidos libres y de las células mediante cualquier medio conocido para las personas de experiencia habitual en la técnica, que incluyen, 30 pero sin limitación, la filtración, decantación, sedimentación o centrifugación. En la realización ilustrada de la invención, el tejido adiposo se separa del tejido no adiposo empleando un filtro dispuesto en un recipiente de recogida de tejidos, tal como se discute en la presente memoria. En otras realizaciones, el tejido adiposo se separa del tejido no adiposo mediante el uso de un recipiente de recogida de tejidos que utiliza la decantación, sedimentación, y/o técnicas de centrifugación para separar los materiales.

35 Los fragmentos de tejido intacto se disgregan después mediante el uso de cualquier técnica o método convencional, que incluye la fuerza mecánica (fuerzas de rotura o cizallamiento), digestión enzimática con enzimas proteolíticas simples o combinadas, tales como colagenasa, tripsina, lipasa, liberasa H1, o miembros de la familia de Blendzyme tal como se describe en la pat. de EE.UU. nº 5.952.215, y pepsina, o una combinación de métodos mecánicos y 40 enzimáticos. Por ejemplo, el componente celular de los fragmentos de tejido intactos se puede disgregar mediante métodos que usan la disociación mediada por colagenasa del tejido adiposo, similar a los métodos para recoger células endoteliales microvasculares en el tejido adiposo, tal como se describió en la patente de EE.UU. nº 5.372.945. Los métodos adicionales mediante el uso de colagenasa que se pueden usar se describen en la patente de EE.UU. nº 5.830.714 y 5.952.215, y Williams et al., 1995 (Williams et al., 1995). De forma similar, se puede usar una proteasa neutra en vez de colagenasa, tal como se describió en (Twentyman y Yuhas, 1980). Además, los métodos 45 pueden emplear una combinación de enzimas, tal como una combinación de colagenasa y tripsina, como se describió en (Russell et al., 1976); o una combinación de una enzima, tal como tripsina, y disociación mecánica, como se describió en (Engelholm et al., 1985).

50 La población de células activas (lipoaspirado procesado) se puede obtener después a partir de los fragmentos de tejido disgregados reduciendo la presencia de adipocitos maduros. Una suspensión del lipoaspirado procesado y del líquido en el que se disgregó el tejido adiposo se hace pasar después a otro recipiente, tal como un recipiente de recogida de células. La suspensión puede fluir a través de uno o más conductos al recipiente de recogida de células

mediante el uso de una bomba, tal como una bomba peristáltica, que extrae la suspensión del recipiente de recogida de tejido y la impulsa hacia el recipiente de recogida de células. Otras realizaciones pueden emplear el uso de la gravedad o del vacío a la vez que se mantiene un sistema cerrado. La separación de las células de la suspensión se puede llevar a cabo mediante sedimentación por densidad de flotación, centrifugación, elutriación, filtración, adherencia diferencial a, y elución desde, restos en fase sólida, selección mediada por anticuerpos, diferencias de carga eléctrica; microesferas inmunomagnéticas, separación celular activada por fluorescencia (FACS), u otros medios. Los ejemplos de estas diversas técnicas y dispositivos para llevar a cabo las técnicas se pueden hallar en (Hemstreet et al., 1980; Schweitzer et al., 1995; Gryn et al., 2002; Prince et al., 2002; Watts et al., 2002; Mainwaring y Rowley, 1985; Greenberg y Hammer, 2001) y en las pat. de EE.UU. n.ºs 6.277.060; 6.221.315; 6.043.066; 6.451.207; 5.641.622; y 6.251.295.

En el sistema ilustrado, las células de la suspensión se separan del componente acelular de la suspensión mediante el uso de un filtro de membrana giratorio. En otras realizaciones, las células de la suspensión se separan del componente acelular mediante el uso de una centrífuga. En tal sistema ejemplar, el recipiente de recogida de células puede ser una bolsa flexible que está estructurada para ser colocada en una centrífuga (p.ej., manualmente o mediante un equipo robótico). En otras realizaciones, no se usa una bolsa flexible. Tras la centrifugación, el componente celular forma un sedimento, que después se puede resuspender con una disolución tamponada de manera que las células se pueden hacer pasar a través de uno o más conductos hasta un recipiente de mezcla, tal como se discute en la presente memoria. Los fluidos de resuspensión se pueden proporcionar mediante cualquier medio adecuado. Por ejemplo, se puede inyectar un tampón en un orificio en el recipiente de recogida de células, o el recipiente de recogida de células puede incluir una reserva de tampón que se puede mezclar con el sedimento de células rompiendo la reserva. Cuando se usa un filtro de membrana giratorio, la resuspensión es opcional, ya que las células permanecen en un volumen de líquido después del procedimiento de separación.

Aunque el tejido adiposo se puede disgregar completamente para separar las células activas de los adipocitos maduros y del tejido conectivo, en una de las aplicaciones se puede disgregar sólo parcialmente. Por ejemplo, la disgregación parcial se puede llevar a cabo con una o más enzimas, que se eliminan de al menos una parte del tejido adiposo antes de tiempo, respecto de la cantidad de tiempo que la enzima se dejaría de otra manera para disgregar completamente el tejido. Tal proceso puede requerir menos tiempo de procesamiento.

En una realización particular, el tejido se lava con solución salina isotónica tamponada estéril y se incuba con colagenasa a una concentración de colagenasa, una temperatura, y un tiempo suficientes para proporcionar una disgregación adecuada. En una realización preferida, la enzima colagenasa usada estará aprobada para el uso en seres humanos por las autoridades pertinentes (p.ej., en los EE.UU., la Food and Drug Administration). Las preparaciones de colagenasa adecuadas incluyen colagenasa recombinante y no recombinante. La colagenasa no recombinante se puede obtener de F. Hoffmann-La Roche Ltd, Indianapolis, IN y/o Advance Biofactures Corp., Lynbrook, NY. La colagenasa recombinante también se puede obtener como se describió en la patente de EE.UU. n.º 6.475.764.

En una realización, las disoluciones contienen colagenasa a concentraciones de alrededor de 10 µg/ml a alrededor de 50 µg/ml, y se incuban a una temperatura de alrededor de 30 °C a alrededor de 38 °C durante un tiempo de alrededor de 20 minutos a alrededor de 60 minutos. Estos parámetros variarán de acuerdo con la fuente de la enzima colagenasa, optimizados mediante estudios experimentales, para validar que el sistema es eficaz para extraer las poblaciones de células deseadas en un espacio de tiempo adecuado. Una concentración, tiempo y temperatura preferidas particulares son 20 µg/ml de colagenasa (mezclada con la proteasa neutra dispasa; Blendzyme 1, Roche) incubada durante 45 minutos, a alrededor de 37 °C. Una realización preferida alternativa aplica 0,5 unidades/mL de colagenasa (mezclada con la proteasa neutra termolisina; Blendzyme 3). En una realización especialmente preferida, la enzima colagenasa usada es un material aprobado para uso en seres humanos por las autoridades pertinentes (p.ej., en los EE.UU., la Food and Drug Administration). La colagenasa usada debería estar exenta de microorganismos y contaminantes, tales como endotoxinas.

Tras la disgregación, la población de células activas se puede lavar/aclarar para eliminar los aditivos y/o subproductos del proceso de disgregación (p.ej., colagenasa y lípidos libres recién liberados). La población de células activas se podría concentrar después mediante centrifugación u otros métodos conocidos para las personas de experiencia habitual en la técnica, tal como se discutió anteriormente. Estas etapas de lavado/concentración tras el procesamiento se pueden aplicar por separado o simultáneamente.

En una realización, las células se concentran y la colagenasa se elimina pasando la población celular a través de un sistema de membranas giratorias de flujo continuo o similar, tal como, por ejemplo, el sistema descrito en las patentes de EE.UU. n.ºs 5.034.135; y 5.234.608.

Además de lo anterior, hay muchos métodos post-lavado que se pueden aplicar para purificar adicionalmente la población de células activas. Estos incluyen tanto la selección positiva (seleccionar las células objetivo), como la selección negativa (eliminación selectiva de las células indeseadas), o las combinaciones de los mismos.

En una realización, tras la etapa de lavado celular se inserta en el sistema un material de fase sólida con propiedades adhesivas seleccionadas para posibilitar la adherencia y/o elución diferencial de una subpoblación de células del lipoaspirado procesado. Esta aproximación general se ha llevado a cabo en la transfusión clínica de sangre, en la

que se usan filtros que capturan de manera diferencial los leucocitos para reducir el contenido de leucocitos sanguíneos contaminantes en los eritrocitos transfundidos (Soli et al., 2001). Los filtros de este tipo los distribuye Pall Bedical (Leukogard RS and Purecell RCQ) y Asahi (RS2000). La adherencia diferencial también se ha aplicado a la selección positiva de monocitos (Berdel et al., 1982) y de células madre epidérmicas (Bickenbach y Dunnwald, 2000). En esta realización, el lipoaspirado procesado se haría pasar a través de un material de filtro en condiciones de flujo y tampón predeterminadas para favorecer la adherencia diferencial de las células objetivo y las poblaciones de células indeseadas. Para la selección positiva, el material de filtro y las condiciones permitirían la adherencia preferente de las células objetivo, mientras el material indeseado pasaría libremente a través del filtro y se eliminaría mediante lavado con tampón en exceso. Las células objetivo se eluirían del filtro cambiando condiciones tales como el caudal, el pH, la fuerza iónica, y/o la presencia de cationes necesarios para la adhesión. El material del filtro podría estar en forma de una malla tridimensional, casete empaquetado de partículas pequeñas, fibras huecas u otros mecanismos con un área superficial elevada. En una realización preferida, este dispositivo de filtro sería una parte integral del equipo desechable mostrado en la Figura 1, y se insertaría en el dispositivo mostrado en la Figura 4. Tanto el equipo como el dispositivo tendrían que modificarse ligeramente de los ejemplos mostrados en las figuras especificadas; en la Figura 1 para incluir el filtro y su alojamiento, y en la Figura 4 para posibilitar la inserción del alojamiento del filtro y los tubos (que incluyen válvulas) necesarios para el mantenimiento de una ruta fluida cerrada estéril. De manera alternativa, la cámara de mezcla (Componente 108 de la Figura 4; componente 30 de la Figura 1) se podría sustituir por los adaptadores del dispositivo y el filtro/alojamiento, respectivamente.

Una realización alternativa de esta aproximación de adherencia diferencial incluiría el uso de anticuerpos y/o combinaciones de anticuerpos que reconocen las moléculas superficiales expresadas de manera diferencial en las células objetivo y en las células indeseadas. La selección basada en la expresión de marcadores superficiales celulares específicos (o combinaciones de los mismos) es otra técnica aplicada habitualmente, en la que los anticuerpos están unidos (directamente o indirectamente) a una estructura de soporte de fase sólida (Geiselhart et al., 1996; Formanek et al., 1998; Graepler et al., 1998; Kobari et al., 2001; Mohr et al., 2001). Esta aproximación tiene aplicaciones evidentes tanto en la selección positiva como en la selección negativa, en las que, por ejemplo, se podrían eliminar los leucocitos sanguíneos residuales mediante el uso del anticuerpo CD45). De forma similar, Reyes et al. han aplicado una mezcla compleja de anticuerpos en la selección de una célula progenitora adulta multipotencial a partir de médula ósea humana (Reyes et al., 2001). Por ejemplo, se podría emplear un anticuerpo tal como AP2 (Joyner et al., 1999), que se une de manera específica a las células adipocíticas, para eliminar de manera preferente las células adipocíticas residuales (que incluyen los adipocitos inmaduros y los adipoblastos). La selección positiva se podría aplicar mediante el uso de anticuerpos específicos para la(s) población(es) de célula(s) objetivo. Por ejemplo, Quirici *et al.* han usado anticuerpos hacia el receptor del factor de crecimiento nervioso para enriquecer células madre mesenquimatosas derivadas de médula ósea (Quirici et al., 2002).

En una realización de una aproximación basada en anticuerpos, se añadiría un anticuerpo (por ejemplo AP2) o una mezcla de anticuerpos (por ejemplo AP2, CD3, CD19, CD11b) al lipoaspirado procesado. Un experto en la técnica reconocerá otros muchos anticuerpos y combinaciones de anticuerpos, y estos ejemplos se proporcionan a modo de ejemplo únicamente. Tras la incubación, en condiciones predeterminadas para permitir la unión óptima de estos anticuerpos a sus antígenos afines, las células se lavarían haciéndolas pasar a través del filtro de membrana giratorio u otra realización de la cámara de lavado de células para eliminar el anticuerpo en exceso sin unir. Las células se harían pasar después sobre una estructura de fase sólida similar a la descrita en la realización anterior, pero en la que la fase sólida tiene unido un anticuerpo secundario capaz de proporcionar una unión de afinidad elevada a los anticuerpos primarios ahora unidos a la superficie celular. Las células objetivo, por ejemplo las células madre derivadas de tejido adiposo, pasarían libremente a través de este filtro debido a la ausencia de expresión de los antígenos superficiales celulares reconocidos por el anticuerpo seleccionado (mezcla de anticuerpos), por lo que se crearía un sistema de selección negativa. En este sistema, el equipo desechable (Figura 3) y el dispositivo (Figura 4) se someterían a modificaciones menores muy similares a las descritas en la realización anterior.

Se podría llevar a cabo una realización de selección positiva mediada por anticuerpos de una manera muy similar incluyendo un tercer aditivo que facilite la separación de las células del soporte de fase sólida. En esta realización, se podría añadir la enzima papaína o quimopapaína para escindir las moléculas de anticuerpo y liberar las células del soporte de fase sólida (Civin et al., 1990). Otra alternativa sería el uso de péptidos específicos que competirían con el antígeno de la superficie celular por la unión a los anticuerpos, tal como describió Tseng-Law et al., patente en EE.UU. nº 6.017.719.

En otra realización, se podría resuspender el sedimento celular, aplicarlo sobre (o bajo) un material fluido formado en un gradiente de densidad continuo o discontinuo y colocarlo en una centrífuga para la separación de las poblaciones celulares basándose en la densidad celular. Los ejemplos de medios adecuados para la formación de tales gradientes incluyen Percoll y Ficoll-Paque (Qian et al., 1998) (Smits et al., 2000) o Ficoll-Paque (Lehner y Holter, 2002; Van, V et al., 2001). Esta realización sería capaz de separar ciertas poblaciones de células sanguíneas residuales y adipocitos inmaduros (pre-adipocitos) de la población de células.

En una realización similar, también se pueden emplear aproximaciones de flujo continuo tales como aféresis (Smith, 1997), y elutriación (con o sin contracorriente) (Lasch et al., 2000) (Ito y Shinomiya, 2001). Tales mecanismos se han usado para fraccionar células sanguíneas, lo que incluye la separación de eritrocitos sanguíneos basándose en la edad (Lasch et al., 2000), y la aplicación de esta aproximación general a la purificación adicional de células de inte-

rés del lipoaspirado procesado será evidente para un experto en la técnica. Esta realización puede requerir la modificación del dispositivo de la Figura 4 y el equipo desechable (Figura 3) de forma que el dispositivo estaría integrado con un segundo dispositivo que proporcionaría la capacidad de aféresis o de elutriación.

La adherencia al plástico, seguida por un corto periodo de expansión celular, también se ha aplicado en poblaciones de células madre de adulto derivadas de médula ósea (Jaiswal et al., 2000). Esta aproximación usa condiciones de cultivo para expandir de manera preferente una población, mientras otras poblaciones se mantienen (y por lo tanto se reducen por dilución con las células seleccionadas en crecimiento) o se pierden debido a la ausencia de condiciones de crecimiento necesarias. Sekiya et al. han descrito condiciones que se podrían emplear a este respecto para células madre derivadas de médula ósea (Sekiya et al., 2002). Esta aproximación (con o sin adherencia diferencial al plástico de cultivo de tejidos) se podría aplicar a una realización adicional de esta invención. En esta aproximación las células se extraen del dispositivo mostrado en la Figura 4 y se colocan en un segundo dispositivo que proporciona el componente de cultivo celular. Este podría estar en forma de un incubador de cultivo de tejidos de laboratorio convencional o un dispositivo de tipo biorreactor tal como el descrito por Tsao et al., patente de EE.UU. n° 6.001.642, o por Armstrong et al., patente de EE.UU. n° 6.238.908. En una realización alternativa, el componente de mezcla (componente 108 del dispositivo mostrado en la Figura 4; componente 30 en la Figura 3) se podría sustituir por un componente de biorreactor que posibilita la adherencia y/o el cultivo celular a corto plazo del lipoaspirado procesado. Esta aproximación alternativa permitiría la integración del componente de biorreactor en el dispositivo, y eliminaría la necesidad de extraer las células de este dispositivo y su colocación en otro.

i. Método Ilustrado para Obtener un Lipoaspirado Procesado

Se ilustra un ejemplo de un sistema de extracción de tejido para extraer el tejido adiposo de un paciente en la Fig. 1. En una aplicación amplia del sistema usado por la invención, el sistema de extracción de tejido 10 incluye un recipiente de recogida de tejido 12 y un recipiente de mezcla 30 acoplado al recipiente de recogida de tejido 12. El acoplamiento entre el recipiente de mezcla 30 y el recipiente de recogida de tejido 12 define preferiblemente un sistema cerrado en el que el tejido que se dirige desde el recipiente de recogida de tejido 12 hacia el recipiente de mezcla 30 no se expone al medio externo. El sistema 10 también incluye una salida 32 que está estructurada para permitir que las células madre concentradas se extraigan del sistema de recogida de tejido 10 para ser administradas a un paciente. El recipiente de recogida de tejido 12 incluye un orificio de entrada de recogida de tejido 14 y un filtro 16. El filtro 16 está dispuesto dentro del recipiente, y está estructurado para retener el tejido adiposo y dejar pasar el tejido no adiposo a medida que, por ejemplo, los tejidos se extraen del paciente. Más específicamente, el filtro 16 permite el paso de lípidos libres, sangre, y solución salina, a la vez que retiene fragmentos de tejido adiposo durante, o en otra realización después de, la recogida inicial del tejido adiposo. A este respecto, el filtro 16 incluye una diversidad de poros, de tamaños iguales o diferentes, pero que oscilan en un tamaño de alrededor de 20 μm a 5 mm. En un sistema preferido, el filtro es una malla de poliéster de calidad médica de un grosor de alrededor de 200 μm , con un tamaño de poro de alrededor de 265 μm y alrededor de un 47% de área expuesta. Este material mantiene el tejido durante el lavado, pero permite que las células pasen a través de la malla tras la disgregación del tejido. Así, cuando los tejidos se aspiran del paciente, el tejido no adiposo se puede separar del tejido adiposo. El recipiente de mezcla 30 incluye un orificio de aditivo 31 que está estructurado para permitir que un usuario administre un aditivo al recipiente de mezcla 30 para mezclarlo con las células madre contenidas en el recipiente de mezcla 30. En un sistema preferido, las dimensiones del recipiente de recogida de tejido 12 deberían ser adecuadas para permitir la retención de aproximadamente 1 litro de fragmentos de tejido dentro del filtro. En otros sistemas, el recipiente de recogida de tejido 12 puede tener un tamaño para albergar un volumen mayor o menor de fragmentos de tejido; por ejemplo, el recipiente de recogida de tejido puede tener un tamaño para almacenar al menos 100 mL de fragmentos de tejido adiposo, y hasta alrededor de 2 L de fragmentos de tejido adiposo.

Con respecto a las características adicionales presentes en el sistema 10 de la Fig. 1, el orificio de entrada de tejido 14 está acoplado a una cánula 24 por medio de un tubo 22 para definir un tubo de extracción de tejido. En la realización ilustrada, la cánula 24 es una cánula de liposucción integrada de un único uso, y el tubo es un tubo flexible. La cánula tiene unas dimensiones adecuadas para ser insertada en un paciente para extraer el tejido adiposo del paciente. El tubo 22 usado en el sistema debería ser capaz de resistir la presión negativa asociada a la lipoplastia asistida por succión para reducir la probabilidad de su colapso. El recipiente de recogida de tejido 12 también incluye un orificio de aspiración 18 dispuesto en el lado opuesto del filtro 16 respecto del orificio de entrada de tejido 14. El orificio de aspiración 18 está estructurado para acoplarse a un dispositivo de succión 20, que se puede hacer funcionar de manera manual o automática. El dispositivo de succión 20 puede ser una jeringa o puede ser un dispositivo de vacío eléctrico, entre otras cosas. El dispositivo de succión 20 debería ser capaz de proporcionar una presión negativa suficiente al recipiente 12 y la cánula 24 para aspirar el tejido de un paciente. Tal como se ilustra, el dispositivo de succión 20 está acoplado a un orificio de aspiración 18 por medio del tubo 22.

También se ilustra que el sistema de extracción de tejido 10 incluye un recipiente de recogida de células 26 colocado entre el recipiente de recogida de tejido 12 y el recipiente de mezcla 30. El recipiente de recogida de células 26 está colocado en el sistema 10 de manera que las células, tales como células madre, pasan desde el recipiente de recogida de tejido 12 al recipiente de recogida de células 26 antes de pasar al recipiente de mezcla 30. En el sistema ilustrado, el recipiente de recogida de células 26 está acoplado al recipiente de recogida de tejido 12 por medio del orificio de recogida de células 48. En una versión del sistema 10, el recipiente de recogida de células 26 incluye un concentrador de células (no mostrado) que facilita la separación de las células en una suspensión. Un ejemplo de un

concentrador de células es un dispositivo de centrífuga que puede separar las células de otros materiales basándose, por ejemplo, en el tamaño o la densidad de las células. Otro ejemplo es un filtro de membrana giratorio, tal como se discutió anteriormente. También se ilustra que el sistema 10 incluye un filtro 28 estructurado para dejar pasar las células desde el recipiente de recogida de células 26 hasta el recipiente de mezcla 30, y para impedir el paso del material que es, por ejemplo, mayor que las células. El recipiente de recogida de células 26 también incluye una salida hacia el recipiente de residuos 36. La dirección del flujo del material contenido en el recipiente de recogida de células 26 está determinada por la posición de una o más válvulas que pueden controlar si el material fluye hacia el recipiente de residuos 36 o hacia el recipiente de mezcla 30.

En el sistema ilustrado, el filtro de células 28 comprende una diversidad de poros que tienen un diámetro o longitud menor de 200 μm . En ciertos sistemas, los poros pueden tener diámetros que son menores de 200 μm . En otros sistemas, los poros pueden tener diámetros entre 20 y 200 μm . El filtro de células 28 puede estar separado del recipiente de recogida de células 26 o puede estar contenido dentro del recipiente de recogida de células 26. El filtro de células 28 también puede formar parte integrante del recipiente de recogida de células 26. Los sistemas adicionales del sistema 10 no incluyen el filtro 28. El recipiente de recogida de células puede estar fabricado de cualquier material adecuado. Por ejemplo, el recipiente de recogida de células 26 puede ser una bolsa de plástico, tal como las usadas de manera convencional en el procesamiento de sangre en los bancos de sangre; o en otros sistemas puede ser estructuralmente regida. En ciertos sistemas, el recipiente de recogida de células 26 puede incluir una cámara de preparación de componentes y una cámara de lavado/separación de células.

En ciertos sistemas, la cámara de preparación de componentes incluye uno o más orificios para la adición de agentes que mejoran el proceso de separación de las células madre para la administración a un paciente, tales como factores de crecimiento o tampones para resuspender las células, como se discutió anteriormente. En estos sistemas, la cámara de preparación de componentes incluye preferiblemente un dispositivo de mezcla para mezclar o agitar las células y aditivos en el recipiente. La cámara de preparación de componentes incluye también uno o más orificios para extraer las células recogidas en ella. Se puede proporcionar un orificio para hacer pasar las células hacia el recipiente de mezcla 30. Se pueden proporcionar otros orificios para dirigir las células, o una porción de las células, hacia otros objetivos, tales como materiales para implantes, que incluyen fragmentos óseos, o hacia dispositivos de cultivo o purificación de células. En un sistema, la cámara de lavado/separación de células incluye un componente de filtro de membrana giratorio, que se puede usar como concentrador de células además de, o preferiblemente, como alternativa a, un dispositivo de centrífuga.

También se ilustra que el sistema 10 incluye un tubo de recuperación de tejido 34 que está colocado para proporcionar un conducto desde el recipiente de recogida de tejido 12 hasta el recipiente de mezcla 30. Así, la tubería de recuperación de tejido 34 hace pasar o dirige el tejido contenido dentro del recipiente de recogida de tejido 12 hacia el recipiente de mezcla 30, en el que el tejido se puede mezclar con células obtenidas desde un recipiente de recogida de células 26. En el sistema ilustrado, el tubo de recuperación de tejido 34 se prolonga en el recipiente de tejido 12 para extraer el tejido adiposo que está contenido en el filtro 16. El tejido se hace pasar o se dirige a través del tubo de recuperación de tejido 34 mediante el uso de una o más bombas o dispositivos de succión para hacer pasar el tejido adiposo que se ha lavado, pero que no se ha disgregado necesariamente.

En un sistema, el sistema 10 incluye un dispositivo de control de la temperatura que está colocado con respecto al sistema 10 para ajustar la temperatura del material contenido en el recipiente de recogida de tejido 12. En ciertos sistemas, el dispositivo de control de la temperatura es un calentador, y en otras realizaciones, el dispositivo de control de la temperatura es un enfriador. En los sistemas adicionales, el dispositivo de control de la temperatura puede ser capaz de conmutar entre un calentador y un enfriador. El dispositivo de control de la temperatura puede ser un dispositivo que ajusta la temperatura del tejido adiposo contenido en el recipiente de recogida de tejido 12, o puede ser un dispositivo que está colocado para cambiar la temperatura del fluido que se comunica al recipiente de recogida de tejido 12. Se ha descubierto que el calentamiento del tejido adiposo facilita la disgregación del tejido para aumentar la separación del componente de células activas. Además, en ciertos sistemas es deseable enfriar una porción del tejido, preferiblemente el componente de células activas, para proporcionar una protección a las células. Incluso un enfriamiento suave de las células puede proporcionar una protección adecuada para mejorar la supervivencia celular durante el procesamiento.

Se ilustra que la salida 32 del sistema de extracción de tejido 10 es un componente del recipiente de mezcla 30. En los sistemas adicionales, la salida 32 está alejada del recipiente de mezcla 30. La salida 32 comprende preferiblemente un cierre que mantiene la configuración sellada del sistema de extracción de tejido 10, y, en ciertos sistemas, la salida 32 comprende una membrana impermeable al fluido (p.ej., una membrana que es impermeable a los líquidos y al aire). La salida 32 debería estar estructurada para hacer pasar la composición del recipiente de mezcla 30 a un paciente en condiciones adecuadas. Por ejemplo, si se usa una jeringa para retirar la composición, la salida 32 debería poder alojar la aguja de la jeringa sin comprometer la esterilidad del sistema o de la composición. En los sistemas adicionales, si la salida está acoplada a un dispositivo que está configurado para administrar la composición, pero no para retirar la composición, tal como una cánula que administra la composición aplicando una presión positiva para desplazar la composición a través de la cánula, la salida 32 debería estar configurada para permitir que la composición contenida en el recipiente de mezcla 30 pase a la cánula. En otras versiones del sistema, la salida 32 puede comprender, o puede estar acoplada en forma de sistema cerrado, un dispositivo para administrar la composición, tal como una aguja de una jeringa o una cánula para administrar la composición aplicando una presión posi-

tiva.

También se ilustra que el sistema de extracción de tejido 10 incluye un recipiente de residuos 36 colocado para recoger los residuos del recipiente de recogida de tejido 12. En el sistema ilustrado, el recipiente de residuos 36 también está acoplado y colocado para recibir los residuos del recipiente de recogida de células 26. Se proporciona un recipiente de lavado 38 en comunicación fluida con el tubo de lavado 39 para suministrar un fluido de lavado, tal como solución salina o cualquier otro tampón adecuado, a través del orificio de lavado 46 en el recipiente de recogida 12. El recipiente de recogida de tejido 12 incluye también una entrada de aire 40 para controlar la cantidad de presión dentro del recipiente de recogida de tejido 12. Se proporciona un tubo de aditivo 42 en el recipiente de recogida de tejido 12 para permitir que se añada un aditivo en el recipiente de recogida de tejido 12. Con referencia a los métodos descritos en la presente memoria, el tubo de aditivo 42 se proporciona para suministrar una o más enzimas al recipiente de recogida de tejido 12 para facilitar la separación del componente de células activas del resto del tejido adiposo contenido en el filtro 16. Tal como se ilustra, el tubo aditivo 42 comprende una aguja 44 que se puede usar para recibir la enzima de un recipiente adecuado.

Una versión particular de los componentes del sistema de extracción de tejido 10 se ilustra en las Figs. 2 y 3, en las que los números similares representan partes similares. En el sistema particular de las Figs. 2 y 3, el recipiente de recogida de tejido 12 incluye un cuerpo que mantiene su forma cuando se aplica la succión al recipiente. Más específicamente, el recipiente de recogida de tejido 12 incluye un cuerpo rígido, por ejemplo, un cuerpo construido de un policarbonato de calidad médica que contiene una bolsa de filtración aproximadamente cónica de un poliéster de calidad médica con un tamaño de malla de 275 μm . El recipiente de recogida de tejido rígido puede tener un tamaño de aproximadamente 20,3 centímetros de altura y aproximadamente 12,7 centímetros de diámetro; el grosor de la pared puede ser de alrededor de 0,3 centímetros. Se accede al interior del cilindro a través de dos orificios para los tubos de succión, dos orificios con tubos para la conexión por medio de una técnica de acoplamiento estériles, y dos orificios para accesos de punción de agujas a través de un tabique de caucho. Se podría conseguir la misma funcionalidad con diferentes materiales, tamaños de malla, y número y tipo de orificios. Por ejemplo, los tamaños de poro de la malla menores de 100 μm o grandes, como de varias micras, conseguirían el mismo propósito de dejar pasar la solución salina y las células sanguíneas a la vez que se retendrían los agregados y fragmentos de tejido adiposo. De forma similar, el propósito del dispositivo se podría llevar a cabo mediante el uso de un material plástico rígido alternativo, mediante la sustitución de la cánula desechable por una cánula estéril multi-uso no desechable, o mediante otras muchas modificaciones que serían conocidas para los expertos en la técnica. Sin embargo, en otras versiones del sistema de extracción de tejido 10, el recipiente de recogida de tejido 12 puede incluir un cuerpo comprimible, tal como una bolsa de recogida de tejido. En tales sistemas, la bolsa se proporciona preferiblemente con un soporte, tal como un armazón interno o externo, que ayuda a reducir la probabilidad de que la bolsa colapse tras la aplicación de succión a la bolsa.

Para reducir la contaminación dentro del sistema de extracción de tejido 10, se puede proporcionar una o más abrazaderas 23 en los diversos tubos o conductos para controlar el flujo de material a través de los tubos hacia los diversos componentes del sistema. Las abrazaderas 23 permiten que un usuario selle de manera eficaz diversas regiones del sistema de extracción de tejido 10. En un sistema preferido, uno o más de los componentes del sistema 10 son desechables. El evitar la reutilización de los componentes en esta realización ayuda a reducir la contaminación que puede estar asociada al uso repetido de diversos componentes. Además, el proporcionar los componentes en un equipo desechable proporciona la ventaja de poder esterilizar todos los componentes a la vez, lo que reduce sustancialmente el tiempo necesario para poner en práctica los métodos descritos en la presente memoria. En las versiones completamente o parcialmente automatizadas del sistema, se pueden aplicar válvulas controladas por computadora además de, o como alternativa a, las abrazaderas 23.

Además, el sistema de extracción de tejido 10 puede incluir dispositivos o componentes adicionales que permiten, entre otras cosas, la determinación del volumen de material retenido en el filtro 16, para permitir registrar información escrita relacionada con el procedimiento de extracción o de procesamiento, o para llevar a cabo otras funciones complementarias tales como el acoplamiento del dispositivo a un soporte o a la cama durante el funcionamiento.

Los componentes del sistema de extracción de tejido 10 deberían estar fabricados de materiales que no sean reactivos con los fluidos o tejidos biológicos, y que no sean reactivos con los agentes usados en el procesamiento de los fluidos y tejidos biológicos. Además, los materiales de los que están fabricados los diversos componentes deberían ser capaces de resistir la esterilización, tal como mediante autoclavado, e irradiación, lo que incluye, pero sin limitación, la irradiación beta o gamma. El tubo y el asa de la cánula pueden estar fabricados de cualquier material adecuado, tal como polietileno. La cánula puede estar fabricada de cualquier material adecuado, que incluye acero inoxidable.

De acuerdo con la invención descrita en la presente memoria, el sistema de extracción de tejido 10 proporciona un sistema cerrado que es conveniente para la extracción, el procesamiento y la administración de células madre adultas halladas en el tejido adiposo. El sistema se puede colocar cerca del paciente para la extracción del tejido adiposo, y el tejido se puede procesar sin la necesidad de que el tejido se extraiga del sistema. Así, se describe un sistema que puede proporcionar composiciones mejoradas de células madre recientes a un paciente, y que reduce los riesgos potenciales asociados al cultivo o a la conservación de las células madre.

Por lo tanto, basándose en la presente descripción, la presente invención puede usar un método para la extracción de tejido de un paciente mediante el uso de las etapas siguientes: (i) preparar al paciente como para una lipoplastia tradicional; (ii) extraer la cánula y el sistema de extracción de tejido de los materiales de empaquetamiento hasta el campo estéril; (iii) conectar una bomba de liposucción (con una válvula convencional y filtros microbianos en serie) al adaptador del tubo flexible que conduce al recipiente de recogida de tejido; (iv) asegurarse de que las abrazaderas de rosca del tubo no están acopladas en los orificios de succión del recipiente de recogida de tejido; (v) usar la cánula como una cánula de liposucción normal para extraer el tejido adiposo indeseado; (vi) aplicar, en una realización de funcionamiento manual, dos abrazaderas de rosca de tubos para sellar el recipiente de recogida de tejido después de haber recogido la cantidad deseada de tejido adiposo con el recipiente de recogida de tejido; (vii) asegurarse de que el recipiente de recogida de tejido está etiquetado de manera adecuada con una etiqueta de identificación del paciente, y registrar cualquier información adicional en la etiqueta (fecha y hora del procedimiento, etc.) de acuerdo con la práctica institucional, y (viii) extraer el tejido adiposo del paciente.

Con respecto al sistema de extracción de tejido 10 ilustrado, el tejido se recoge directamente en los componentes de procesamiento uniendo el tubo 22 a la fuente de succión 20 con una válvula de fluido en serie e insertando la cánula 24 en el sitio de recogida. El tejido adiposo se aspira después hasta el recipiente de recogida de tejido 12 en el que es retenido por el filtro 16 contenido dentro del recipiente de recogida de tejido 12. Tras la recogida del tejido, el tejido adiposo recogido se puede lavar con un fluido de lavado, tal como solución salina isotónica estéril, contenido en el recipiente de lavado 38 añadido al recipiente de recogida de tejido 12 a través del tubo de lavado 39. Cuando el recipiente de recogida de tejido 12 está hecho de un material rígido en la realización ilustrada para soportar la recogida con succión, el aire desplazado del alojamiento durante la adición de solución salina se puede emitir a través del orificio de entrada de aire 40. De manera alternativa, el aire se puede desplazar hacia el recipiente de residuos 36 o un lugar de almacenamiento similar. Una vez que se ha lavado el tejido, el material residual se puede dejar fluir hacia el recipiente de residuos 36.

Después de haber recogido el tejido, se puede insertar la aguja 44 en un vial estéril de una disolución enzimática que contiene colagenasa que después se hace pasar al recipiente de recogida de tejido 12, donde se mezcla con el tejido adiposo a una temperatura de, o aproximadamente, 37 °C durante 15-60 minutos. Las etapas de lavado se pueden repetir según sea necesario, y el tejido disgregado se puede lavar tras la elución de la población de células activas para maximizar el rendimiento. Al final de la disgregación del tejido el recipiente de recogida de tejido 12 se coloca boca arriba para permitir la flotación de los adipocitos. La población de células activas se deja fluir después hacia el recipiente de recogida de células 26, en el que las células se separan de la colagenasa y de los lípidos libres residuales. Las células se pueden lavar y/o concentrar mediante cualquier método conocido para las personas de experiencia habitual en la técnica, que incluye, pero sin limitación, los lavados por centrifugación/resuspensión secuencial o los mecanismos de flujo continuo. Las células concentradas y lavadas se dejan fluir después hacia el recipiente de mezcla 30, en el que se pueden mezclar con tejido intacto del tubo de recuperación de tejido 34 y/o cualquier aditivo deseado antes de extraerlas a través de la salida 32 para la administración a un paciente. El material contenido en el recipiente de recogida de células 26 se puede filtrar mediante el uso del filtro de células 28 tras el lavado para aumentar la eliminación de agregados de tejido y células residuales indeseados que podrían conducir a un embolismo tras la aplicación.

Durante el procesamiento, 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 mejoran la viabilidad de la población de células activas durante el procesamiento, agentes antimicrobianos (p.ej., antibióticos), aditivos que lisan adipocitos y/o eritrocitos, o aditivos que enriquecen las poblaciones celulares de interés (mediante adherencia diferencial a restos en fase sólida o para favorecer de otra manera la reducción o enriquecimiento sustancial de poblaciones celulares).

En el sistema anterior, el recipiente de recogida de tejido 12 es intrínseco a los componentes de procesamiento del sistema de extracción de tejido 10. De manera alternativa, se podría emplear un recipiente de recogida de tejido separado, tal como el descrito en la solicitud de patente n° 10/242.094, titulada PRESERVATION OF NON EMBRYONIC CELLS FROM NON HEMATOPOIETIC TISSUES, presentada el 12 de septiembre de 2002, que reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de EE.UU. 60/322.070 presentada el 14 de septiembre de 2001, en su totalidad o en parte con la transferencia posterior del material disgregado a los componentes de procesamiento. Se describen recipientes de recogida de tejido potenciales adicionales en las patentes de EE.UU. n°s 6.316.247 y 5.372.945.

Como se indicó anteriormente, los métodos se pueden automatizar proporcionando uno o más dispositivos adicionales que pueden llevar a cabo automáticamente las etapas de los métodos. En tales aplicaciones, un dispositivo de procesamiento (p.ej., un microprocesador o un ordenador personal) es un dispositivo para automatizar parcialmente o completamente las etapas descritas anteriormente. Los ejemplos de etapas susceptibles de tal automatización incluyen, pero sin limitación, controlar la entrada o la salida de fluidos y tejidos a lo largo de rutas de tubos particulares controlando bombas y válvulas del sistema o del dispositivo de procesamiento; detectar bloqueos con sensores de presión; mecanismos de mezcla, medida de la cantidad de tejido y/o fluido a mover por una ruta particular mediante el uso de mecanismos volumétricos; mantenimiento de las temperaturas de los diversos componentes mediante el uso de dispositivos de control de calentamiento; lavado y concentración de las células, e integración del proceso con mecanismos de medición de tiempo y programas informáticos. En un sistema, el programa informático

puede controlar los parámetros del proceso para permitir la producción de una población de células preparada respecto de parámetros específicos definidos por un operador. Así, el dispositivo o dispositivos de automatización mejoran el rendimiento de los procedimientos, y proporcionan una recogida automática de tejido adiposo y un procesamiento del tejido adiposo para la administración a un paciente.

5 Se ilustra un dispositivo de automatización particular en la Fig. 4. Un recipiente de extracción de tejido (no mostrado) se coloca en un dispositivo 100 mediante el uso de marcadores de referencia codificados por colores 112-118 para alinear e insertar de manera adecuada los tubos en las rutas adecuadas. El dispositivo 100 incluye una diversidad de válvulas 105 y 110, y una diversidad de bombas 104 y 109. Los tubos se colocan en una serie de válvulas 105, 110 y bombas 104, 109 que se controlan mediante un sistema microprocesador integrado para coordinar el flujo de fluido y de tejido de acuerdo con el programa definido por el usuario. La selección del programa está mediada por un panel de interfaz con el usuario 106. Se coloca un recipiente de solución salina en una estructura de sujeción 101 y se une al recipiente de recogida de tejido. Se inserta un vial o un tubo de colagenasa u otro medio o mezcla de disociación de tejidos (no mostrado) en el recipiente de recogida de tejido en el punto 103. Una bolsa de residuos (no mostrada) se inserta en una estructura de sujeción 111, la cámara de separación de células/recipiente de recogida de células se coloca en una estructura de sujeción 107, y el recipiente de mezcla de tejido/células se coloca en la estructura de sujeción 108. El recipiente de recogida de tejido se coloca en la cámara de agitación/incubación 102.

El tejido adiposo se puede recoger en el recipiente de recogida de tejido mientras el recipiente está en su posición dentro del dispositivo, o antes de la colocación dentro del dispositivo. El dispositivo puede contener una pieza insertada transparente 119 opcional u otro dispositivo que permita la determinación del volumen de tejido dentro del recipiente de recogida de tejido. De manera alternativa, el volumen se puede determinar mediante la medida del peso del material contenido en la cámara de agitación/incubación 102 (que corresponde al recipiente de recogida de tejido 12). Este volumen se puede visualizar en la pantalla de interfaz del usuario 106.

El microprocesador abre después las válvulas 105 en los tubos 114 y 115 y activa las bombas 104 en el tubo 114 para la introducción de solución salina en la cámara de recogida 102 y para la extracción del material residual 115 hasta la bolsa de residuos 111. Durante este proceso, la cámara de recogida se agita mediante balanceo, y se mantiene a una temperatura programada mediante dispositivos de calentamiento integrados en la cámara 102. En ciertos sistemas, el procesamiento del tejido puede usar una solución salina precalentada, en cuyo caso el papel del dispositivo de calentamiento de la cámara de agitación/incubación es mantener la temperatura en el punto preprogramado, en vez de incrementar la temperatura.

30 Una vez que el tejido se lava, se puede extraer una fracción del 0% al 100% del tejido adiposo intacto lavado de la cámara de incubación 102 mediante la activación de la bomba 109 y la válvula 110 del tubo 116. El material extraído en este momento se mantiene en la cámara de mezcla 108. Se añade medio de disociación 103 al material restante de la cámara 102 abriendo la válvula 105 del tubo 113, cerrando otras válvulas y activando la bomba 104 del tubo 113. Tras la adición del medio de disociación, la cámara 102 se agita y se mantiene a la temperatura descrita anteriormente. Al final del periodo de incubación programado se detiene la agitación para permitir la flotación de los adipocitos. Se puede añadir solución salina adicional para facilitar este proceso. Tras la flotación de los adipocitos, las válvulas de los tubos 112 y 115 se abren para permitir la extracción de la población de células objetivo de la cámara 102 hasta la cámara de lavado de células 107. Las células lavadas se extraen a través del tubo 117 hacia la cámara de mezcla 108, el sobrenadante y la disolución de lavado se extraen hacia la cámara de residuos 111 a través del tubo 118. Se hace pasar solución salina adicional al sistema a través del tubo 114 para completar el proceso de lavado. Las células se mezclan en la cámara 108 con el tejido intacto extraído a través del tubo 116 anteriormente en el procesamiento. La mezcla se puede llevar a cabo mediante cualquier medio conocido para los expertos en la técnica, que incluye, pero sin limitación, la agitación por balanceo/inversión de la cámara, o mediante compresión pulsátil o rodillos en movimiento. El material mezclado se puede extraer después a través del orificio de la cámara de mezcla del equipo desechable.

El dispositivo incluye un mecanismo controlado por microprocesador para automatizar el proceso según los parámetros preprogramados 106. Este sistema incluiría también el uso de sensores de presión para la detección de bloqueos y mecanismos de seguridad y de control de calidad similares. En un sistema preferido, el componente informático del sistema incluiría la recogida automatizada de "datos de funcionamiento" que incluyen, por ejemplo, los números de lote de los componentes desechables, medidas de temperatura y de volumen, parámetros sobre el volumen de tejido y el número de células, la dosis de enzimas aplicadas, el tiempo de incubación, la identidad del operador, la fecha y la hora, la identidad del paciente, etc. En una realización preferida del dispositivo, se integraría un sistema de lectura de códigos de barras para permitir la entrada de datos de estas variables (por ejemplo, el número de lote del equipo desechable y la fecha de caducidad, el número de lote y la fecha de caducidad de la colagenasa, los identificadores del paciente/muestra, etc.) en el dispositivo controlador como parte de la documentación de procesamiento. Esto reduciría la posibilidad de errores en la introducción de los datos. Este dispositivo se podría incorporar fácilmente en el sistema controlador mediante el uso de un puerto y sistema interfaz USB o de otro tipo conocido en la técnica. De esta manera el dispositivo proporcionaría un control integrado de la introducción de los datos y la documentación del proceso. Un informe impreso de estos parámetros sería parte de los parámetros definidos por el usuario de un funcionamiento programado del dispositivo. Naturalmente, esto requeriría la integración de un componente de impresión (equipo físico y controlador) o de un controlador de impresión en el soporte informático más un conector de salida de interfaz para una impresora (p.ej., un puerto USB) en el equipo físico del dispositivo.

En un sistema adicional, el soporte informático incorporado en el controlador avisaría a los usuarios a través de las etapas necesarias para la inserción adecuada de los tubos y de otros elementos en el dispositivo. El soporte informático también iniciaría un análisis automatizado para confirmar la inserción correcta de los tubos, la ausencia de bloqueos, etc.

- 5 La aproximación general de procesamiento de este dispositivo usaría los mismos parámetros que los descritos en otra parte en esta descripción para el procesamiento celular manual.

Serán evidentes otras muchas conformaciones de los mecanismos indicados usados para el procesamiento de células para un experto en la técnica, y la presente descripción se incluye solamente como un ejemplo. Por ejemplo, la mezcla del tejido y de la solución salina durante el lavado y la disgregación se puede dar mediante agitación como en el presente ejemplo, o mediante recirculación del fluido. El lavado de las células puede estar mediado por un mecanismo de flujo continuo tal como la aproximación de membrana giratoria, la adherencia diferencial, la centrifugación diferencial (que incluye, pero sin limitación, la sedimentación diferencial, por velocidad o la separación en gradiente), o mediante una combinación de medios. De forma similar, se pueden usar componentes adicionales para permitir la manipulación adicional de las células, lo que incluye la adición de factores de crecimiento u otros modificadores de la respuesta biológica (Lind, 1998) (Hanada et al., 1997) (Lieberman et al., 1998), la mezcla de las células con componentes naturales o sintéticos destinados a implantarlos con las células en el receptor (Fukuda, 2001; Sodian et al., 2002; Ye et al., 2000).

La manipulación tras el procesamiento también puede incluir la captura de células (Caplan y Bruder, 2001; De Ugarte et al., 2003; Zuk et al., 2001), la transferencia génica (Luskey et al., 1990; Morizono et al., 2003), o la purificación celular adicional (Greenberg y Hammer, 2001; Mainwaring y Rowley, 1985; Schweitzer et al., 1995). Los mecanismos para llevar a cabo tales funciones se pueden integrar en el dispositivo mostrado en la Figura 4 o se pueden incorporar en dispositivos diferentes.

En un sistema adicional, el tejido recogido en una válvula de tejido adiposo convencional se podría transferir a un equipo de procesamiento diseñado para el procesamiento de otros tejidos. Por ejemplo, Baxter Inc. fabrica y comercializa una serie de bolsas de plástico y filtros destinados al uso en el ámbito de la recogida para el trasplante de médula ósea ("Bone Marrow Collection Kit with Flexible Pre-Filters and Inline Filters", Código de producto 4R2107, pat. en EE.UU. n°s 4.346.703 y 5.724.988). Este equipo de bolsa contiene una bolsa cónica grande con un filtro integrado de 800 µm que se podría usar para lavar el tejido adiposo recogido. En este ejemplo, los fragmentos de tejido adiposo mayores de 800 µm se retendrían en la bolsa. Estos fragmentos se podrían lavar después mediante la adición repetida de solución salina (o de otra disolución de lavado), seguido por la retirada del material residual a través de orificios situados por debajo del filtro. La mezcla se podría llevar a cabo manualmente o mediante el uso de un dispositivo de agitación de mesa, y se podría aplicar calentamiento mediante el uso de una placa calefactora. La disgregación se podría dar en el interior de esta bolsa. Tras la disgregación, las células pasarían a través del filtro integrado de 800 µm (y opcionalmente a través de uno o más filtros de un tamaño de malla más pequeños proporcionados con el equipo) y se recogerían en una bolsa de recogida (también proporcionada). Esta bolsa se podría colocar después en una centrífuga (p.ej., una Sorval RC-3C) en la que las células se podrían lavar en serie y concentrar. Las células también se podrían lavar mediante el uso de dispositivos de lavado celular existentes (desarrollados en gran medida para lavar productos sanguíneos humanos), tales como los comercializados por Baxter Inc (Cytomate o Baxter CS3000) o por Cobe Inc. (Cobe Spectra). Los elementos desechables se pueden integrar mediante el uso de adaptadores proporcionados por el fabricante, o se pueden unir mediante el uso de un dispositivo de conexión estéril tal como los fabricados por Terumo Inc. De forma similar, los mecanismos descritos en esta aproximación menos integrada se podrían conectar a un controlador central y montarlos como componentes de un dispositivo más integrado. Se podría usar una bomba peristáltica o una batería de bombas para automatizar el flujo de los fluidos con el uso de abrazaderas manuales o automatizadas para abrir y cerrar las rutas de fluido.

En una versión preferida, el sistema de extracción de tejido y el equipo de procesamiento estarían presentes cerca del paciente que recibe el tratamiento, tal como el quirófano o la sala de intervenciones ambulatorias (de manera eficaz en la cabecera del paciente). Esto permite la recogida y el procesamiento rápido y eficaz del tejido, elimina la posibilidad de cometer errores de manipulación/etiquetado de las muestras y por lo tanto permite un gran rendimiento del proceso global en el transcurso de un único procedimiento quirúrgico.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar situaciones y ámbitos particulares en los que se puede aplicar esta técnica, y no pretenden limitar el alcance de la invención y de las reivindicaciones incluidas en esta descripción.

2. Métodos de Tratamiento de Enfermedades y Trastornos Cardiovasculares Mediante el Uso de un Lipoaspirado Procesado (ADC)

Tal como se demuestra en la presente descripción, en una realización especialmente preferida, las ADC de la invención se pueden usar para tratar enfermedades y trastornos cardiovasculares. Las células madre y progenitoras derivadas de tejido adiposo obtenidas poniendo en práctica los métodos usados por la invención tienen varias propiedades que pueden contribuir a reducir y/o minimizar la lesión y estimular la reparación y regeneración miocárdica o cardiovascular tras la lesión. Estas incluyen, entre otras cosas, la capacidad de sintetizar y secretar factores de cre-

5 crecimiento que estimulan la formación de vasos sanguíneos nuevos, la capacidad de sintetizar y secretar factores de crecimiento que estimulan la supervivencia y la proliferación celular, la capacidad de proliferar y diferenciarse hasta células que participan directamente en la formación de vasos sanguíneos nuevos, la capacidad de injertarse en el miocardio lesionado e inhibir la cicatrización (deposición y reticulación de colágeno), la capacidad de proliferar y diferenciarse hasta células musculares capaces de contribuir a la contractilidad miocárdica, y la capacidad de proliferar y diferenciarse hasta células miocárdicas.

10 Los medios anteriores para reducir y/o minimizar la lesión y estimular la reparación y regeneración miocárdica o cardiovascular tras la lesión mediante el uso de células madre de adulto derivadas de tejido adiposo de la invención se describen con detalle más adelante en la sección de Ejemplos de la presente descripción. De manera específica, la presente invención demuestra, por primera vez, que las células madre derivadas de tejido adiposo (o ADC) de la invención expresan numerosos factores de crecimiento angiogénicos, que incluyen factor de crecimiento de placenta (PIGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), contienen células progenitoras endoteliales (EPC) que tienen una función bien establecida en la formación de vasos sanguíneos, se desarrollan hasta vasos sanguíneos *in vitro*, mantienen la supervivencia del tejido isquémico in vivo, inducen la reperfusión tras la lesión por oclusión/reperfusión de las extremidades posteriores, se dirigen al corazón cuando se inyectan en animales tras una lesión cardíaca, y se diferencian hasta células que expresan marcadores coherentes con su diferenciación en miocitos cardíacos cuando se inyectan en animales tras una lesión cardíaca.

20 Por lo tanto, se obtienen células derivadas de tejido adiposo a partir del tejido adiposo de un donante, y se usan para generar un beneficio terapéutico en el miocardio lesionado o degenerado o en otro tejido cardiovascular por medio de uno o más de los mecanismos demostrados en la presente memoria. En una realización preferida, las células se obtienen a partir del tejido adiposo de la persona en la que se van a implantar, por lo que se reducen las complicaciones potenciales asociadas a las respuestas antigénicas y/o inmunogénicas al trasplante. Los pacientes se estudian generalmente para determinar la lesión o enfermedad miocárdica mediante uno o más de los siguientes procedimientos llevados a cabo por un médico u otro profesional sanitario: el historial sanitario el paciente, el examen físico, y datos objetivos que incluyen, pero sin limitación, ECG, perfil de enzimas cardíacas en suero, y ecocardiografía.

30 El procedimiento de recogida se puede llevar a cabo antes de que el paciente reciba cualquier producto diseñado para reducir la coagulación sanguínea en relación con el tratamiento del infarto del miocardio. Sin embargo, en ciertas realizaciones, el paciente puede haber recibido aspirina antes del procedimiento de recogida. Además, la recogida de tejido adiposo se produce antes de cualquier intento de procedimiento de revascularización. Sin embargo, como entienden las personas expertas en la técnica, se espera que el momento de la recogida varíe, y dependerá de varios factores, que incluyen, entre otras cosas, la estabilidad del paciente, el perfil de coagulación del paciente, la disponibilidad del proveedor y los patrones de calidad de los cuidados. Finalmente, el momento de la recogida estará determinado por el médico responsable de administrar los cuidados al paciente afectado.

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

40 Las células pueden ser para la administración a un paciente en cualquier situación en la que la función miocárdica esté comprometida. Los ejemplos de tales situaciones incluyen, pero sin limitación, infarto de miocardio agudo (ataque al corazón), insuficiencia cardíaca congestiva (como terapia o como preparación para un trasplante), y complementación de cirugía de injerto de derivación aortocoronaria, entre otras cosas. Las células se pueden extraer antes, y se pueden almacenar de un modo criopreservado, o se pueden extraer en o aproximadamente en el momento de una necesidad definida. Como se describe en la presente memoria, las células pueden ser para la administración al paciente, o para la aplicación directamente al tejido lesionado, o en las proximidades del tejido lesionado, sin procesamiento adicional o después de procedimientos adicionales para purificar, modificar, estimular o cambiar adicionalmente de otro modo las células. Por ejemplo, las células obtenidas de un paciente pueden ser para la administración a un paciente que lo necesita, sin el cultivo de las células antes de administrarlas al paciente. En una realización, la recogida de tejido adiposo se realizó en la cabecera del paciente. Se puede usar la monitorización hemodinámica para monitorizar el estado clínico del paciente.

50 De acuerdo con la invención descrita en la presente memoria, las células derivadas de tejido adiposo pueden ser para la administración al paciente poco después de recoger el tejido adiposo del paciente. Por ejemplo, las células pueden ser para la administración inmediatamente después del procesamiento del tejido adiposo para obtener una composición de células madre derivadas de tejido adiposo. En una realización, el momento preferido de la administración debería tener lugar del orden de horas a días después del infarto para aprovechar el medio neurohormonal que existe después de la lesión cardíaca. Finalmente, el momento de la administración dependerá de la disponibilidad del paciente y del tiempo de procesamiento necesario para procesar el tejido adiposo. En otra realización, el momento de la administración puede ser relativamente más largo si las células a reinfundir al paciente se someten a modificación adicional, purificación, estimulación u otra manipulación, como se discute en la presente memoria. Además, las células derivadas de tejido adiposo pueden ser para la administración en múltiples momentos tras el infarto. Por ejemplo, las células se pueden administrar de forma continua a lo largo de un periodo de tiempo prolon-

gado (p.ej., horas), o se pueden administrar en múltiples inyecciones rápidas prolongadas a lo largo de un periodo de tiempo. En ciertas realizaciones, se administrará una administración inicial de células en un periodo de alrededor de 12 horas tras el infarto, tal como a las 6 horas, y una o más dosis de células se administrarán a intervalos de 12 horas.

5 El número de células administradas a un paciente puede estar relacionado, por ejemplo, con el rendimiento celular tras el procesamiento del tejido adiposo. Una porción del número total de células se puede conservar para su uso posterior o crioconservarse. Además, la dosis administrada dependerá de la vía de administración de las células al paciente. Pueden ser necesarias menos células cuando se emplean sistemas de administración epicárdica o endo-
10 cárdica, ya que estos sistemas y métodos pueden proporcionar la vía más directa para el tratamiento de afecciones cardiovasculares. En una realización de la invención, se espera que el número de células, p.ej., células sin purificar, para administrar al paciente sea de alrededor de $5,5 \times 10^4$ células. Sin embargo, este número se puede ajustar en órdenes de magnitud para alcanzar el efecto terapéutico deseado.

15 Las células también se pueden aplicar con aditivos para aumentar, controlar o dirigir de otra manera el efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, en una realización, y como se describe en la presente memoria, las células se pueden purificar adicionalmente mediante el uso de una selección de células positiva y/o negativa mediada por anticuerpos para enriquecer la población celular para incrementar la eficacia, reducir la morbilidad, o facilitar la sencillez del procedimiento. De forma similar, las células se pueden aplicar con una matriz biocompatible que facilita la ingeniería tisular *in vivo* soportando y/o dirigiendo el destino de las células implantadas. De la misma manera, las células pueden ser para la administración tras la manipulación genética, de manera que expresen productos génicos que se
20 cree o que están destinados a estimular la(s) respuesta(s) terapéutica(s) proporcionada(s) por las células. Los ejemplos de manipulaciones incluyen las manipulaciones para controlar (incrementar o disminuir) la expresión de factores que favorecen la angiogénesis o la vasculogénesis (por ejemplo VEGF), la expresión de genes del desarrollo que favorecen la diferenciación hasta linajes celulares específicos (por ejemplo MyoD) o que estimulan el crecimiento y la proliferación celulares (por ejemplo bFGF-1).

25 Las células se pueden someter además a un cultivo celular en un material de soporte antes de ser implantadas. Así, se podrían sintetizar válvulas modificadas mediante ingeniería de tejidos, parches ventriculares, pericardio, vasos sanguíneos y otras estructuras en matrices o soportes naturales o sintéticos usando ADC antes de la inserción o implantación en el receptor (Eschenhagen et al., 2002; Zimmermann et al., 2004; Zimmermann et al., 2002; Nerem y Ensley, 2004). De hecho, se ha demostrado la diferenciación *in vitro* de células madre y progenitoras derivadas de tejido adiposo hasta células que expresan marcadores de los miocitos cardiacos (Gaustad et al., 2004; Rangappa et al., 2003).

3. Vías de Administración de las ADC para el Tratamiento de Enfermedades y Trastornos Cardiovasculares

35 En una realización, se prefiere la administración directa de las células en el sitio en el que se pretende obtener un beneficio. Esto se puede llevar a cabo mediante inyección directa en la superficie externa del corazón (epicárdica), inyección directa en el miocardio a través de la superficie interna (endocárdica) por medio de la inserción de una cánula adecuada, mediante infusión arterial o venosa (lo que incluye mecanismos de flujo retrógrado) o mediante otros medios descritos en la presente memoria o conocidos en la técnica. Las vías de administración conocidas para el experto en la técnica incluyen, pero sin limitación, intravenosa, intracoronaria, endomiocárdica, epimiocárdica, intraventricular, de seno coronario retrógrado o intravenosa.

40 Como se mencionó anteriormente, las células se pueden administrar mediante varias vías que incluyen la administración sistémica por infusión venosa o arterial (que incluye la infusión de flujo retrógrado) o por inyección directa en el corazón. La administración sistémica, en particular mediante acceso venoso periférico, tiene la ventaja de ser mínimamente invasiva y depende de la perfusión natural del corazón y de la capacidad de las células derivadas de tejido adiposo de dirigirse al sitio lesionado. Las células se pueden inyectar en una única inyección rápida, por medio
45 de una infusión lenta o por medio de una serie escalonada de aplicaciones separadas por varias horas o, con tal de que las células se almacenen de manera adecuada, varios días o semanas. Las células también se pueden administrar mediante el uso de catéteres, de forma que el primer pase de células a través del corazón se potencie mediante el uso de globos para controlar el flujo sanguíneo miocárdico. Como con el acceso venoso periférico, las células se pueden inyectar a través de los catéteres en una única inyección rápida o en múltiples alícuotas más
50 pequeñas. Las células también se pueden aplicar directamente al miocardio mediante inyección epicárdica. Esta se podría emplear bajo visualización directa en el contexto de un procedimiento a corazón abierto (tal como Cirugía de Injerto de Derivación Aortocoronaria) o mediante la colocación de un dispositivo de asistencia ventricular. Se pueden emplear catéteres equipados con agujas para administrar células directamente en el miocardio de una manera endocárdica, que permitiría un medio menos invasivo de aplicación directa.

55 En una realización, la vía de administración incluirá la administración intravenosa a través de un catéter intravenoso periférico convencional, un catéter venoso central o un catéter arterial pulmonar. En otras realizaciones, las células se pueden administrar a través de una vía intracoronaria a la que se accede mediante métodos actualmente aceptados. El flujo de células se puede controlar mediante la inflación/deflación de globos distales y proximales localizados dentro de la vasculatura del paciente, creando así zonas sin flujo temporales que favorecen el injerto celular o la
60 acción terapéutica celular. En otra realización, las células se pueden administrar por medio de un método endocár-

- dico (superficie interior de la cámara cardiaca) que puede requerir el uso de un catéter compatible, así como la capacidad de tomar imágenes o detectar el tejido objetivo deseado. De manera alternativa, las células se pueden administrar por medio de un método epicárdico (superficie externa del corazón). Este suministro se puede conseguir a través de la visualización directa en el momento de un procedimiento a corazón abierto o a través de una aproximación mediante toracoscopia que requiere instrumentos de administración de células especializados. Además, las células se podrían administrar a través de las siguientes vías, solas o en combinación con una o más de las aproximaciones identificadas anteriormente: subcutánea, intramuscular, sublingual, perfusión coronaria retrógrada, dispositivos de derivación coronaria, equipamiento de oxigenación de membrana extracorpórea (ECMO) y mediante una ventana pericárdica.
- 5
- 10 En una realización, las células son para la administración al paciente como una inyección rápida intravascular o una infusión temporal. En otra realización, las células se pueden resuspender en un medio natural o artificial o en un soporte de tejido antes de administrarlas al paciente.
- La dosis de células a administrar al paciente dependerá de la cantidad de tejido adiposo recogido y del índice de masa corporal del donante (como una medida de la cantidad de tejido adiposo disponible). La cantidad de tejido recogido se determinará además por el grado de la lesión o degeneración miocárdica. Los múltiples tratamientos que usan múltiples recogidas de tejido o que usan una única recogida con almacenamiento adecuado de las células entre las aplicaciones están dentro del alcance de la presente invención.
- 15
- Las porciones del lipoaspirado procesado se pueden almacenar antes de administrarlas a un paciente. Para el almacenamiento a corto plazo (menos de 6 horas) las células se pueden almacenar a o por debajo de la temperatura ambiente en un recipiente sellado con o sin complementación con una disolución de nutrientes. El almacenamiento a medio plazo (menos de 48 horas) se realiza preferentemente a 2-8 °C en una disolución tamponada isosmótica (por ejemplo Plasmalyte®) en un recipiente compuesto de o revestido con un material que impide la adhesión celular. El almacenamiento a más largo plazo se realiza preferentemente mediante criopreservación adecuada y almacenamiento de las células en condiciones que favorecen la conservación de la función celular, tal como se describe en la solicitud PCT en copropiedad y cedida en común número PCT/US02/29207, presentada el 13 de septiembre de 2002, y la solicitud provisional de EE.UU. número 60/322.070, presentada el 14 de septiembre de 2001.
- 20
- 25 De acuerdo con un aspecto de la invención, las células derivadas de tejido adiposo que se van a administrar a un paciente pueden actuar como vehículos de administración de factores de crecimiento. Por ejemplo, modificando las células para que expresen uno o más factores de crecimiento adecuados para aliviar los síntomas asociados a un trastorno o enfermedad cardiovascular, las células se pueden administrar a un paciente y modificarse para liberar uno o más de los factores de crecimiento. La liberación se puede proporcionar de una manera controlada durante periodos prolongados de tiempo. Por ejemplo, la liberación se puede controlar de manera que el/los factor(es) de crecimiento se libere(n) de una manera pulsátil o periódica, de forma que haya elevaciones locales del factor de crecimiento, y/o recesiones locales en la cantidad de factor de crecimiento en las proximidades de un área lesionada de tejido.
- 30
- 35 Las células que se administran al paciente no solamente ayudan a restablecer la función de tejidos lesionados o de otra forma enfermos, sino que también facilitan la remodelación de los tejidos lesionados.
- La administración de células puede tener lugar, pero sin limitación, en los siguientes lugares: clínica, oficina clínica, departamento de urgencias, servicio hospitalario, unidad de cuidados intensivos, quirófano, salas de cateterización y salas radiológicas.
- 40
- En una realización, los efectos de la terapia de administración de células se demostrarían, pero sin limitación, mediante una de las siguientes medidas clínicas: aumento de la fracción de eyección cardiaca, tasa disminuida de insuficiencia cardiaca, tamaño disminuido de infarto, disminución de la morbilidad asociada (edema pulmonar, insuficiencia renal, arritmias), mejora de la tolerancia al ejercicio u otras medidas de calidad de vida, y reducción de la mortalidad. Los efectos de la terapia celular pueden ser evidentes a lo largo del transcurso de días a semanas después del procedimiento. Sin embargo, los efectos beneficiosos se pueden observar tan pronto como varias horas después del procedimiento, y pueden persistir durante varios años.
- 45
- Los pacientes se monitorizan generalmente antes y durante el suministro de las células. Los procedimientos de monitorización incluyen, pero sin limitación: estudios de coagulación, saturación de oxígeno, monitorización hemodinámica y monitorización del ritmo cardiaco. Tras la administración de las células, los pacientes pueden necesitar un periodo de aproximadamente 24 horas de monitorización de acontecimientos adversos. Los estudios de seguimiento para determinar las mejoras funcionales de los procedimientos pueden incluir, sin limitación: capacidad funcional del paciente (p.ej., disnea en el ejercicio, disnea nocturna paroxística, angina) ecocardiografía, estudios de perfusión nuclear, imagen de resonancia magnética, tomografía de emisión de positrones y angiografía coronaria.
- 50
- 55 Como se expuso previamente, en una realización preferida, las ADC, es decir, la población de células madre derivadas de tejido adiposo activas, se administran directamente al paciente. En otras palabras, la población de células activas (p.ej., las células madre y/o células precursoras endoteliales) se administran al paciente sin extraerlas del sistema o exponerlas al ambiente externo del sistema antes de administrarlas al paciente. El proporcionar un sis-

tema cerrado reduce la posibilidad de contaminación del material que se administra al paciente. Así, el procesamiento del tejido adiposo en un sistema cerrado proporciona ventajas sobre los métodos existentes, debido a que es más probable que la población de células activas sea estéril. En tal realización, el único momento en el que las células madre y/o células precursoras endoteliales se exponen al ambiente externo, o se extraen del sistema, es cuando las células se están sacando hasta un dispositivo de aplicación y se van a administrar al paciente. En una realización, el dispositivo de aplicación también puede ser parte del sistema cerrado. Así, las células usadas en estas realizaciones no se procesan para cultivo o crioconservación, y se pueden administrar a un paciente sin procesamiento adicional, o se pueden administrar a un paciente después de mezclarlas con otros tejidos o células.

En otras realizaciones, al menos una parte de la población de células activas se almacena para su implantación/infusión posterior. La población se puede dividir en más de una alícuota o unidad, de modo que parte de la población de células madre y/o células precursoras endoteliales se conserva para su aplicación posterior, mientras que parte se aplica inmediatamente al paciente. El almacenamiento de moderado a largo plazo de todas o parte de las células en un banco de células también está dentro del alcance de la presente invención, como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. nº 10/242.094, titulada PRESERVATION OF NON EMBRYONIC CELLS FROM NON HEMATOPOIETIC TISSUES, presentada el 12 de septiembre de 2002, que reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de EE.UU. 60/322.070 presentada el 14 de septiembre de 2001. Al final del procesamiento, las células concentradas se pueden cargar en un dispositivo de administración, tal como una jeringa, para su colocación en el receptor mediante cualquier medio conocido para un experto en la técnica.

II. Composiciones Farmacéuticas

La población de células activas se puede aplicar sola o en combinación con otras células, tejidos, fragmentos de tejido, factores de crecimiento tales como VEGF y otros factores de crecimiento angiogénicos o arteriogénicos conocidos, compuestos biológicamente activos o inertes, soportes plásticos reabsorbibles u otros aditivos destinados a mejorar la administración, eficacia, tolerancia o función de la población. La población celular también se puede modificar mediante la inserción de ADN o mediante la colocación en cultivo celular de tal manera que cambie, mejore o complemente la función de las células para la obtención de un propósito estructural o terapéutico. Por ejemplo, los expertos en la técnica conocen los métodos de transferencia génica para células madre, como se describe en (Morizono et al., 2003; Mosca et al., 2000), y pueden incluir técnicas de transfección virales, y más específicamente, técnicas de transferencia de genes de virus adenoasociados, como se describe en (Walther y Stein, 2000) y (Athanasopoulos et al., 2000). También se pueden llevar a cabo técnicas que no se basan en virus, como se describe en (Muramatsu et al., 1998).

En otro aspecto, las células se podrían combinar con un gen que codifica factor(es) de crecimiento proangiogénico(s) y/o cardiomiogénico(s) que permitiría(n) a las células actuar como su propia fuente de factor de crecimiento durante la reparación o regeneración cardíaca. También se podrían aplicar genes que codifican factores o agentes antiapoptóticos. La adición del gen (o combinación de genes) podría ser mediante cualquier tecnología conocida en la técnica, lo que incluye, pero sin limitación, la transducción adenoviral, "pistolas génicas", transducción mediada por liposomas y transducción mediada por retrovirus o lentivirus, plásmido, virus adeno-asociado. Las células se podrían implantar junto con un material excipiente que albergase un vehículo de administración génica capaz de liberar y/o presentar genes a las células a lo largo del tiempo, de manera que la transducción pueda continuar o iniciarse *in situ*. En particular, cuando las células y/o el tejido que contiene las células se van a administrar a un paciente distinto del paciente del que se obtuvieron las células y/o el tejido, se pueden administrar uno o más agentes inmunodepresores al paciente que recibe las células y/o el tejido para reducir, y preferentemente evitar, el rechazo del trasplante. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión "fármaco o agente inmunodepresor" pretende incluir agentes farmacéuticos que inhiben o interfieren con la función inmunitaria normal. Los ejemplos de agentes inmunodepresores adecuados con los métodos descritos en la presente memoria incluyen los agentes que inhiben la rutas de coestimulación de células T/células B, tales como los agentes que interfieren con el acoplamiento de las células T y las células B mediante las rutas de CTLA4 y B7, como se describe en la pub. de patente de EE.UU. nº 20020182211. Un agente inmunodepresor preferido es ciclosporina A. Otros ejemplos incluyen mofetilo, rapamicina y globulina anti-timocitos. En una realización, el fármaco inmunodepresor se administra con al menos otro agente terapéutico. El fármaco inmunodepresor está 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 inmunodepresor se administra de forma transitoria durante un tiempo suficiente para inducir tolerancia hacia las ADC de la invención.

En ciertas realizaciones de la invención, las células son para la administración a un paciente con uno o más agentes de diferenciación celular, tales como citocinas y factores de crecimiento. Se describen ejemplos de diversos agentes de diferenciación celular en (Gimble et al., 1995; Lennon et al., 1995; Majumdar et al., 1998; Caplan y Goldberg, 1999; Ohgushi y Caplan, 1999; Pittenger et al., 1999; Caplan y Bruder, 2001; Fukuda, 2001; Worster et al., 2001; Zuk et al., 2001).

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no se deberían interpretar de ningún modo como adicionalmente limitantes.

60 Ejemplos

Las ADC o la población activa de células madre derivadas de tejido adiposo usadas a lo largo de los ejemplos expuestos a continuación se obtuvieron mediante el/los método(s) descrito(s) en la presente descripción y/o el/los método(s) descrito(s) en la solicitud de EE.UU. de nº 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 prioridad respecto de la solicitud provisional de EE.UU. de nº de serie 60/338.856, presentada el 7 de diciembre de 2001.

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

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es uno de los reguladores clave de la angiogénesis (Nagy et al., 2003; Folkman, 1995). El factor de crecimiento de placenta, otro miembro de la familia de VEGF, desempeña un papel similar tanto en la angiogénesis como en la arteriogénesis, el proceso mediante el cual se reclutan vasos colaterales y se expanden en respuesta a una perfusión y a una fuerza de cizallamiento incrementadas (Nagy et al., 2003; Pipp et al., 2003; Scholz et al., 2003). Específicamente, el trasplante de células de tipo natural (PIGF +/+) a un ratón con inactivación génica de PIGF restaura la capacidad de inducir la recuperación rápida de la isquemia de las extremidades posteriores (Scholz et al., 2003).

Dada la importancia tanto de la angiogénesis como de la arteriogénesis para el proceso de revascularización, se examinó la expresión de PIGF y VEGF por las células ADC mediante el uso de un ensayo ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) con el uso de células de tres donantes. Un donante tenía un historial de hiperglucemia y diabetes tipo 2 (una afección asociada muy frecuentemente con la enfermedad microvascular y macrovascular, lo que incluye a los pacientes con arteriopatía coronaria). Las células ADC de cada donante se colocaron en placas a 1.000 células/cm² en medio DMEM/F-12 complementado con FCS al 10% y HS al 5%, y se cultivaron hasta la confluencia. Se tomaron muestras del sobrenadante y se analizó la expresión de las proteínas PIGF y VEGF. Como se muestra en las Figuras 5A y 5B, los resultados demuestran una expresión sólida tanto de VEGF (Figura 5A) como de PIGF (Figura 5B) por las células madre derivadas de tejido adiposo de la invención.

Estos datos demuestran que las células madre y progenitoras derivadas de tejido adiposo tanto de sujetos normales como de pacientes diabéticos expresan factores de crecimiento angiogénicos y arteriogénicos. Esto es importante, ya que los pacientes con diabetes tienen un riesgo incrementado de enfermedad cardiovascular, y estos datos indican que las células ADC conservan su capacidad angiogénica en una situación de diabetes. Así, los pacientes diabéticos pueden obtener un beneficio angiogénico a partir de sus propias células ADC.

Ejemplo 2: Las ADC Contienen Poblaciones Celulares que Participan en la Angiogénesis

Se sabe que las células progenitoras endoteliales (EPCs) participan en la angiogénesis. Se han detectado células precursoras endoteliales circulantes en sangre periférica, sangre de cordón umbilical, médula ósea e hígado fetal (Takahashi, 1999; Asahara, 1999; Asahara, 1997; Loomans, 2004; Shintani, 2001; Vasa, 2001). Para determinar la frecuencia de las EPCs en las células madre derivadas de tejido adiposo, se llevó a cabo un ensayo de EPC. Se colocaron células ADC en placas revestidas de fibronectina y se cultivaron en un medio de células endoteliales durante tres días para eliminar las células endoteliales maduras. Las células no adherentes se extrajeron y se volvieron a colocar en placas. Después de 14 días se identificaron las colonias mediante tinción con Aglutinina-1 de Ulex europaeus conjugada a FITC (Vector Labs, Burlingame, CA) y LDL acetilada marcada con Dil (Molecular Probes, Eugene, OR). Como se muestra en la Figura 6, los resultados indican una frecuencia de EPC de aproximadamente 500 EPC/10⁶ células ADC.

La presencia de EPCs en la población de células madre y progenitoras derivadas de tejido adiposo indica que esta población puede participar directamente en el desarrollo de vasos sanguíneos nuevos y mejorar la angiogénesis y la reperfusión, por lo que se reduce la duración de la isquemia tras el infarto de miocardio o en la insuficiencia cardíaca congestiva.

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

Un ensayo reconocido en la técnica para la angiogénesis es uno en el que las células endoteliales cultivadas en una capa alimentadora de fibroblastos desarrollan una red compleja de tubos positivos para CD-31 que recuerdan una red capilar naciente (Donovan et al., 2001). Las ADC forman redes similares *en ausencia de una capa alimentadora* (Figura 7A). De manera notable, las células ADC obtenidas de ratones hiperglucémicos con diabetes tipo 1 inducida mediante estreptozotocina (STZ) ochos semanas después de la administración de STZ forman estructuras similares con una frecuencia similar a las de los ratones sin tratamiento (Figura 7B).

Esto es importante, ya que los pacientes con diabetes tienen un riesgo incrementado de enfermedad cardiovascular, y estos datos indican que las células ADC conservan su capacidad angiogénica en una situación de diabetes. Así, los pacientes diabéticos pueden obtener un beneficio angiogénico a partir de sus propias células ADC.

En resumen, los resultados de los Ejemplos 1 a 3, anteriormente, indican que las células madre derivadas de tejido adiposo contienen poblaciones de células que pueden estimular la angiogénesis y la arteriogénesis. Los resultados también indican que las células madre derivadas de tejido adiposo de un donante humano diabético o de ratones tratados con STZ que exhiben una hiperglucemia mantenida probablemente no tienen deficiencia de células que

estimulan la angiogénesis. Así, el tejido adiposo puede representar un depósito de células regenerativas que no se ven comprometidas por la situación de diabetes en la que se incrementa sustancialmente el riesgo de enfermedad cardiovascular.

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

5 El potencial angiogénico *in vitro*, aunque prometedor, es de poco valor si las células no ejercen una actividad angiogénica *in vivo*. La inducción quirúrgica de isquemia crítica de las extremidades en roedores es un modelo bien reconocido en el que se pueden observar procesos simultáneos de arteriogénesis (reclutamiento y expansión de vasos colaterales principalmente en respuesta a una fuerza de cizallamiento aumentada) y angiogénesis (desarrollo de vasos nuevos en respuesta a la isquemia) (Schatteman, 2000; Scholz, 2002; Takahashi, 1999). Este modelo se desarrolló en ratones inmunodeficientes (NOD-SCID) en los que se pudo observar la capacidad de las células humanas de controlar la reperfusión. De manera específica, se anestesiaron animales con ketamina y xilacina (80 mg/kg; 7,5 mg/kg) y se colocaron sobre la superficie de operación en posición supina. Se determinaron los valores preoperatorios del flujo sanguíneo para ambas extremidades posteriores como se describe más adelante. Los animales se prepararon con Betadine y se cubrieron de la manera estéril habitual, y se colocaron en un baño de agua en circulación. Se realizó una incisión unilateral de 1,5 cm que se extendía desde el origen de la extremidad posterior hasta la proximidad de la rodilla para exponer la arteria iliaca, en proximidad a su bifurcación hacia las arterias femorales profunda y superficial. La vasculatura se ató con una ligadura de seda 3-0 en los siguientes sitios: 1) arteria iliaca próxima a su bifurcación, 2) distal del origen de la arteria femoral profunda, 3) proximal a la ramificación de la arteria femoral superficial. Tras la ligadura, la vasculatura se retiró en bloque. Después se hizo un esfuerzo para identificar cualquier circulación colateral evidente, que se ligó y posteriormente se retiró. La herida y la capa de músculo se cerraron con vicryl 4-0, y la piel se cerró con vicryl 5-0. Los animales se trataron tras la operación con buprenorfina (0,5 mg/kg) y se recuperaron en el baño de agua en circulación hasta que se colocaron espontáneamente en posición recostada. Veinticuatro horas después de la cirugía se inyectó a los animales 5×10^6 células ADC a través de la vena de la cola. Se inyectó a los ratones NOD-SCID células de donante humano, y se incluyeron en un estudio de un paciente con diabetes. Se formaron imágenes del flujo 14 días tras el tratamiento.

En estos estudios, los animales tratados con ADC mostraron una mejora estadísticamente significativa en la retención de las estructuras de las extremidades (recuperación de las extremidades; 2/3 ratones sin tratar perdieron todas las estructuras de las extremidades posteriores inferiores, en comparación con 0/5 animales tratados con ADC) y restablecimiento del flujo (Figura 8). De forma muy notable, en los ratones NOD-SCID que recibieron células de donante humano diabético, el flujo en el día 14 se restableció hasta un $50 \pm 11\%$ en los animales tratados, en comparación con el $10 \pm 10\%$ de animales sin tratar ($p < 0,05$). El día 19 se había producido un rebote, de manera que la perfusión en la extremidad experimental fue mayor que la del control ($136 \pm 37\%$). Esta respuesta se halla dentro del intervalo observado con las células obtenidas de dos donantes normales (no diabéticos) ($50-90\%$).

En un experimento similar en ratones inmunocompetentes (ratones 129S) en los que se pudieron determinar los efectos de la transferencia de células autólogas, los ratones tratados con células ADC mostraron un $80 \pm 12\%$ de restablecimiento del flujo en el día 14, en comparación con el $56 \pm 4\%$ en los ratones sin tratar.

En este modelo, el restablecimiento del flujo sanguíneo proviene del reclutamiento y la expansión de vasos colaterales y de la angiogénesis en la extremidad inferior. Estos procesos también son clave para el restablecimiento del flujo en el corazón tras un infarto. Así, la capacidad de las ADC de estimular estos procesos *in vivo* apoya intensamente la aplicación de las células ADC en el ámbito del infarto de miocardio. También es importante indicar que las células ADC obtenidas de un donante diabético (un miembro de una población de pacientes con un riesgo mayor de enfermedad cardiovascular) también demostraron esta actividad.

Ejemplo 5: El Aumento de la dosis de ADC Está Asociado a una Supervivencia del Injerto y Angiogénesis Mejoradas

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

50 Se llevó a cabo un estudio con ratas Fisher en el que los fragmentos de tejido adiposo se trasplantaron en el espacio subcutáneo sobre los músculos del muslo externo. La pata derecha se trasplantó con 0,2 g de fragmentos de tejido adiposo solamente, la pata izquierda con 0,2 g de fragmentos de tejido adiposo complementados mediante la adición de células madre derivadas 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 pata contralateral actuó como un control. Los animales se mantuvieron después durante un mes, tras el cual los animales se sacrificaron y se recuperaron los injertos, se pesaron, se fijaron en formalina y se incrustaron en parafina para su análisis histológico.

Como se muestra en la Figura 9A, los resultados muestran una retención mínima del tejido injertado en la pata de control, y un incremento dependiente de la dosis en la retención de peso del injerto en la pata tratada. Además, el

análisis inmunohistoquímico de los injertos mostró una neoangiogénesis considerable y perfusión en los injertos tratados con células madre derivadas de tejido adiposo (Figura 9B, flechas). Esto también se asoció a la retención de la morfología del tejido adiposo (Figura 9B).

5 Como se indicó anteriormente, la demostración de que las células ADC favorecen la supervivencia del tejido isquémico, perfundido de manera inadecuada, es un indicador importante de potencial clínico en la enfermedad cardiovascular.

Ejemplo EMPLO 6: Injerto Miocárdico Mediante ADC

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

20 De manera importante, el análisis inmunohistoquímico de las células derivadas de donante (positivas para beta galactosidasa) el día 14 indicó que muchas células derivadas de donante expresaban el marcador de miocitos cardiacos, la cadena pesada de miosina (Figura 11). Esto indica que las células ADC son capaces de dirigirse al sitio de lesión en un corazón lesionado, y de diferenciarse hasta miocitos cardiacos. Así, las células ADC pueden ser capaces de reponer los miocitos cardiacos que se pierden tras un ataque al corazón (infarto de miocardio).

25 Para ampliar estos hallazgos entre especies, se estudió el injerto de un lipoaspirado procesado derivado de donante en un modelo de oclusión/reperfusión en rata. En este sistema experimental, se ocluyó temporalmente la arteria coronaria principal (descendente anterior izquierda) de una rata Wistar inmunocompetente mediante el uso de proleno 7-0 y un trozo pequeño de tubo silastic que actuaba como un lazo sobre la arteria. Después de una hora, la oclusión se liberó y se permitió que la sangre volviera a perfundir el miocardio isquémico. Este modelo representa más fielmente los mecanismos de lesión y reparación presentes en el paradigma clínico humano. Inmediatamente tras la reperfusión, se inyectaron aproximadamente 1 millón (1×10^6) de células ADC obtenidas de ratones Rosa 26 a través de una vía intra-ventricular. Los corazones se recogieron una semana después de la inyección. Como se muestra en la Figura 12, los resultados demuestran el injerto de células ADC derivadas de donante.

Ejemplo 7: Tratamiento de la Lesión Cardíaca Aguda

35 El infarto de miocardio agudo (ataque al corazón) da como resultado la lesión isquémica del miocardio. La lesión del tejido se puede minimizar mediante la reperfusión del tejido lesionado y mediante la regeneración del tejido miocárdico (Murry et al., 1996; Orlic et al., 2001; Orlic et al., 2003; Rajnoch et al., 2001; Strauer et al., 2002; Assmus et al., 2002). La terapia con células derivadas de tejido adiposo, como se describe en la presente memoria, busca proporcionar una fuente superior de células regenerativas respecto a las terapias con células derivadas de tejido no adiposo, debido, por ejemplo, a al menos uno del uso de un mayor número de células no cultivadas y células más puras con morbilidad atenuada asociada a las terapias con células derivadas de tejido no adiposo, tales como la recogida de médula ósea.

45 Se sospecha que un paciente ha sufrido un infarto de miocardio. El paciente ingresa en un periodo de una hora desde el inicio del infarto. Se prescribe al paciente una terapia con células derivadas de tejido adiposo. Se examina la constitución del paciente en busca de un sitio adecuado para la recogida de tejido adiposo. Los sitios de recogida se caracterizan por al menos uno de lo siguiente: espacio(s) potencial(es) limitado(s) por estructuras anatómicas normales, sin estructuras vasculares o viscerales importantes con riesgo de lesión, y facilidad de acceso. Se prefieren sitios de recogida vírgenes, pero un sitio de recogida previo no impide la recogida de tejido adiposo adicional. Los sitios de recogida posibles incluyen, pero sin limitación, los siguientes: regiones del muslo lateral y media de extremidades inferiores bilaterales, panículo adiposo de la pared abdominal anterior y regiones flanqueantes bilaterales.

50 El paciente recibe una inyección subcutánea de una disolución fluida tumescente que contiene una combinación de lidocaína, solución salina y epinefrina, por ejemplo, en diferentes regímenes de dosis normalizados. Mediante el uso de un bisturí (p.ej., un bisturí de hoja 11), se realiza una pequeña punción en la región media del muslo del paciente en su pierna derecha y/o izquierda para atravesar la dermis. La hoja se gira 360 grados para completar la herida. Se inserta una cánula de punta roma (p.ej., una cánula de calibre 14) en el plano del tejido adiposo subcutáneo por debajo de la incisión. La cánula se conecta a un dispositivo de succión accionado eléctricamente. La cánula se mueve a través del plano de tejido adiposo para romper la arquitectura del tejido conectivo. Se obtienen aproximadamente 500 cm^3 de aspirado. Después de la retirada del tejido adiposo, se consigue la hemostasis con técnicas

quirúrgicas convencionales y se cierra la herida.

El lipoaspirado se procesa de acuerdo con los métodos descritos anteriormente en la presente memoria para obtener una unidad de células madre derivadas de tejido adiposo concentradas. Aproximadamente seis horas después del infarto, se administran las células madre al paciente. Basándose en el procesamiento del lipoaspirado, se estima que el paciente recibe una dosis inicial de células madre en un intervalo de entre aproximadamente $5,5 \times 10^4$ células madre y $5,5 \times 10^5$ células madre. El paciente recibe dos dosis complementarias a intervalos de 12 horas tras la administración inicial. Las células madre se administran al paciente a través de un catéter venoso central. Para favorecer el injerto celular en la región objetivo, se controla el flujo de las células madre mediante un globo localizado después del sitio objetivo y mediante un globo localizado antes del sitio objetivo, para crear regiones de flujo sanguíneo bajo o mínimo.

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

REFERENCIAS

Abbate, A., Biondi-Zoccai, G.G., y Baldi, A. (2002). "Pathophysiologic role of myocardial apoptosis in post-infarction left ventricular remodeling". *J Cell Physiol* 193, 145-53.

Aharinejad, S., Marks, S.C., Jr., Bock, P., Mason-Savas, A., MacKay, C.A., Larson, E.K., Jackson, M.E., Luftensteiner, M., y Wiesbauer, E. (1995). "CSF-1 treatment promotes angiogenesis in the metaphysics of osteopetrotic (toothless, tl) rats". *Bone* 16, 315-324.

Alison, M. (1998). "Liver stem cells: a two compartment system" *Curr Opin Cell Biol* 10, 710-5.

American-Heart-Association (2002). *Heart Disease and Stroke Statistics-2003 Update*. (Dallas, Texas: American Heart Association).

Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z., y Lindvall, O. (2002). "Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke". *Nat Med* 8, 963-70.

Asahara, T., Takahashi, T., Masuda, H., Kalka, C., Chen, D., Iwaguro, H., Inai, Y., Silver, M., y Isner, J.M. (1999). "VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells". *Embo J* 18, 3964-72.

Ashjian, P.H., Elbarbary, A.S., Edmonds, B., DeUgarte, D., Zhu, M., Zuk, P.A., Lorenz, H.P., Benhaim, P., y Hedrick, M.H. (2003). "In vitro differentiation of human processed lipoaspirate cells into early neural progenitors". *Plast Reconstr Surg* 111, 1922-31.

Asken, S. (1990). "Microliposuction and autologous fat transplantation for aesthetic enhancement of the aging face". *J Dermatol Surg Oncol* 16, 965-72.

Asou, Y., Rittling, S.R., Yoshitake, H., Tsuji, K., Shinomiya, K., Nifuji, A., Denhardt, D.T., y Noda, M. (2001). "Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoclasts, and resorption in ectopic bone". *Endocrinology* 142, 1325-1332.

Assady, S., Maor, G., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Skorecki, K.L., y Tzukerman, M. (2001). "Insulin production by human embryonic stem cells". *Diabetes* 50, 1691-7.

Assmus, B., Schachinger, V., Teupe, C., Britten, M., Lehmann, R., Dobert, N., Grunwald, F., Aicher, A., Urbich, C., Martin, H., Hoelzer, D., Dimmeler, S., y Zeiher, A.M. (2002). "Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction (TOPCARE-AMI)". *Circulation* 106, 3009-17.

Athanasopoulos, T., Fabb, S., y Dickson, G. (2000). "Gene therapy vectors based on adeno-associated virus: characteristics and applications to acquired and inherited diseases (review)". *Int J Mol Med* 6, 363-75.

Bagnato, A. y Spinella, F. (2003). "Emerging role of endothelin-1 in tumor angiogenesis". *Trends Endocrinol. Metab* 14, 44-50.

Banfi, A., Bianchi, G., Galotto, M., Cancedda, R., y Quarto, R. (2001). "Bone marrow stromal damage after chemo/radiotherapy: occurrence, consequences and possibilities of treatment". *LeukLymphoma* 42, 863-70.

Barker, J.N., Davies, S.M., DeFor, T., Ramsay, N.K., Weisdorf, D.J., y Wagner, J.E. (2001). "Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis". *Blood* 97, 2957-61.

- Barry, F.P., Boynton, R.E., Haynesworth, S., Murphy, J.M., y Zaia, J. (1999). "The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105)". *Biochem Biophys Res Commun* 265, 134-9.
- 5 Beecken, W.D., Kramer, W., y Jonas, D. (2000). "New molecular mediators in tumor angiogenesis". *J Cell Mol Med* 4, 262-269.
- Berdel, W.E., Fink, U., Thiel, E., Stunkel, K., Greiner, E., Schwarzkopf, G., Reichert, A., y Rastetter, J. (1982). "Purification of human monocytes by adherence to polymeric fluorocarbon. Characterization of the monocyte-enriched cell fraction". *Immunobiology* 163, 511-520.
- 10 Bickenbach, J.R y Dunnwald, M. (2000). "Epidermal stem cells: characteristics and use in tissue engineering and gene therapy". *Adv Dermatol* 16, 159-83.
- Bonner-Weir, S. y Sharma, A. (2002). "Pancreatic stem cells". *J Pathol.* 197, 519-526.
- Botta, M., Manetti, F., y Corelli, F. (2000). "Fibroblast growth factors and their inhibitors". *Curr. Pharm. Des* 6, 1897-1924.
- 15 Buschmann, IR., Busch, H.J., Mies, G., y Hossmann, K.A. (2003). "Therapeutic induction of arteriogenesis in hypoperfused rat brain via granulocyte-macrophage colony-stimulating factor". *Circulation* 108, 610-615.
- Caplan, A.I. y Bruder, S.P. (2001). "Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century". *Trends Mol Med* 7, 259-64.
- Caplan, A.I. y Goldberg, V.M. (1999). "Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissues". *Clin Orthop* 12-6.
- 20 Carano, R.A y Filvaroff, E.H. (2003). "Angiogenesis and bone repair". *Drug Discov. Today* 8, 980-989.
- Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis". *Nat Med* 6, 389-395.
- Civin, C.I., Strauss, L.C., Fackler, M.J., Trischmann, T.M., Wiley, J.M., y Loken, M.R (1990). "Positive stem cell selection--basic science". *Prog Clin Biol Res* 333, 387-401.
- Clarke, D. y Frisen, J. (2001). "Differentiation potential of adult stem cells". *Curr Opin Genet Dev* 11, 575-80.
- 25 Coleman, S.R. (1995). "Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations". *Aesthetic Plast Surg* 19, 421-5.
- Commons, G.W., Halperin, B., y Chang, C.C. (2001). "Large-volume liposuction: a review of 631 consecutive cases over 12 years". *Plast Reconstr Surg* 108, 1753-63.
- Crosby, H.A. y Strain.A.J. (2001). "Adult liver stem cells: bone marrow, blood, or liver derived?" *Gut* 48, 153-4.
- 30 D'Ippolito, G., Schiller, P.C., Ricordi, C., Roos, B.A., y Howard, G.A. (1999). "Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow". *J Bone Miner Res* 14, 1115-22.
- De Ugarte, DA., Ashjian, P.H., Elbarbary, A., y Hedrick, M.H. (2003). "Future of fat as raw material for tissue regeneration". *Ann Plast Surg* 50, 215-9.
- 35 Donovan, D., Brown, N.J., Bishop, E.T., y Lewis, C.E. (2001). "Comparison of three in vitro human 'angiogenesis' assays with capillaries formed in vivo". *Angiogenesis* 4, 113-121.
- Engelholm, S.A., Spang-Thomsen, M., Brunner, N., Nohr, I., y Vindelov, L.L. (1985). "Disaggregation of human solid tumors by combined mechanical and enzymatic methods". *Br J Cancer* 51, 93-8.
- Eppley, B.L., Smith, P.G., Sadove, A.M., y Delfino, J.J. (1990). "Experimental effects of graft revascularization and consistency on cervicofacial fat transplant survival". *J Oral Maxillofac Surg* 48, 54-62.
- 40 Eschenhagen, T., Didie, M., Munzel, F., Schubert, P., Schneiderbanger, K., y Zimmermann, W.H. (2002). "3D engineered heart tissue for replacement therapy". *Basic Res Cardiol* 97 Supl. 1, 1146-1152.
- Falla, N., Van, V., Bierkens, J., Borremans, B., Schoeters, G., y Van Gorp, U. (1993). "Characterization of a 5-fluorouracil-enriched osteoprogenitor population of the murine bone marrow". *Blood* 82, 3580-91.
- Folkman, J. (1995). "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease". *Nat Med* 1, 27-31.
- 45 Formanek, M., Temmel, A., Knerer, B., Willheim, M., Millesi, W., y Kornfehl, J. (1998). "Magnetic cell separation for purification of human oral keratinocytes: an effective method for functional studies without prior cell subcultivation".

- Eur Arch. Otorhinolaryngol. 255, 211-215.
- Fukuda, K. (2001). "Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering". *Artif Organs* 25, 187-93.
- 5 Gaustad, K.G., Boquest, A.C., Anderson, B.E., Gerdes, A.M., y Collas, P. (2004). "Differentiation of human adipose tissue stem cells using extracts of rat cardiomyocytes". *Biochem. Biophys. Res Commun.* 314, 420-427.
- Geisellhart, A., Neu, S., Buchholz F., Lang, P., Niethammer, D., y Handgretinger, R. (1996). "Positive selection of CD56+ lymphocytes by magnetic cell sorting". *Nat Immun.* 15, 227-233.
- Gimble, J.M., Morgan, C., Kelly, K., Wu, X., Dandapani, V., Wang, C.S., y Rosen, V. (1995). "Bone morphogenetic proteins inhibit adipocyte differentiation by bone marrow stromal cells". *J Cell Biochem* 58, 393-402.
- 10 Graepler, F., Lauer, U., y Gregor, M. (1998). "Magnetic cell sorting for parietal cell purification using a new monoclonal antibody without influence on cell function". *J Biochem. Biophys. Methods* 36, 143-155.
- Greenberg, A.W. y Hammer, D.A. (2001). "Cell separation mediated by differential rolling adhesion". *Biotechnol Bioeng* 73, 111-24.
- 15 Gryn, J., Shaddock, R.K., Lister, J., Zeigler, Z.R., y Raymond, J.M. (2002). "Factors affecting purification of CD34 (+) peripheral blood stem cells using the Baxter Isolex 300i". *J Hematother Stem Cell Res* 11, 719-30.
- Hagege, A.A., Camion, C., Menasche, P., Vilquin, J.T., Duboc, D., Marolleau, J.P., Desnos, M., y Bruneval, P. (2003). "Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast grafts in ischaemic cardiomyopathy". *Lancet* 361, 491-2.
- 20 Hanada, K., Dennis, J.E., y Caplan, A.I. (1997). "Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells". *J Bone Miner Res* 12, 1606-14.
- Hemstreet, G.P.3., Enoch, P.G., y Pretlow, T.G.2. (1980). "Tissue disaggregation of human renal cell carcinoma with further isopyknic and isokinetic gradient purification". *Cancer Res* 40, 1043-9.
- 25 Horwitz, E.M., Prockop, D.J., Gordon, P.L., Koo, W.W., Fitzpatrick, L.A., Neel, M.D., McCarville, M.E., Orchard, P.J., Pyeritz, R.E., y Brenner, M.K. (2001). "Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta". *Blood* 97, 1227-31.
- Ito, Y. y Shinomiya, K. (2001). "A new continuous-flow cell separation method based on cell density: principle, apparatus, and preliminary application to separation of human buffy coat". *J Clin Apheresis.* 16, 186-191.
- 30 Jacobson, L., Kahan, B., Djamali, A., Thomson, J., y Odorico, J.S. (2001). "Differentiation of endoderm derivatives, pancreas and intestine, from rhesus embryonic stem cells". *Transplant Proc* 33, 674.
- Jaiswal, R.K., Jaiswal, N., Bruder, S.P., Mbalaviele, G., Marshak, D.R, y Pittenger, M.F. (2000). "Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase". *J Biol Chem* 275, 9645-52.
- 35 Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W.C., Largaespada, D.A., y Verfaillie, C.M. (2002a). "Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow". *Nature* 418, 41-9.
- Jiang, Y., Vaessen, B., Lenvik, T., Blackstad, M., Reyes, M., y Verfaillie, C.M. (2002b). "Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain". *Exp Hematol* 30, 896-904.
- 40 Joyner, C.J., Triffitt, J., Puddle, B., y Athanasou, N.A. (1999). "Development of a monoclonal antibody to the aP2 protein to identify adipocyte precursors in tumours of adipose differentiation". *Pathol. Res Pract.* 195, 461-466.
- Katz, A.J., Hedrick, M.H., Llull, R., y Futrell, J.W. (2001a). "A novel device for the simple and efficient refinement of liposuctioned tissue". *Plast Reconstr Surg* 107, 595-7.
- Katz, B.E., Bruck, M.C., y Coleman, W.P.3. (2001b). "The benefits of powered liposuction versus traditional liposuction: a paired comparison analysis". *Dermatol Surg* 27, 863-7.
- 45 Kaushal, S., Amiel, G.E., Guleserian, K.J., Shapira, O.M., Perry, T., Sutherland, F.W., Rabkin, E., Moran, A.M., Schoen, F.J., Atala, A., Soker, S., Bischoff, J., y Mayer, J.F., Jr. (2001). "Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo". *Nat Med* 7, 1035-40.
- Kawamoto, A., Gwon, H.C., Iwaguro, H., Yamaguchi, J.I., Uchida, S., Masuda, H., Silver, M., Ma, H., Kearney, M., Isner, J.M., y Asahara, T. (2001). "Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for

- myocardial ischemia". *Circulation* 103, 634-7.
- 5 Kawamoto, A., Tkebuchava, T., Yamaguchi, J., Nishimura, H., Yoon, Y.S., Milliken, C., Uchida, S., Masuo, O., Iwaguro, H., Ma, H., Hanley, A., Silver, M., Kearney, M., Losordo, D.W., Isner, J.M., y Asahara, T. (2003). "Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia". *Circulation* 107, 461-8.
- Kobari, L., Giarratana, M.C., Pflumio, F., Izac, B., Coulombel, L., y Douay, L. (2001). "CD133+ cell selection is an alternative to CD34+ cell selection for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells". *J Hematother Stem Cell Res* 10, 273-281.
- 10 Lamouille, S., Mallet, C., Feige, J.J., y Bailly, S. (2002). "Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis". *Blood* 100, 4495-4501.
- Lasch, J., Kullertz, G., y Opalka, J.R. (2000). "Separation of erythrocytes into age-related fractions by density or size? Counterflow centrifugation". *Clin Chem Lab Med* 38, 629-632.
- Lehner, M. y Holter, W. (2002). "Endotoxin-free purification of monocytes for dendritic cell generation via discontinuous density gradient centrifugation based on diluted Ficoll-Paque Plus". *Int Arch. Allergy Immunol.* 128, 73-76.
- 15 Lennon, D.P., Haynesworth, S.E., Young, R.G., Dennis, J.E., y Caplan, A.I. (1995). "A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells". *Exp Cell Res* 219, 211-22.
- Lieberman, J.R., Le, L.Q., Wu, L., Finerman, G.A., Berk, A., Witte, O.N., y Stevenson, S. (1998). "Regional gene therapy with a BMP-2-producing murine stromal cell line induces heterotopic and orthotopic bone formation in rodents". *J Orthop Res* 16, 330-9.
- 20 Lind, M. (1998). "Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation". *Acta Orthop Scand Suppl.* 283, 2-37.
- Luskey, B.D., Lim, B., Apperley, J.F., Orkin, S.H., y Williams, D.A. (1990). "Gene transfer into murine hematopoietic stem cells and bone marrow stromal cells". *Ann NY Acad Sci* 612, 398-406.
- 25 Lutun, A., Tjwa, M., Moons, L., Wu, Y., Angelillo-Scherrer, A., Liao, F., Nagy, J.A., Hooper, A., Priller, J., De Klerck, B., Comperolle, V., Daci, E., Bohlen, P., Dewerchin, M., Herbert, J.M., Fava, R., Matthys, P., Carmeliet, G., Collen, D., Dvorak, H.F., Hicklin, D.J., y Carmeliet, P. (2002). "Revascularization of ischemic tissues by P1GF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1". *Nat Med* 8, 831-40.
- 30 Mainwaring, G. y Rowley, A.F. (1985). "Separation of leucocytes in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*) using density gradient centrifugation and differential adhesion to glass coverslips". *Cell Tissue Res* 241, 283-90.
- Majumdar, M.K., Thiede, M.A., Mosca, J.D., Moorman, M., y Gerson, S.L. (1998). "Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells". *J Cell Physiol* 176, 57-66.
- 35 Marchlinski, F.E., Falcone, R., Iozzo, R.V., Reichek, N., Vassallo, J.A., y Eysmann, S.B. (1987). "Experimental myocardial cryoinjury: local electromechanical changes, arrhythmogenicity, and methods for determining depth of injury". *Pacing Clin Electrophysiol* 10, 886-901.
- Mills, J.D., Fischer, D., y Villanueva, F.S. (2000). "Coronary collateral development during chronic ischemia: serial assessment using harmonic myocardial contrast echocardiography". *J Am Coll Cardiol* 36, 618-624.
- 40 Mints, M., Blomgren, B., Falconer, C., y Palmblad, J. (2002). "Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) family in human endometrial blood vessels". *Scand. J Clin Lab Invest* 62, 167-175.
- Mizuno, H., Zuk, P.A., Zhu, M., Lorenz, H.P., Benhaim, P., y Hedrick, M.H. (2002). "Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells". *Plast Reconstr Surg* 109, 199-209.
- 45 Mohr, M., Dalmis, F., Hilgenfeld, E., Oelmann, E., Zuhlsdorf, M., Kratz-Albers, K., Nolte, A., Schmitmann, C., Onaldi-Mohr, D., Cassens, U., Serve, H., Sibrowski, W., Kienast, J., y Berdel, W.E. (2001). "Simultaneous immunomagnetic CD34+ cell selection and B-cell depletion in peripheral blood progenitor cell samples of patients suffering from B-cell non-Hodgkin's lymphoma". *Clin Cancer Res* 7, 51-57.
- Monteiro, P., Antunes, A., Goncalves, L.M., y Providencia, L.A. (2003). "Long-term clinical impact of coronary-collateral vessels after acute myocardial infarction". *Rev. Port. Cardiol* 22, 1051-1061.
- 50 Morizono, K., De Ugarte, D.A., Zhu, M., Zuk, P., Elbarbary, A., Ashjian, P., Benhaim, P., Chen, I.S., y Hedrick, M.H. (2003). "Multilineage cells from adipose tissue as gene delivery vehicles". *Hum. Gene Ther.* 14, 59-66.

- Mosca, J.D., Hendricks, J.K., Buyaner, D., Davis-Sproul, J., Chuang, L.C., Majumdar, M.K., Chopra, R., Barry, F., Murphy, M., Thiede, M.A., Junker, U., Rigg, R.J., Forestell, S.P., Bohnlein, E., Storb, R., y Sandmaier, B.M. (2000). "Mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery". *Clin Orthop* 71-90.
- 5 Muramatsu, T., Nakamura, A., y Park, H.M. (1998). "In vivo electroporation: a powerful and convenient means of nonviral gene transfer to tissues of living animals (Review)". *Int J Mol Med* 1, 55-62.
- Murry, C.E., Wiseman, R.W., Schwartz, S.M., y Hauschka, S.D. (1996). "Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis". *J Clin Invest* 98, 2512-23.
- Muschler, G.F., Nitto, H., Boehm, C.A., y Easley, K.A. (2001). "Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors". *J Orthop Res* 19, 117-25.
- 10 Nagy, J.A., Dvorak, A.M., y Dvorak, H.F. (2003). "VEGF-A(164/165) and P1GF: roles in angiogenesis and arteriogenesis". *Trends Cardiovasc Med* 13, 169-175.
- Nerem, R.M. y Ensley, A.E. (2004). "The tissue engineering of blood vessels and the heart". *Am j Transplant* 4 Supl. 6, 36-42.
- 15 Nishimori, M., Yamada, Y., Hoshi, K., Akiyama, Y., Hoshi, Y., Morishima, Y., Tsuchida, M., Fukuhara, S., y Kodera, Y. (2002). "Health-related quality of life of unrelated bone marrow donors in Japan". *Blood* 99, 1995-2001.
- Odorico, J.S., Kaufman, D.S., y Thomson, J.A. (2001). "Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines". *Stem Cells* 19, 193-204.
- Ohgushi, H. y Caplan, A.I. (1999). "Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering". *J Biomed Mater Res* 48, 913-27.
- 20 Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Bodine, D.M., Leri, A., y Anversa, P. (2001). "Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice". *Ann N Y Acad Sci* 938, 221-9.
- Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Bodine, D.M., Leri, A., y Anversa, P. (2003). "Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium". *Pediatr. Transplant.* 7 Supl. 3, 86-88.
- Pera, M.F., Reubinoff, B., y Trounson, A. (2000). "Human embryonic stem cells". *J Cell Sci* 113 (Pt 1), 5-10.
- 25 Pipp, F., Heil, M., Issbrucker, K., Ziegelhoeffer, T., Martin, S., van den, H.J., Weich, H., Fernandez, B., Golomb, G., Carmeliet, P., Schaper, W., y Clauss, M. (2003). "VEG FR-1-selective VEGF homologue P1 GF is arteriogenic: evidence for a monocyte-mediated mechanism". *Circ. Res* 92, 378-385.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., y Marshak, D.R. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells". *Science* 284, 143-7.
- 30 Prince, H.M., Bashford, J., Wall, D., Rischin, D., Parker, N., Toner, G.C., Seymour, J.F., Blakey, D., Haylock, D., Simmons, P., Francis, P., Wolf, M., Januszewicz, E.H., Richardson, G., Scarlett, J., y Briggs, P. (2002). "Isolex 300i CD34- selected cells to support multiple cycles of high-dose therapy". *Cytotherapy* 4, 137-45.
- 35 Qian, X., Jin, L., y Lloyd, R.V. (1998). "Percoll Density Gradient-Enriched Populations of Rat Pituitary Cells: Interleukin 6 Secretion, Proliferative Activity, and Nitric Oxide Synthase Expression". *Endocr. Pathol.* 9, 339-346.
- Quirici, N., Soligo, D., Bossolasco, P., Servida, F., Lumini, C., y Deliliers, G.L. (2002). "Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies". *Exp Hematol* 30, 783-91.
- Rajnoch, C., Chachques, J.C., Berrebi, A., Bruneval, P., Benoit, M.O., y Carpentier, A. (2001). "Cellular therapy reverses myocardial dysfunction". *J Thorac Cardiovasc Surg* 121, 871-8.
- 40 Rangappa, S., Fen, C., Lee, E.H., Bongso, A., y Wei, E.S. (2003). "Transformation of adult mesenchymal stem cells isolated from the fatty tissue into cardiomyocytes". *Ann Thorac. Surg* 75, 775-779.
- Remme, W.J. (2000). "Overview of the relationship between ischemia and congestive heart failure". *Clin Cardiol* 23, 4-8.
- 45 Reyes, M., Lund, T., Lenvik, T., Aguiar, D., Koodie, L., y Verfaillie, C.M. (2001). "Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells". *Blood* 98, 2615-2625.
- Ribatti, D., Vacca, A., Roccaro, A.M., Crivellato, E., y Presta, M. (2003). "Erythropoietin as an angiogenic factor". *Eur J Clin Invest* 33, 891-896.
- Russell, S.W., Doe, W.F., Hoskins, R.G., y Cochrane, C.G. (1976). "Inflammatory cells in solid murine neoplasms. I.

- Tumor disaggregation and identification of constituent inflammatory cells". *Int J Cancer* 18, 322-30.
- Scholz, D., Cai, W.J., y Schaper, W. (2001). "Arteriogenesis, a new concept of vascular adaptation in occlusive disease". *Angiogenesis*. 4, 247-257.
- 5 Scholz, D., Elsaesser, H., Sauer, A., Friedrich, C., Luttun, A., Carmeliet, P., y Schaper, W. (2003). "Bone marrow transplantation abolishes inhibition of arteriogenesis in placenta growth factor (P1GF) $-/-$ mice". *J Mol Cell Cardiol* 35, 177-184.
- Scholz, D., Ziegelhoeffer, T., Helisch, A., Wagner, S., Friedrich, C., Podzuweit, T., y Schaper, W. (2002). "Contribution of arteriogenesis and angiogenesis to postocclusive hindlimb perfusion in mice". *J Mol Cell Cardiol* 34, 775-787.
- 10 Schwartz, R.E., Reyes, M., Koodie, L., Jiang, Y., Blackstad, M., Lund, T., Lenvik, T., Johnson, S., Hu, W.S., y Verfaillie, C.M. (2002). "Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells". *J Clin Invest* 109, 1291-302.
- Schweitzer, C.M., van, der, Schoot, Ce, Drager, A.M., van, der, Valk, P, Zevenbergen, A., Hooibrink, B., Westra, A.H., y Langenhuijsen, M.M. (1995). "Isolation and culture of human bone marrow endothelial cells". *Exp Hematol* 23, 41-8.
- 15 Sekiya, I., Larson, B.L., Smith, J.R., Pochampally, R., Cui, J.G., y Prockop, D.J. (2002). "Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality". *Stem Cells* 20, 530-541.
- Sergeant, P., Blackstone, E., y Meyns, B. (1997). "Early and late outcome after CABG in patients with evolving myocardial infarction". *Eur J Cardiothorac. Surg* 11, 848-856.
- 20 Shigematsu, S., Yamauchi, K., Nakajima, K., Iijima, S., Aizawa, T., y Hashizume, K. (1999). "IGF-1 regulates migration and angiogenesis of human endothelial cells". *Endocr. J* 46 Supl. S59-S62.
- Smith, J.W. (1997). "Apheresis techniques and cellular immunomodulation". *Ther. Apher.* 1, 203-206.
- Smith, R.J. y Sweetenham, J.W. (1995). "A mononuclear cell dose of 3×10^8 /kg predicts early multilineage recovery in patients with malignant lymphoma treated with carmustine, etoposide, Ara-C and melphalan (BEAM) and peripheral blood progenitor cell transplantation". *Exp Hematol* 23, 1581-8.
- 25 Smits, G., Holzgreve, W., y Hahn, S. (2000). "An examination of different Percoll density gradients and magnetic activated cell sorting (MACS) for the enrichment of fetal erythroblasts from maternal blood". *Arch. Gynecol. Obstet.* 263, 160-163.
- 30 Sodian, R., Lemke, T., Fritsche, C., Hoerstrup, S.P., Fu, P., Potapov, E.V., Hausmann, H., y Hetzer, R. (2002). "Tissue-engineering bioreactors: a new combined cell-seeding and perfusion system for vascular tissue engineering". *Tissue Eng* 8, 863-870.
- Soli, M., Blanco, L., Riggert, J., Martinez-Clavel, A., Lucas, C., Lunghi, M., Belloni, M., Wolf, C., van Waeg, G., y Antoon, M. (2001). "A multicentre evaluation of a new filtration protocol for leucocyte depletion of high-haematocrit red blood cells collected by an automated blood collection system". *Vox Sang.* 81, 108-112.
- 35 Stamm, C., Westphal, B., Kleine, H.D., Petzsch, M., Kittner, C., Klinge, H., Schumichen, C., Nienaber, C.A., Freund, M., y Steinhoff, G. (2003). "Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration". *Lancet* 361, 45-46.
- 40 Strauer, B.E., Brehm, M., Zeus, T., Kostering, M., Hernandez, A., Sorg, R.V., Kogler, G., y Wernet, P. (2002). "Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans". *Circulation* 106, 1913-8.
- Sundberg, C., Kowanetz, M., Brown, L.F., Detmar, M., y Dvorak, H.F. (2002). "Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo". *Lab Invest* 82, 387-401.
- 45 Toma, J.G., Akhavan, M., Fernandes, K.J., Barnabe-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D.R., y Miller, F.D. (2001). "Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin". *Nat Cell Biol* 3, 778-84.
- Twentyman, P.R. y Yuhas, J.M. (1980). "Use of bacterial neutral protease for disaggregation of mouse tumours and multicellular tumor spheroids". *Cancer Lett* 9, 225-8.
- 50 Van, M., V, Meyer, E., Dosogne, H., y Burvenich, C. (2001). "Separation of bovine bone marrow into maturation-related myeloid cell fractions". *Vet. Immunol. Immunopathol.* 83, 11-17.

- Walther, W. y Stein, U. (2000). "Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases". *Drugs* 60, 249-71.
- Wang, L., Zeng, H., Wang, P., Soker, S., y Mukhopadhyay, D. (2003). "Neuropilin-1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-dependent endothelial cell migration". *J Biol Chem* 278, 48848-48860.
- 5 Watts, M.J., Somervaille, T.C., Ings, S.J., Ahmed, F., Khwaja, A., Yong, K., y Linch, D.C. (2002). "Variable product purity and functional capacity after CD34 selection: a direct comparison of the CliniMACS (v2.1) and Isolex 300i (v2.5) clinical scale devices". *Br J Haematol* 118, 117-23.
- Williams, S.K., McKenney, S., y Jarrell, B.E. (1995). "Collagenase lot selection and purification for adipose tissue digestion". *Cell Transplant* 4, 281-9.
- 10 Worster, A.A., Brower-Toland, B.D., Fortier, L.A., Bent, S.J., Williams, J., y Nixon, A.J. (2001). "Chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells sequentially exposed to transforming growth factor-beta1 in monolayer and insulin-like growth factor-I in a three-dimensional matrix". *J Orthop Res* 19, 738-49.
- Xiong, B., Gong, L.L., Zhang, F., Hu, M.B., y Yuan, H.Y. (2002). "TGF beta1 expression and angiogenesis in colorectal cancer tissue". *World J Gastroenterol*. 8, 496-498.
- 15 Ye, Q., Zund, G., Benedikt, P., Jockenhoevel, S., Hoerstrup, S.P., Sakyama, S., Hubbell, J.A., y Turina, M. (2000). "Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering". *Eur J Cardiothorac Surg* 17, 587-91.
- Young, H.E., Steele, T.A., Bray, R.A., Hudson, J., Floyd, J.A., Hawkins, K., Thomas, K., Austin, T., Edwards, C., Cuz-zourt, J., Duenzl, M., Lucas, P.A., y Black, A.C., Jr. (2001). "Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors". *Anat Rec* 264, 51-62.
- 20 Zimmermann, W.H., Didie, M., Wasmeier, G.H., Nixdorff, U., Hess, A., Melnychenko, I., Boy, O., Neuhuber, W.L., Weyand, M., y Eschenhagen, T. (2002). "Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats". *Circulation* 106, 1151-1157.
- Zimmermann, W.H., Melnychenko, I., y Eschenhagen, T. (2004). "Engineered heart tissue for regeneration of diseased hearts". *Biomaterials* 25, 1639-1647.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., y Hedrick, M.H. (2002). "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells." *Mol Biol Cell* 13, 4279-95.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., y Hedrick, M.H. (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies". *Tissue Eng* 7, 211-28.
- 30 Cualquier característica o combinación de características descritas en la presente memoria están incluidas dentro del alcance de la presente invención, con tal de que las características incluidas en cualquier combinación no sean mutuamente incoherentes, como será evidente a partir del contexto, de esta memoria descriptiva y del conocimiento de una persona de experiencia habitual en la técnica. Con el propósito de resumir la presente invención, ciertos aspectos, ventajas y características nuevas de la presente invención se han descrito en la presente memoria. Por supuesto, se debe entender que no necesariamente todos los aspectos, ventajas o características se realizarán en ninguna realización particular de la presente invención. Las ventajas y aspectos adicionales de la presente invención son evidentes en la descripción detallada y reivindicaciones siguientes.
- 35
- Las realizaciones anteriormente descritas se han proporcionado a modo de ejemplo, y la presente invención no se limita a estos ejemplos. A los expertos en la técnica se les ocurrirán múltiples variaciones y modificaciones de las realizaciones descritas, hasta un punto que no sea mutuamente excluyente, tras la consideración de la descripción anterior. Además, serán evidentes otras combinaciones, omisiones, sustituciones y modificaciones para el técnico experto a la vista de la descripción de la presente memoria. Por lo tanto, la presente invención no pretende estar limitada por las realizaciones descritas, sino que se debe definir mediante referencia a las reivindicaciones adjuntas.
- 40
- EQUIVALENTES**
- 45 Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar mediante el uso solamente de experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en la presente memoria. Las siguientes reivindicaciones pretenden abarcar tales equivalentes.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** El uso de una composición que comprende una población concentrada de células derivadas de tejido adiposo (ADC) en la fabricación de un medicamento para restablecer el flujo sanguíneo en un sujeto que se ha determinado que tiene una isquemia, en el que dicha población concentrada de células derivadas de tejido adiposo (ADC) comprende células progenitoras derivadas de tejido adiposo y células madre de tejido adiposo obtenidas procesando el tejido adiposo de dicho paciente en un sistema que está configurado para mantener una ruta de fluido/tejido cerrada estéril, y dicho sistema comprende una cámara de recogida conectada a una cámara de mezcla/procesamiento.
- 2.** El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha población concentrada de células comprende al menos 500 células progenitoras endoteliales/millón de células derivadas de tejido adiposo.
- 10 **3.** El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha afección isquémica comprende la insuficiencia cardíaca congestiva.
- 4.** El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha afección isquémica es infarto de miocardio.
- 5.** El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho sujeto es diabético.
- 6.** El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho sujeto es obeso.
- 15 **7.** El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha composición comprende una inyección rápida de dichas células derivadas de tejido adiposo.
- 8.** El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha composición proporciona entre 55.000 y 550.000 células madre derivadas de tejido adiposo.
- 20 **9.** El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha composición comprende además uno o más factores angiogénicos.
- 10.** El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha población de células se **caracteriza** por tener expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) cuando se cultiva.
- 11.** El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha población de células se **caracteriza** por tener expresión del factor de crecimiento de placenta (PLGF) cuando se cultiva.
- 25 **12.** El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha composición comprende además uno o más factores arteriogénicos.
- 13.** El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha composición comprende además uno o más factores inmunodepresores.
- 30 **14.** El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichas células derivadas de tejido adiposo no se cultivan en un cultivo.
- 15.** El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dichas células derivadas de tejido adiposo se cultivan en un cultivo celular.
- 16.** El uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dichas células derivadas de tejido adiposo se cultivan en condiciones de cultivo que favorecen la diferenciación hacia un fenotipo miocítico.
- 35 **17.** El uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicho fenotipo miocítico es un fenotipo miocítico cardíaco.
- 18.** El uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicho fenotipo miocítico es un fenotipo miocítico esquelético.
- 19.** El uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicho fenotipo miocítico es un fenotipo miocítico de músculo liso vascular.
- 40 **20.** El uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dichas células derivadas de tejido adiposo se cultivan en condiciones de cultivo que favorecen la diferenciación hacia un fenotipo endotelial.
- 21.** El uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que dicho cultivo celular se lleva a cabo en un material de soporte para generar una construcción bidimensional o tridimensional que se puede colocar sobre o dentro del corazón.
- 45 **22.** El uso de acuerdo con la reivindicación 21, en el que dicho material de soporte es reabsorbible in vivo.
- 23.** El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las células progenitoras endoteliales derivadas de tejido adiposo se modifican mediante transferencia génica.

- 5
- 24. El uso de acuerdo con la reivindicación 23, en el que dicha modificación altera la angiogénesis.
 - 25. El uso de acuerdo con la reivindicación 23, en el que dicha modificación altera la arteriogénesis.
 - 26. El uso de acuerdo con la reivindicación 23, en el que dicha modificación altera la apoptosis.
 - 27. El uso de acuerdo con la reivindicación 26, en el que dichas células progenitoras endoteliales derivadas de tejido adiposo modificadas se pueden diferenciar hasta miocitos cardiacos con una apoptosis alterada.
 - 28. El uso de acuerdo con la reivindicación 23, en el que dicha modificación altera las propiedades de guiado de dichas células derivadas de tejido adiposo.

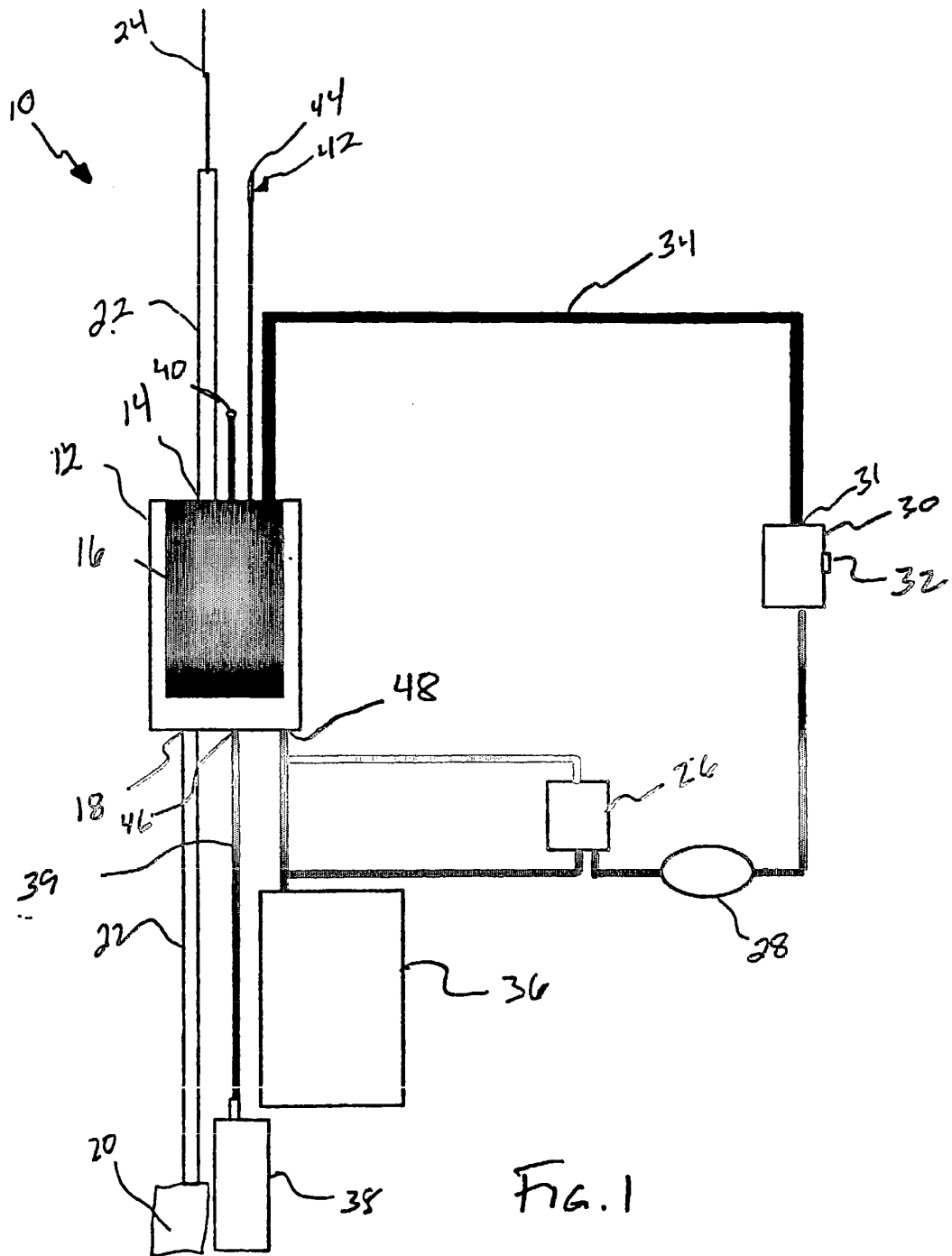


FIG. 1

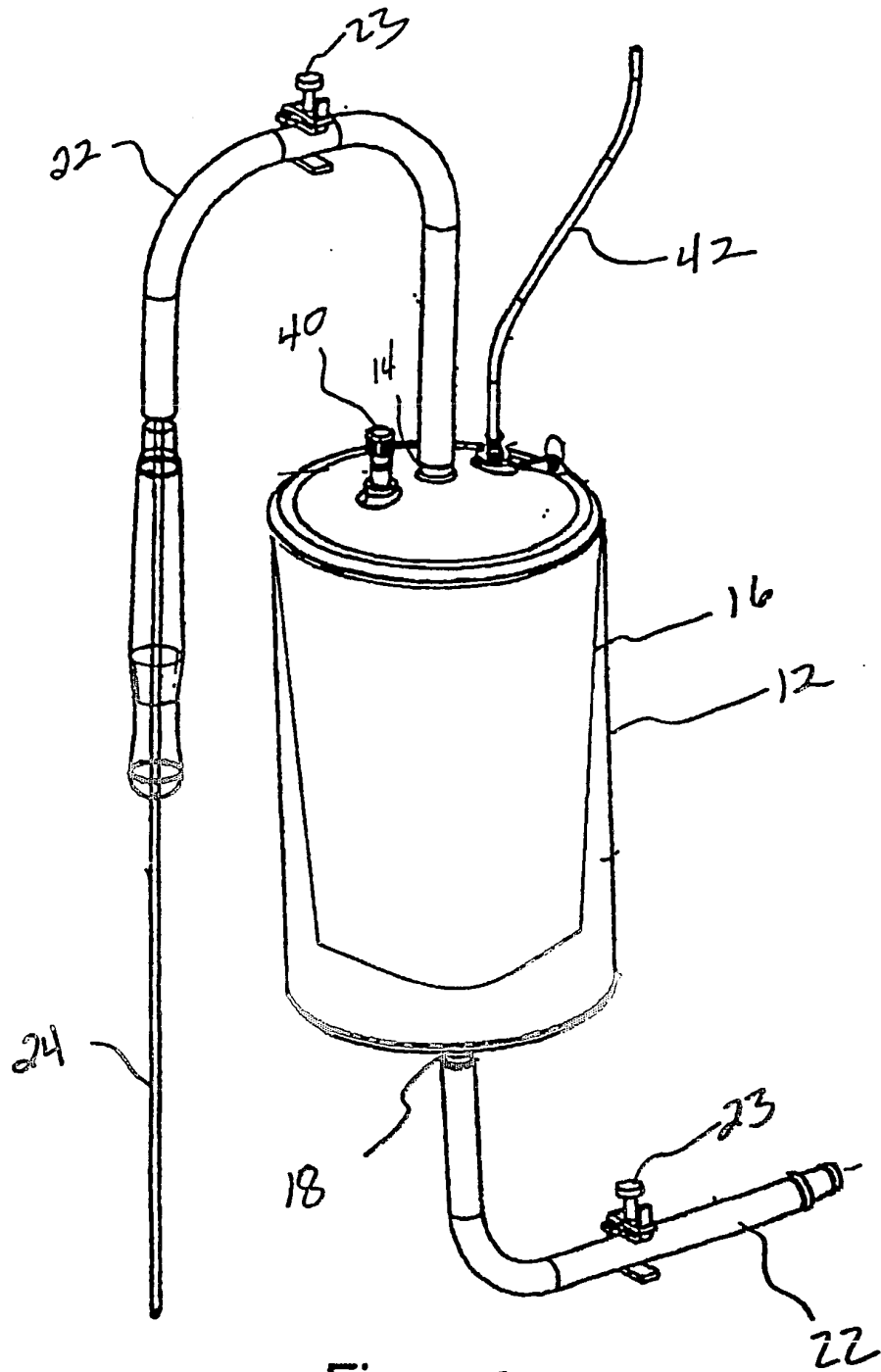


Fig. 2

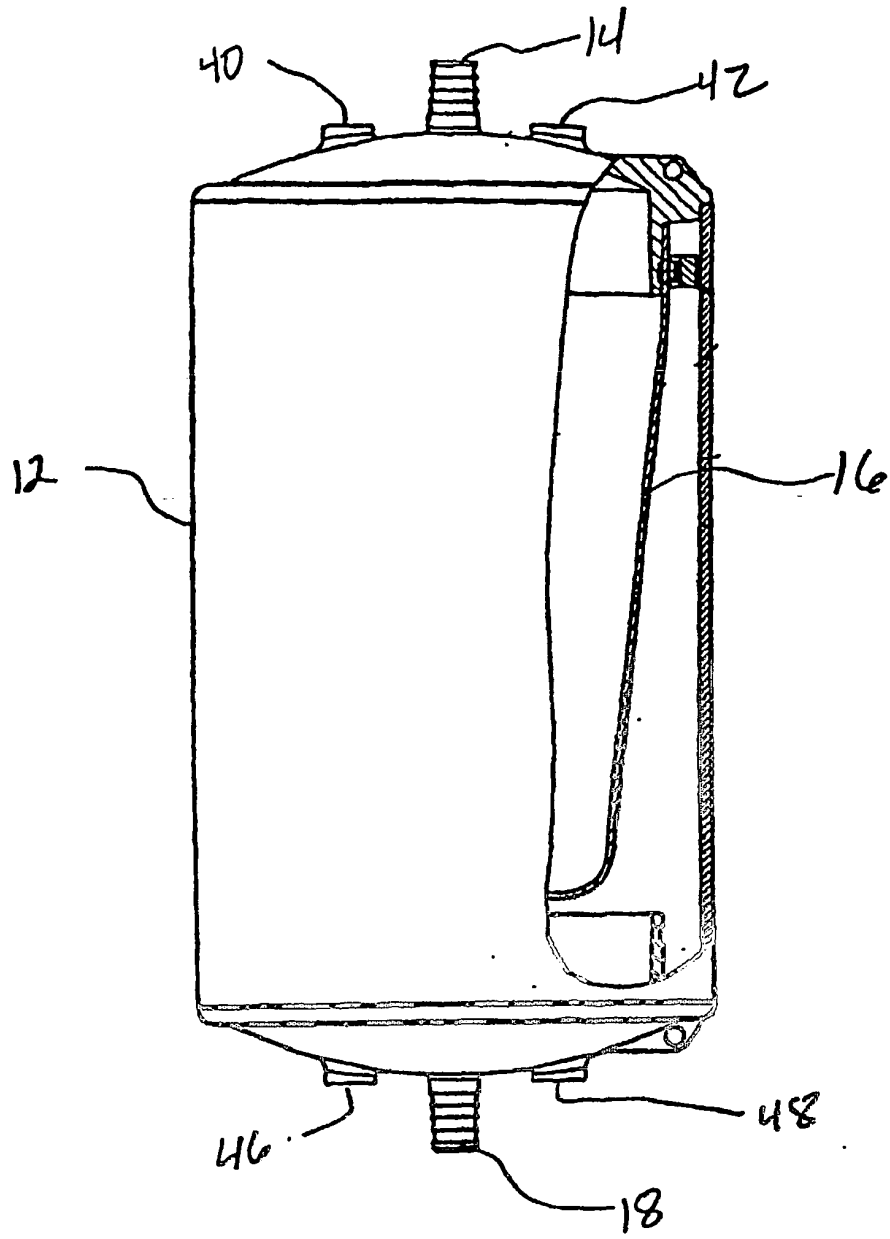


Fig. 3

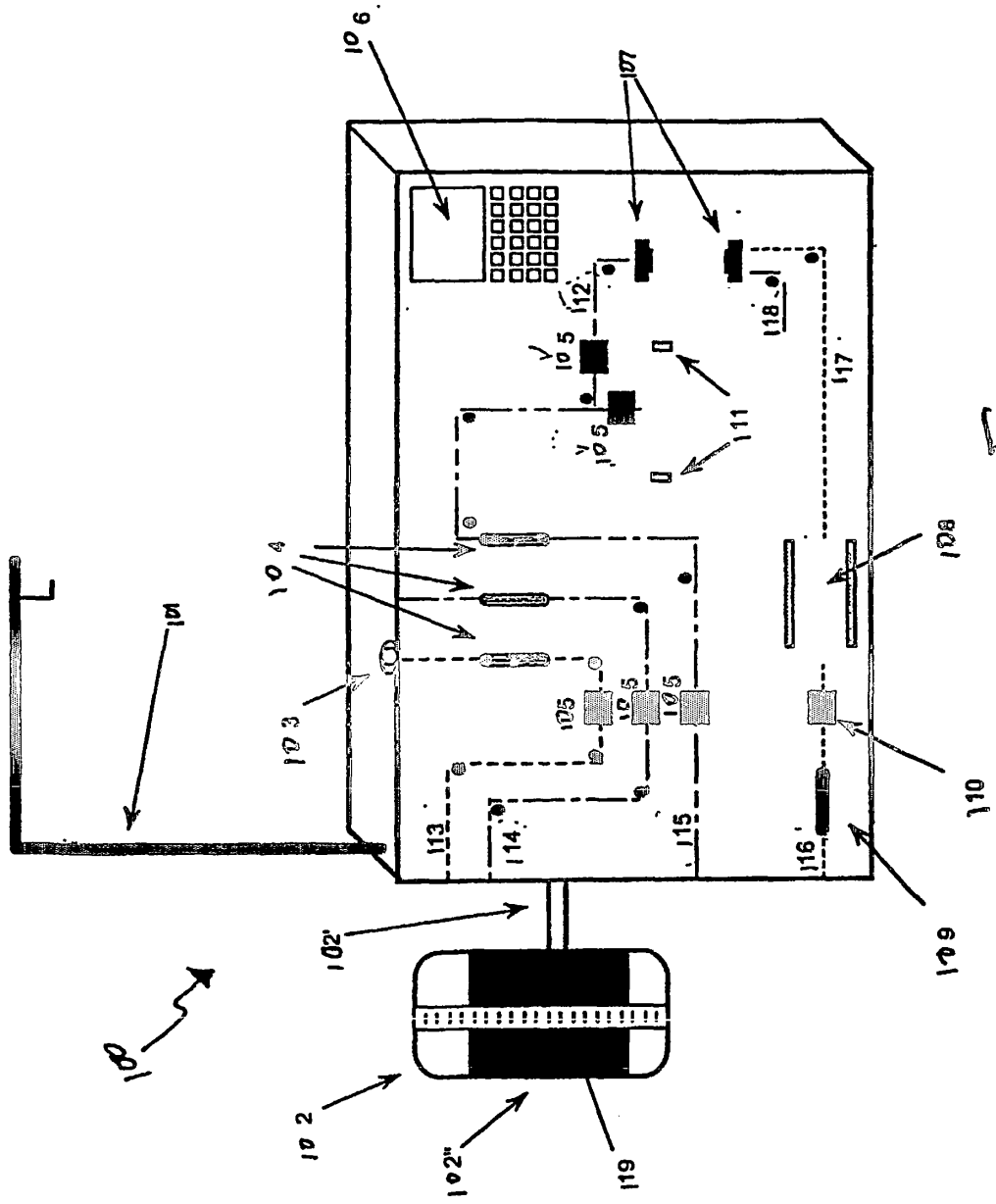


FIG. 4

FIGURA 5A

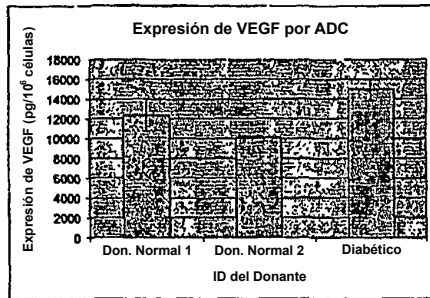


FIGURA 5B

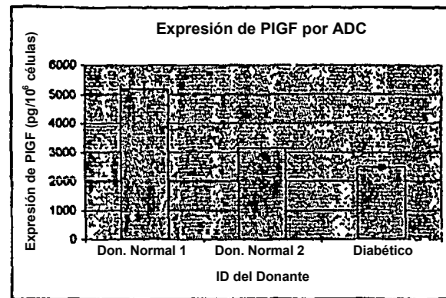


FIGURA 6

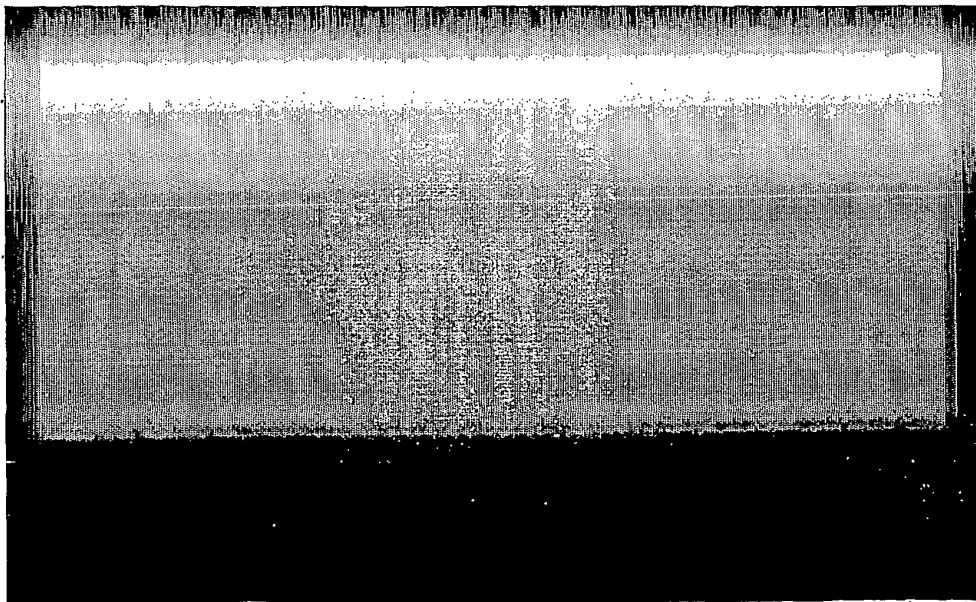


Figura 6: Tinción con UEA-1 de una colonia de EPC derivadas de ADC

FIGURA 7

Figura 7: Crecimiento de Estructuras Vasculares CD31-positivas de ADC de Ratones Normales y Tratados con STZ

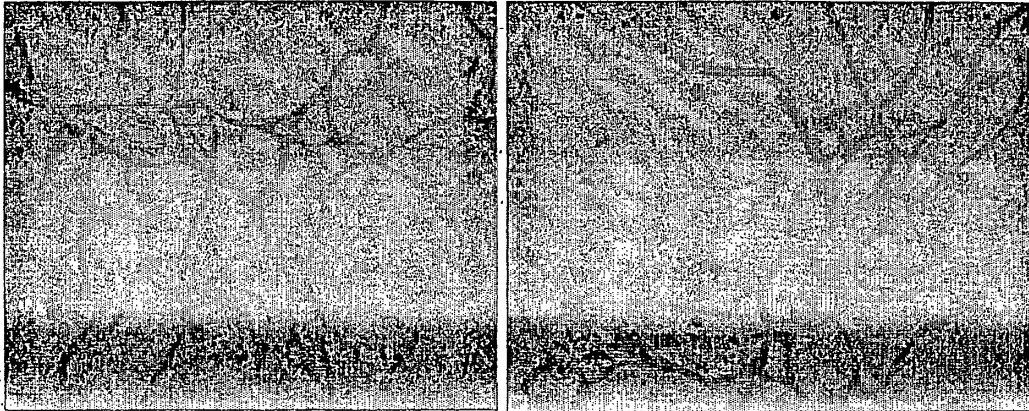


FIGURA 8

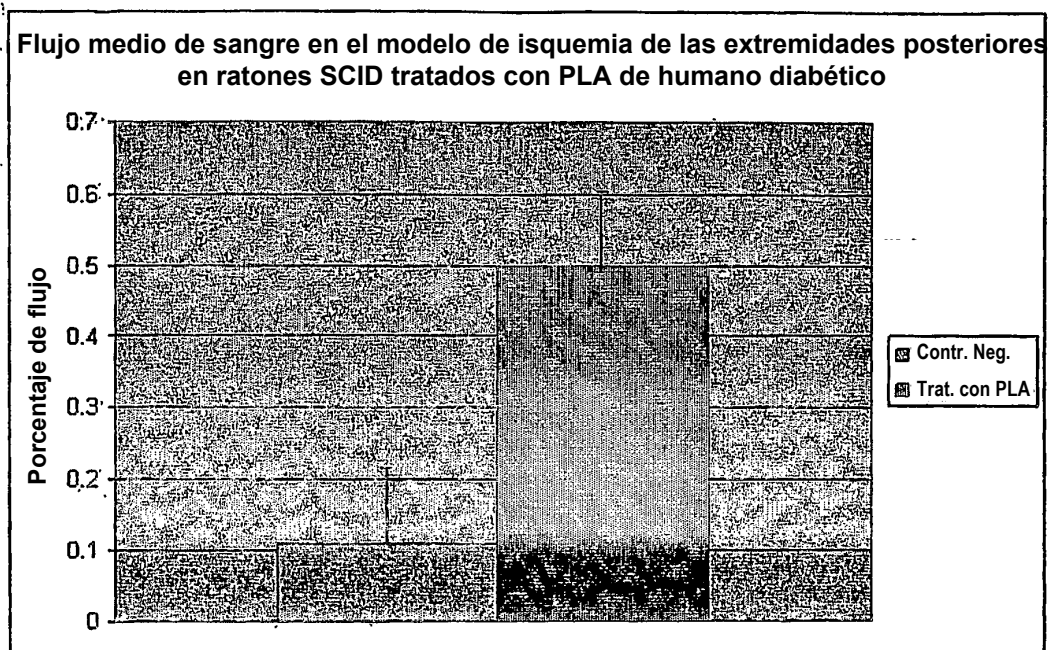


FIGURA 9A

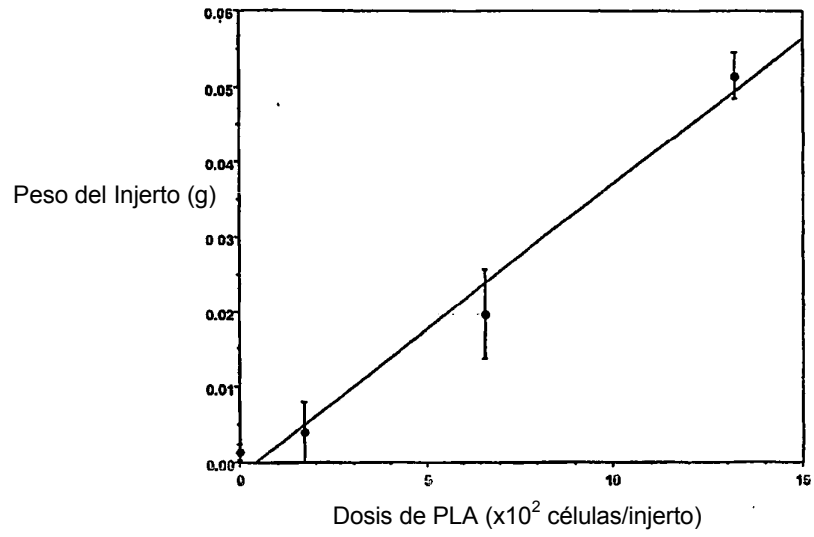
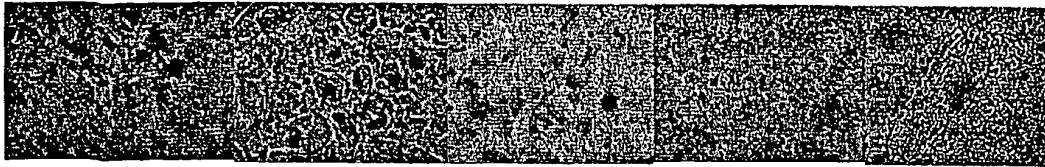


FIGURA 9B



FIGURA 10



Día 1

Día 7

Día 14

Día 28

Día 84

FIGURA 11

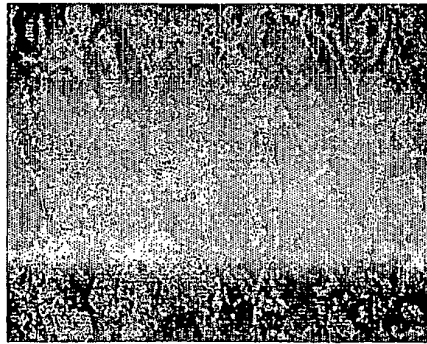


FIGURA 12

