

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 273**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.09.2012 E 12777875 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014 EP 2726602**

54 Título: **Proceso de alta seguridad para la preparación de fracciones de células madre purificadas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.12.2014

73 Titular/es:

**SWISS STEM CELL FOUNDATION (100.0%)
Via in Pasquée 32
6925 Gentilino, CH**

72 Inventor/es:

**SOLDATI, GIANNI y
TALLONE, TIZIANO**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 525 273 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

Proceso de alta seguridad para la preparación de fracciones de células madre purificadas.

5 Las células madre están adquiriendo un interés creciente en la práctica cosmética y médica, junto con su capacidad para generar nuevos tejidos biológicos aplicables a pacientes que, por diversos motivos, han perdido estos tejidos o la capacidad de regenerarlos.

10 En particular, las células madre adultas, por ejemplo aquellas de origen lipídico o mieloide, han atraído un interés particular, debido a su potencia más controlable y también por estar exentas de las restricciones éticas aplicables a las embrionicas.

15 Un campo típico de uso para las células madre de origen lipídico es el de relleno tisular con fines cosméticos: aquí, el paciente que requiere el tratamiento dona una parte de su propio tejido adiposo (lipoaspirado); éste se procesa por un laboratorio que recupera la fracción celular purificada, siendo la última inyectada de nuevo en el paciente en las zonas del cuerpo que requieren relleno. La fracción celular obtenida se denomina Fracción Vascular Estromal (FVE) y representa el número total de células nucleadas extraídas del tejido adiposo. Típicamente, del 10 al 20% de estas células son células madre, también denominadas células madre mesenquimales. Son pluripotentes y capaces de reparar o regenerar varios tipos de tejidos humanos. El uso de tejido adiposo autólogo evita el riesgo de reacciones inmunes y rechazo del tejido. Además, estas células extraídas después pueden almacenarse congeladas durante largos periodos en nitrógeno líquido a disposición del donante para tratamientos adicionales que incluyan el uso de células madre en terapias con células madre humanas.

25 Se conocen en la técnica procesos para preparar fracciones celulares purificadas de origen de tejido adiposo.

Estos generalmente comprenden la recuperación del material adiposo sin procesar original, la extracción selectiva del componente de células madre, la eliminación de la matriz lipídica agotada, y el lavado final, purificación y preparación de la fracción de células madre en una concentración y volumen convenientes. Estos procesos, que implican el paso del material que contiene células madre a través de varias pipetas, tubos, vasos de precipitados, etc., implican un riesgo considerable de contaminación bacteriana y/o pérdida de material: por lo tanto, requieren procedimientos muy estrictos en cuanto a la esterilidad del entorno y a los diferentes materiales usados, múltiples lavados para recuperar el material posiblemente adherido, todo ello sumándose al coste total del proceso. Las múltiples transferencias de recipientes también aumentan el riesgo de intercambio accidental de muestras de diferentes pacientes, exponiendo al receptor de las células madre final al riesgo de una transfusión no autóloga.

35 El procedimiento anterior también requiere una colaboración estricta y un entendimiento entre el operador que recoge la materia prima lipídica y el laboratorio que aísla las células madre. A veces, la materia prima se envía en recipientes no óptimos (por ejemplo, demasiado grandes, sin un apropiado cierre hermético, envasados erróneamente, en cantidades que no son óptimas, etc.): en todos estos casos, el laboratorio está obligado a trabajar con una muestra de partida sub-óptima, lo que puede afectar a la calidad del producto final.

40 El objetivo de la invención es proporcionar un proceso mejorado para preparar fracciones de células madre de origen de tejido adiposo, que es más seguro para el paciente y más rápido para el operador del proceso.

45 Un objetivo adicional es simplificar/estandarizar la interfaz y la cooperación entre los operadores que recogen la materia prima lipídica, y los encargados del aislamiento de células madre.

50 Un objetivo adicional es reducir el número de etapas y manipulaciones implicadas en los procesos para producir fracciones celulares purificadas.

Un objetivo adicional es hacer más rápidos y eficaces los procedimientos médicos/cosméticos que implican el uso de células madre.

RESUMEN

55 La presente invención se refiere a un proceso para obtener fracciones de células madre de origen adiposo, básicamente en base a las etapas de:

- 60 (a) Recoger o recibir una muestra de tejido adiposo que contiene células madre;
- (b) Lavar la muestra obtenida en la etapa (a) con un tampón acuoso adecuado;
- (c) Incubar la muestra obtenida en la etapa (b) con una enzima capaz de extraer las células madre del tejido adiposo que las contienen;
- (d) Recuperar la fase acuosa del producto obtenido en la etapa (c);
- (e) Purificar la fase acuosa obtenida en la etapa (d);
- 65 (f) Valorar la fase acuosa obtenida en la etapa (e) y diluirla opcionalmente para obtener una fracción de células

madre final con una concentración y volumen deseados.

Una característica esencial de la invención consiste en que el material que contiene células madre se trata dentro del mismo dispositivo de recogida (denominado en el presente documento como "dispositivo de recogida individual" o "SCD"), a lo largo de al menos las etapas: (a), (b) y (c) del proceso descrito en el presente documento. El uso del SCD evita el contacto del material tratado con la atmósfera externa, reduce al mínimo el riesgo de contaminación y la pérdida de material activo vinculado a las múltiples transferencias entre recipientes, y simplifica las manipulaciones totales requerida para obtener fracciones de células madre purificadas.

El SCD es un recipiente estéril capaz de extraer y liberar un líquido, es decir, una jeringa. El SCD puede tener un gran volumen de llenado (por ejemplo, de 20 a 100 ml), para permitir una recolección a gran escala de células madre del material lipídico correspondiente. Preferiblemente, es transparente o semi-transparente, con una marca que inclina el volumen de llenado óptimo, y/o zonas destinadas a la escritura o marcado, para identificar la fuente de la muestra.

Como será evidente a partir de la descripción, el SCD cumple las funciones de un dispositivo de recogida (como una pipeta), un separador de fases y un reactor de procesos, dependiendo de la etapa de proceso particular implicada; por lo tanto, todas estas funciones se realizan ventajosamente sin transferir la muestra de un recipiente a otro, y/o entrar en contacto con la atmósfera externa.

El SCD se usa básicamente a lo largo de las etapas (a), (b) y (c) del proceso: sin embargo, si se desea, el SCD puede mantenerse también a lo largo de una o más de las etapas (d), (e), (f), con las mismas funciones y ventajas que se han descrito anteriormente. En base a las premisas anteriores, el proceso de la invención comprende las siguientes etapas:

- (a) Recoger o recibir, en un SCD, una muestra de tejido adiposo que contiene las células madre;
- (b) En dicho SCD, lavar la muestra de la etapa (a) con un tampón acuoso adecuado;
- (c) En dicho SCD, incubar la muestra de la etapa (b) con una enzima capaz de digerir el tejido adiposo y extraer del mismo las células madre;
- (d) Recuperar la fase acuosa del producto de la etapa (c);
- (e) Purificar la fase acuosa obtenida en la etapa (d);
- (f) Valorar la fase acuosa obtenida en la etapa (e) y, si es necesario, diluirla para obtener una fracción de células madre final con una concentración y volumen deseados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Etapa (a):

En esta etapa, una muestra de tejido adiposo que contiene células madre se extrae de una fuente adecuada en el SCD.

Los lipoaspirados son muestras típicas de tejido adiposo. La muestra debe ser líquida, o al menos fluida, para el fin del presente proceso; los materiales no fluidos lo suficiente pueden convertirse tal como por homogeneización adicional y/o adición de medios líquidos, por ejemplo, soluciones tamponadas.

En la etapa (a) el SCD se pone en contacto con la muestra de tejido adiposo y se maneja para extraer un volumen adecuado de la misma; la extracción se detiene antes de llenar completamente el volumen disponible del SCD, permitiendo de esta manera una capacidad de extracción adicional (típicamente un medio del volumen del SCD) para lavar los tampones y otros reactivos que se describen a continuación.

La expresión "recoger o recibir" en la etapa (a) tiene en cuenta el hecho de que esta etapa puede realizarse por una institución/operador que es el mismo o diferente de los que realizan las otras etapas (b)-(f): en la primera opción, en la etapa (a) el operador "recoge" la muestra lipídica y la procesa directamente como en las etapas (b)-(f); en el segundo caso, el operador "recibe" la muestra lipídica, recogida por otra persona, y la procesa como en las etapas (b)-(f); típicamente, la etapa (a) puede realizarse por un hospital o un centro estético; las etapas (b)-(f) se realizan por un laboratorio especializado en el procesamiento de células madre.

En esta segunda opción, el presente proceso es particularmente ventajoso en que elimina una causa principal de contaminación que tiene lugar en los procesos conocidos en los que el lipoaspirado se recoge en un primer recipiente, se almacena, se envía a un laboratorio externo y después se transfiere a un reactor adecuado: todas estas transferencias/manipulaciones implican un contacto de la muestra con la atmósfera externa, con el riesgo asociado de la contaminación, junto con un porcentaje inevitable de pérdida de producto. Dichas desventajas y riesgos ahora se minimizan por el presente proceso.

El uso del SCD es adicionalmente ventajoso en que proporciona el operador inicial, es decir, el que recoge la

muestra lipídica, con un recipiente estandarizado, adaptado de forma adecuada para el procesamiento adicional desde el punto de vista del volumen de llenado, el volumen en vacío, estanqueidad, material de envasado, etc.

5 Las siguientes etapas pueden realizarse inmediatamente después de la etapa (a); como alternativa, el SCD llenado parcialmente se almacena durante un cierto tiempo, en condiciones que mantienen la viabilidad de las células madre, hasta el momento del procesamiento adicional según las etapas (b)-(f).

Etapa (b)

10 En esta etapa, la muestra lipídica extraída de la etapa (a) se lava en el interior del SCD, con una solución acuosa de tampón.

15 Para ello, el SCD llenado parcialmente de la etapa (a) se maneja para extraer un volumen de una solución de tampón, que se mezcla con la muestra de tejido adiposo presente en el interior del SCD; la mezcla homogénea de las dos fases puede facilitarse, por ejemplo, aplicando vibraciones/agitación al SCD. La solución de tampón usada es una compatible con las células madre, típicamente un tampón PBS complementado con sales de calcio y/o magnesio útiles como nutrientes enzimáticos; la relación en volumen de tampón con respecto al tejido adiposo es, por ejemplo, de aproximadamente 0,5:1,5 a aproximadamente 1,5:0,5; preferiblemente es de aproximadamente 1:1. Después de dicha mezcla/homogeneización, el SCD se mantiene inmóvil hasta que las dos fases (lipídica y acuosa) se separan. Después, el SCD se maneja para expulsar la fase acuosa mientras que retiene la fase lipídica: en particular, puede hacerse orientándolo en una posición descendente (la jeringa con la aguja abajo): esto hace que la fase lipídica se mueva en la sección superior de la jeringa, distal desde la aguja, mientras que los agregados de la fase acuosa en la sección opuesta, proximal a la aguja: en esta posición, una presión sobre el émbolo de la jeringa hace que la fase acuosa se expulse desde la aguja; la presión se mantiene adecuadamente hasta que la interfaz acuosa/lipídica alcanza la aguja: en este punto, la fase acuosa (que se va a desechar) se elimina sustancialmente, y la jeringa contiene únicamente la fase lipídica, tras lo cual se realiza la siguiente etapa.

20
25

30 La etapa de lavado que se ha descrito anteriormente puede repetirse más veces, por ejemplo, una o dos, hasta que se alcanza el grado deseado de lavado de la fase lipídica.

Etapa (c)

35 En esta etapa, la fase lipídica lavada de la etapa (b) se incuba en el SCD con una enzima capaz de extraer las células madre del material adiposo que las contiene.

40 Para realizar esta etapa, el SCD se maneja para extraer adicionalmente una alícuota de un medio líquido que contiene dicha enzima. La enzima es típicamente una liberasa. El medio líquido es típicamente un tampón, preferiblemente un tampón PBS optimizado para la actividad enzimática, en particular complementado con sales de calcio y/o magnesio; el medio líquido tiene una valoración enzimática conocida, permitiendo al operador extraer una cantidad deseada y reproducible de la enzima.

45 El SCD llenado de esta manera, insertado opcionalmente dentro de una envuelta cerrada herméticamente, se coloca después en una incubadora, típicamente una estufa de temperatura controlada proporcionada con una bandeja oscilante. Antes de la incubación, el SCD se agita preferiblemente para homogeneizar el contenido; después, la mezcla se continúa dentro de la incubadora, por el movimiento de oscilación de la bandeja.

50 La incubadora puede funcionar en las siguientes condiciones no exhaustivas: tiempo de incubación de 20-80 minutos, preferiblemente 30-60 minutos, mucho más preferiblemente 45 minutos; temperatura de 30 °C - 45 °C, preferiblemente a 37 °C; agitación: 1-5 rpm, preferiblemente 2 ó 3 rpm.

Etapa (d)

55 En esta etapa, la reacción enzimática se bloquea, la fase lipídica se elimina, y la fase acuosa (que contiene las células madre, liberada por la enzima) se recupera para un procesamiento adicional según las etapas (e)-(f).

Para realizar esta etapa, el SCD se retira de la incubadora y se extrae de la envuelta (usada opcionalmente); la suspensión incubada se mezcla con una alícuota de una solución de inactivación enzimática, por ejemplo, una solución de albúmina tamponada a una concentración adecuada, por ejemplo, el 1% en peso.

60 Un modo adecuado de mezcla de los dos líquidos consiste en extraer la solución de inactivación en el SCD, agitar el SCD para obtener una homogeneización completa, mantener inmóvil el SCD hasta que las fases lipídica y acuosa se separan, y recuperar la fase acuosa.

65 La recuperación de la fase acuosa puede hacerse expulsándola del SCD (modo expulsión), o, como alternativa, reteniéndola en el SCD (modo retención).

El "modo expulsión" puede realizarse orientando la jeringa en la posición descendente (aguja abajo): esto hace que la fase lipídica se mueva en la sección superior de la jeringa, distal de la aguja, mientras que los agregados de la fase acuosa en la sección opuesta, proximal a la aguja: en esta posición, una presión sobre el émbolo de la aguja hace que la fase acuosa se expulse de la aguja; la presión se mantiene adecuadamente hasta que la interfaz acuosa/lipídica alcanza la aguja: en este punto, la fase acuosa (que se va a recoger para el procesamiento adicional según las etapas (e)-(f)) se expulsa sustancialmente de la jeringa; la última contiene la fase lipídica privada de células madre que ahora puede expulsarse por separado y eliminarse.

Como alternativa al modo expulsión, el "modo retención" puede realizarse orientando la jeringa en la posición ascendente (aguja arriba): esto hace que la fase lipídica se mueva en la sección de la jeringa, proximal a la aguja, mientras que los agregados de la fase acuosa en la sección opuesta, distal de la aguja: en esta posición, una presión sobre el émbolo de la jeringa hace que la fase lipídica se expulse de la aguja; pueden usarse medios adecuados para evitar la dispersión de líquido expulsado de la jeringa orientada hacia arriba: por ejemplo, antes de la expulsión, la aguja puede insertarse a través del tapón de caucho de un matraz, en el que después se recoge el líquido expulsado. La presión se mantiene de forma adecuada hasta que la interfaz acuosa/lipídica alcanza la aguja: en este punto, la fase lipídica (que se va a desechar) se expulsa sustancialmente de la jeringa; la última contiene la fase acuosa pensada para un procesamiento adicional según las etapas (e)-(f).

Al final de la etapa (d), la fase acuosa se recupera del SCD y se trata por separado, a menos que el SCD tenga una forma y consistencia que permita su centrifugación: en este caso, las etapas de proceso posteriores también pueden realizarse en el SCD, añadiendo una protección/purificación adicional al proceso global.

El SCD vaciado, si no está adaptado para la centrifugación, se lava preferiblemente una o más veces con una solución apropiada (preferiblemente la solución de inactivación que se ha descrito anteriormente) para recuperar las células madre posibles que se adhieren a sus superficies, y todas las fases acuosas resultantes se combinan para su procesamiento adicional según las etapas (e)-(f)).

Etapa (e)

En esta etapa, las fases acuosas (combinadas) de la etapa (d) se purifican a partir de las posibles impurezas solubles/insolubles obtenidas a partir de la muestra adiposa original. La purificación se obtiene generalmente por centrifugación, eliminación del sobrenadante, re-suspensión del gránulo y filtración. La centrifugación puede realizarse generalmente: a una velocidad de 300-500 G, preferiblemente 350-450 G, más preferiblemente a 400 G; durante un tiempo de 1-10 minutos, preferiblemente 3-7 minutos, más preferiblemente durante 5 minutos.

Después de eliminar el sobrenadante, la re-suspensión del gránulo puede realizarse usando un tampón adecuado (por ejemplo, un tampón PBS) o la solución inactivante que se ha descrito anteriormente.

La centrifugación y re-suspensión anteriores pueden repetirse una o más veces para aumentar la purificación de la fracción particulada (de células madre) de las impurezas solubles en agua.

Después, el gránulo re-suspendido (finalmente) se filtra una o más veces, para eliminar las impurezas particuladas que son desmesuradas con respecto a la fracción de células madre. Para ello, el gránulo suspendido se filtra a través de una membrana con un tamaño de poro apropiado, por ejemplo 80-120 μm , preferiblemente aproximadamente 100 μm , que retiene el material particulado desmesurado, y que permite que las células madre (de tamaño inferior) pasen en el filtrado. El líquido resultante puede filtrarse de nuevo con filtros progresivamente más finos, por ejemplo 60-80 μm , preferiblemente aproximadamente 40 μm , para permitir una eliminación más fina del particulado desmesurado. El líquido finalmente filtrado, que contiene las células madre purificadas se procesa adicionalmente según la etapa (f).

Etapa (f)

En esta etapa, el líquido purificado de la etapa (e) se valora y después se diluye para obtener una fracción de células madre final con una concentración y volumen deseados.

La valoración puede hacerse separando un volumen preciso del líquido de la etapa (e) (por ejemplo 50 μl) y sometiéndolo a un recuento de células madre por medio de un aparato de recuento adecuado, típicamente un FACS con ventanas de análisis optimizadas para obtener recuentos de células madre mesenquimales procedentes de tejido adiposo; como alternativa, el contenido en células madre puede evaluarse de forma indirecta por medio de otros instrumentos, por ejemplo, un hemocitómetro: éste último cuenta el número total de células nucleadas que, en esta fase del proceso, se descubre que son células madre en un 10-20%. Preferiblemente, se toman y se promedian dos o más lecturas, para obtener una mayor precisión.

En base a su valoración conocida, el líquido de la etapa (e), si es necesario, puede diluirse para dar una concentración apropiada. La dilución puede realizarse usando un tampón adecuado (por ejemplo un tampón PBS) o

la solución inactivante que se ha descrito anteriormente. El valor de concentración final se escoge en función del nivel deseado de potencia de la fracción de células madre final; los valores de concentración de células madre útiles y no limitativos (expresados como células nucleadas totales) son de 10^8 a 10^4 células/ml, preferiblemente de 10^7 a 10^5 células/ml, más preferiblemente aproximadamente 10^6 células/ml.

Después, la fracción de células madre final puede envasarse en un recipiente adecuado (por ejemplo, una mini-jeringa) como una unidad con un volumen apropiado, por ejemplo 1 ml; el volumen final se escoge para que sea compatible y práctico con el sitio de administración (por ejemplo, relleno de arrugas, reconstrucción tisular, etc.) de la fracción de células madre final.

La fracción de células madre final se usa preferiblemente tan pronto como sea posible o, como alternativa, se almacena en condiciones adecuadas de esterilidad y temperatura, hasta el momento de empleo.

Puede usarse para cualquier aplicación en la que las células madre de origen adiposo sean útiles. Son ejemplos no limitativos en el campo de los tratamientos estéticos o reconstructivos, en particular el relleno tisular, cicatrización de heridas, reconstrucción tisular o de órganos.

Un procedimiento adecuado y no exhaustivo de acuerdo con la presente invención se describe como se indica a continuación.

EJEMPLO 1

1.1 Lavado con tampón PBS Ca/Mg

Una jeringa de 100 ml (SCD), que contiene 50 ml de lipoaspirado sin procesar, se llenó con 50 ml de un tampón PBS de Dulbecco convencional que contenía sales cálcicas y de magnesio. La jeringa (SCD) se invirtió 10 veces para homogeneizar el contenido, y después se mantuvo inmóvil en posición vertical (aguja abajo) durante aproximadamente 5 minutos, permitiendo que las fases acuosa y lipídica se separaran. Después, el émbolo de la jeringa se presiona para expulsar toda la fase (acuosa) inferior, reteniendo la fase lipídica en la jeringa. El procedimiento de lavado se repitió, y las fases acuosas expulsadas se desecharon.

1.2. Incubación con liberasa

La jeringa (SCD) resultante de la etapa 1.1 que contenía la fase lipídica lavada, se manejó para expulsar el reactivo enzimático hasta alcanzar una concentración de 0,28 unidades Wünsch/ml. El reactivo enzimático se preparó por adelantado a partir de una solución madre de 0,028 unidades Wünsch/ μ l de liberasa ("MNP-S" diluido en PBS de Dulbecco que contenía Calcio y Magnesio), diluida 1:500 v/v con el tampón PBS Ca/Mg que se ha descrito anteriormente.

La jeringa (SCD) llenada de este modo se manejó adicionalmente para extraer 20 ml de aire estéril, se invirtió 10 veces para homogeneizar el contenido; se cerró herméticamente en una envuelta y se puso en una incubadora con bandeja oscilante, calentada previamente a 37 °C. La incubación se realizó a 37 °C durante 45 minutos, con oscilación a 3 rpm.

1.3. Inactivación de liberasa

Tras la expiración del tiempo de incubación, la oscilación se interrumpió, la jeringa (SCD) se retiró de la incubadora, se liberó de la envuelta, y se añadió con un volumen igual de una solución al 1% en peso de albúmina en PBS de Dulbecco. La jeringa (SCD) llenada de este modo se manejó adicionalmente para extraer 5 ml de aire estéril y se invirtió 10 veces para homogeneizar el contenido; y después se mantuvo inmóvil en posición vertical (aguja abajo) durante aproximadamente 5 minutos, permitiendo que las fases acuosa y lipídica se separaran.

1.4. Recuperación de la fase acuosa

El émbolo de la jeringa (SCD) se presionó para expulsar toda la fase inferior (fase acuosa): esta fase, que contenía las células madre, se recuperó en un tubo de centrifuga (marcado con "1ª recuperación"). La fase lipídica que permanecía en la jeringa (SCD) se expulsó por separado y se desechó; después, la jeringa vacía (SCD) se lavó con una solución al 1% de albúmina, de acuerdo con el procedimiento que se ha descrito en el punto 1.3, y la solución de lavado se recogió en un tubo de centrifuga adicional (marcado con "2ª recuperación").

1.5. Primera centrifugación y re-suspensión del gránulo

Los dos tubos que se han obtenido en el punto 1.4, (1ª y 2ª recuperación) se centrifugaron a 400 G durante 5 minutos a 20 °C. Todos los sobrenadantes se eliminaron; los gránulos en los tubos de la 2ª recuperación se suspendieron de nuevo de forma manual con 20 ml de albúmina al 1% en PBS; la suspensión resultante se añadió a

los tubos de la 1ª recuperación y se usó para suspender de nuevo el gránulo presente en la misma.

1.6. Filtración, segunda centrifugación y re-suspensión del gránulo

5 La suspensión obtenida al final del punto 1.5. se filtró a través de dos etapas posteriores, usando filtros con un tamaño de poro de 100 y 40 μm , respectivamente. Los filtros se eliminaron. El líquido finalmente obtenido, que contenía las células madre, se centrifugó a 400 G, durante 5 minutos a 20 °C. El sobrenadante se eliminó y el gránulo se suspendió de nuevo con 5 ml de una solución al 1% de albúmina en PBS.

10 1.7. Valoración

Usando una pipeta de 1 ml, se recogieron dos muestras de 50 μl a partir de la suspensión filtrada que se ha obtenido en el punto 1.6 (Fracción Vascular Estromal, FVE) y se insertaron para su lectura en un hemocitómetro. Las dos lecturas (expresadas como células nucleadas totales, es decir GB/ml,) se promediaron para obtener una valoración
15 precisa de la solución.

También se realizó un conteo directo de las células madre en una muestra de 1 ml de la solución que se ha obtenido en el punto 1.6: la muestra se centrifugó a 1300 G durante 5 minutos; el sobrenadante se eliminó y el gránulo se suspendió de nuevo con 0,440 μl de tampón FACS (PBS + Suero Humano al 1%); después, la solución, incubada
20 durante 20 minutos con los anticuerpos adecuados y con la adición de Versalyse y una solución de conteo de células madre, se leyó en un citofluorómetro Navios, evaluando el número de células madre presente en la muestra y, a partir de ello, la concentración de células madre relevante.

25 1.8 Dilución a concentraciones convencionales y envasado

En base a la valoración que se ha medido en el punto 1.7., el resto de la solución que se ha obtenido en el punto 1.6. se diluyó con una solución al 5% de albúmina en PBS a concentraciones y volúmenes convenientes para
tratamientos con células madre prácticos. Un intervalo útil de concentración está entre 0,5 y 3×10^6 GB/ml. La
solución resultante, se subdividió finalmente en jeringas estériles de 1 ml, que después se envasaron y se cerraron
30 herméticamente para su expedición y entrega al usuario final.

REIVINDICACIONES

1. Proceso para preparar fracciones de células madre de origen de tejido adiposo, que comprende las etapas de:
- 5 (a) Recoger o recibir una muestra de tejido adiposo que contiene las células madre;
(b) Lavar la muestra de la etapa (a) con un tampón acuoso adecuado;
(c) Incubar la muestra de la etapa (b) con una enzima capaz de digerir el tejido adiposo y de extraer del mismo las células madre;
- 10 (d) Recuperar la fase acuosa del producto de la etapa (c);
(e) Purificar la fase acuosa obtenida en la etapa (d);
(f) Valorar la fase acuosa obtenida en la etapa (e) y, si es necesario, diluirla para obtener una fracción de células madre final con una concentración y volumen deseados
- 15 donde el material que contiene células madre se trata dentro de una jeringa a lo largo de al menos las etapas: (a), (b) y (c), realizando dicha jeringa las funciones de medio de recogida, separador de fases y reactor del proceso.
2. Proceso según la reivindicación 1, donde la jeringa tiene un volumen de llenado comprendido entre 20 y 100 ml.
- 20 3. Proceso según las reivindicaciones 1-2, donde la jeringa se proporciona con una o más marcas para indicar el volumen o volúmenes de llenado óptimos, y/o con áreas para de escritura o etiquetado.
4. Proceso según las reivindicaciones 1-3, donde el material adiposo es un lipoaspirado.
- 25 5. Proceso según las reivindicaciones 1-4, donde la etapa (a) y (b-d) respectivamente, se realizan por dos operadores diferentes en ubicaciones distantes entre sí.
6. Proceso según las reivindicaciones 1-5, donde en la etapa (b) el tampón es un tampón PBS complementado con nutrientes enzimáticos.
- 30 7. Proceso según las reivindicaciones 1-6, en el que las etapas (b) y/o (c) incluyen orientar la jeringa hacia abajo (aguja hacia abajo) o hacia arriba (aguja hacia arriba) seguido de expulsar la fase proximal a la aguja.
8. Proceso según las reivindicaciones 1-7, donde en la etapa (c) la enzima es una liberasa, y la incubación se realiza durante 20 a 80 minutos, a una temperatura de 30 °C a 45 °C.
- 35 9. Proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1-8, en el que en la etapa (d), la mezcla incubada se mezcla con una solución que contiene albúmina, después la fase adiposa se desecha y la fase acuosa se recupera para las etapas posteriores de proceso.
- 40 10. Proceso según las reivindicaciones 1-9, donde el material que contiene células madre se mantiene adicionalmente dentro de dicha jeringa durante una o más de las etapas (d)-(e).
- 45 11. Proceso según las reivindicaciones 1-10, donde la purificación en la etapa (e) se realiza por centrifugación (centrifugaciones) y/o filtración (filtraciones).
12. Proceso según las reivindicaciones 1-11, donde la fracción de células madre final se formula como una o más unidades de 1-5 ml, con una concentración de células nucleadas total comprendida entre 10^8 a 10^4 células/ml.