

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 385**

51 Int. Cl.:

C12M 3/06 (2006.01)

C12N 5/07 (2010.01)

A61K 35/28 (2015.01)

C12N 5/0775 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2002 E 07124088 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.05.2015 EP 1921133**

54 Título: **Sistema para procesamiento de células lipoaspiradas**

30 Prioridad:

07.12.2001 US 338856 P

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

10.09.2015

73 Titular/es:

**CYTORI THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
3020 Callan Road
San Diego, California 92121, US**

72 Inventor/es:

**FRASER, JOHN K. y
HEDRICK, MARC H.**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 545 385 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sistema para procesamiento de células lipoaspiradas

5 Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

10 La presente invención se refiere generalmente a sistemas para preparar y usar células madre derivadas de tejido adiposo.

2. Descripción de la técnica relacionada

15 La medicina regenerativa se puede definir como el aprovechamiento de los mecanismos de regeneración del organismo de una manera clínicamente dirigida, su uso en formas que no son parte del mecanismo normal de curación o amplificando de forma artificial mecanismos normales. Un ejemplo clásico de este proceso se encuentra en el trasplante de médula ósea, en el que las células madre y progenitoras hematopoyéticas se extraen de un donante y se colocan en un recipiente en el que los mecanismos regenerativos hematopoyéticos normales se han extirpado o básicamente se han suprimido o alterado, reemplazando o regenerando de este modo la capacidad del receptor para formar sangre (Thomas 1994). En estudios clínicos y preclínicos recientes este enfoque se ha ampliado al componente de células madre no hematopoyéticas de la médula ósea con estudios que regeneran tejidos (o que intentan regenerar tejidos) incluyendo el hueso (Connolly 1998; Horwitz, Prockop *et al.* 1999; Horwitz, Prockop *et al.* 2001), corazón (Fukuda 2001; Orlic, Kajstura *et al.* 2001; Orlic, Kajstura *et al.* 2001; Strauer, Brehm *et al.* 2002), e hígado (Avital, Inderbitzin *et al.* 2001). Estos estudios se han basado en la detección de la presencia de células madre y células precursoras endoteliales no hematopoyéticas en la médula ósea (Prockop, Azizi *et al.* 2000) (Pittenger, Mackay *et al.* 1999) (Shi, Rafii *et al.* 1998; Carmeliet y Luttun 2001).

30 Estos estudios usaron animales receptores de trasplante de médula ósea en los que las células del donante y anfitrionas se podían distinguir mediante marcadores genéticos para mostrar que alguna fracción de desarrollo de nuevos vasos sanguíneos en los receptores se derivaba de las células de médula ósea de donantes (Carmeliet y Luttun 2001) (Takahashi, Kalka *et al.* 1999; Murayama, Tepper *et al.* 2002). Aunque este trabajo demuestra definitivamente que la médula ósea contiene tales células, por lo general se ha ampliado para hacer referencia a que la médula ósea es por lo tanto el único tejido que contiene números relevantes de tales células en la medida en la que cuando un investigador detecta células precursoras endoteliales (EPC) o células madre de médula ósea (MSC) en la circulación se asume automáticamente que estas células se derivan necesariamente de la médula ósea. Por lo tanto, el concepto de que las poblaciones de células de otros tejidos podrían representar una fuente alternativa o quizás superior de poblaciones terapéuticamente relevantes de células no se dirige.

40 Se ha demostrado que el tejido adiposo contiene una población de células madre pluripotentes (Huang, Beanes *et al.* 2002; Mizuno, Zuk *et al.* 2002) (Zuk, Zhu *et al.* 2001). Zuk *et al.* (Zuk *et al.*, (In Press) Human Adipose Tissue Is A Source Of Multipotent Stem Cells, *Molecular Biology of the Cell*) y otros han demostrado previamente que este tejido es una fuente de células endoteliales (Kern, Knedler *et al.* 1983; Hutley, Herington *et al.* 2001) [documento de Patente de Estados Unidos N° 5.372.945 de Alchas *et al.*, 1994] (Huang, Beanes *et al.* 2002; Mizuno, Zuk *et al.*, 2002) (Zuk, Zhu *et al.* 2001). Zuk *et al.* (Zuk *et al.*, (en prensa) Tejido adiposo humano es una fuente de células madre pluripotentes, *Biología Molecular de la Célula.*) (Kern, Knedler *et al.*, 1983; Hutley, Herington *et al.* 2001) [documento de Patente de Estados Unidos N° 5.372.945, de Alchas *et al.*, 1994], aunque estos últimos documentos no examinan ni hablan en modo alguno de las células endoteliales precursoras.

50 Las células madre son las células maestras del organismo. Se sabe que las células madre de embriones o células madre embrionarias (ESC) se convierten en muchos, si no en todos los tipos de células y tejidos del organismo. Estas células fetales tempranas no solamente contienen toda la información genética del individuo, sino que también contienen la capacidad emergente de convertirse en cualquiera de las 200+ células y tejidos del organismo. La investigación en desarrollo sugiere que estas células tienen un enorme potencial científico y clínico.

55 Sin embargo, las ESC tienen limitaciones teóricas para su uso. Si se usan clínicamente se derivarían necesariamente de otro individuo, un embrión. Cuando las células madre o tejidos derivados de las mismas se trasplantan en otra persona, el receptor de las células puede necesitar fármacos inmunosupresores tóxicos por el para prevenir el rechazo. Además, otras células del individuo pueden portar virus u otras enfermedades raras pero significativas que se pueden transmitir al receptor. Además, se sabe que las células de tipo ESC (por ejemplo teratomas) forman tumores.

60 Recientemente, se han identificado células madre no embrionarias o adultas y representan una alternativa potencial importante para el uso clínico de las ESC. Estas células residen tranquilamente en muchos, si no todos los tejidos, presuntamente esperando responder a un traumatismo u otros procesos de enfermedad destructivos de modo que pueden curar el tejido lesionado. Evidencias científicas emergentes indican que cada individuo porta una

combinación de células madre que pueden compartir con las ESC la capacidad de convertirse en muchos, si no todos los tipos de células y tejidos.

Se ha demostrado que las poblaciones de células madre adultas están presentes en uno o más de piel, músculo, médula ósea, hígado, cerebro y tejido adiposo. Hasta la fecha la aplicación propuesta de tales células en ingeniería de tejidos implica el aumento del número, pureza y madurez de las células mediante procesos de purificación celular y cultivo celular. Estas etapas son necesarias para compensar la rareza de las células madre en la mayoría de los tejidos. Por ejemplo, la frecuencia de células madre mesenquimales en la médula ósea se estima entre 1 de 100.000 y 1 de 1 millón de células nucleadas. Del mismo modo, la extracción de células madre de la piel implica una complicada serie de etapas de cultivo celular durante varias semanas. El uso de células madre derivadas de músculo esquelético en ensayos clínicos de enfermedad cardíaca usa una fase de cultivo de dos a tres semanas en la que se aumenta el número de células hasta números clínicamente relevantes y se estimula la diferenciación celular en el músculo.

Estas etapas de expansión y diferenciación pueden proporcionar un aumento del número, pureza y madurez de las células, pero lo hacen así con un coste. Este coste puede incluir uno o más de: pérdida de la función celular debido al envejecimiento celular, pérdida de poblaciones de células no madre potencialmente útiles, retrasos en la aplicación potencial de células a pacientes, aumento del coste monetario y aumento del riesgo de contaminación de las células con microorganismos ambientales durante el cultivo. Aunque los datos humanos se están haciendo disponibles en la actualidad con células derivadas de médula ósea que no se han manipulado, sino que en su lugar se usan básicamente como médula ósea totalmente (Horwitz, Prockop *et al.* 1999; Horwitz, Prockop *et al.* 2001) (Strauer, Brehm *et al.* 2002), el beneficio clínico derivado ha sido subóptimo, un resultado casi verdaderamente relacionado con la dosis de células limitada y la pureza disponible de la médula ósea.

Se ha desarrollado un número de dispositivos para extraer células del tejido adiposo, pero estos dispositivos pueden sufrir de uno o más de incapacidad para acomodar de manera óptima un dispositivo de aspiración para retirar tejido adiposo, falta de automatización parcial o total de la recolección de la fase de tejido adiposo a través del procesamiento de fases de tejido, falta de capacidad de volumen superior a 100 ml de tejido adiposo, falta de un sistema parcial o completamente cerrado de la recolección de la fase de tejido adiposo a través del procesamiento de fases de tejido, y falta de capacidad para desechar componentes para atenuar los riesgos simultáneos de la contaminación cruzada del material de una muestra a otra.

El documento de patente EP0987325A1 desvela un sistema de separación celular y un método para la separación de células nucleadas de células no nucleadas dentro de una suspensión celular. En particular, el documento de patente EP0987325A1 desvela un sistema de separación celular que comprende medios porosos para capturar una célula capaces de capturar básicamente células nucleadas y permitir básicamente el paso a través de células no nucleadas. El sistema tiene una entrada y una salida y una línea para introducir una suspensión celular líquida de células nucleadas y no nucleadas en los medios porosos de captura de células, que está conectado corriente arriba hacia la entrada. El sistema también contiene una línea para introducir un líquido, es decir, de una cierta viscosidad, en los medios para capturar células que está conectado corriente abajo hacia la salida. El sistema incluye una línea para recuperación de células desde el lado de entrada de los medios que capturan células, que está conectado corriente arriba hacia la entrada de los medios que capturan de células.

Existe la necesidad de enfoques alternativos en los que una población de células activas con mayor rendimiento, consistencia y/o pureza se puede preparar rápidamente y de forma fiable, y mediante los que se puede reducir o eliminar la necesidad de manipulación después de la extracción de las células. Lo ideal sería que esta población celular se pudiera obtener de una manera que es adecuada para su colocación directa en un receptor.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a sistemas para uso de células derivadas de tejido adiposo que se colocan directamente en un receptor junto con tales aditivos necesarios para estimular, general, o apoyar un beneficio terapéutico, estructural, o cosmético.

El aspecto más amplio de la presente invención se refiere a una unidad de procesamiento de células madre derivadas de tejido adiposo autónomo (10), que comprende:

un recipiente para extracción de tejido que está configurado para recibir tejido adiposo sin procesar que se retira de un paciente, en la que dicho recipiente para extracción de tejido (12) se define mediante un sistema cerrado; un primer filtro (16) que está colocado dentro de dicho recipiente para extracción de tejido (12), en la que dicho primer filtro tiene un tamaño de poro de aproximadamente 20 μm a aproximadamente 5 mm y en la que dicho primer filtro está configurado para retener un primer componente de dicho tejido adiposo sin procesar y pasar un segundo componente de dicho tejido adiposo sin procesar, de modo que dicho primer filtro separa dicho primer componente de dicho segundo componente, and en la que dicho primer componente comprende una población de células que comprende células madre derivadas de tejido adiposo and dicho segundo componente comprende adipocitos lípidos, sanguíneos, maduros, y solución salina;

un recipiente para extracción de células (26), que está configurado para recibir dicho primer componente que comprende una población de células que comprende células madre derivadas de tejido adiposo de dicho recipiente para extracción de tejido (12), en la que dicho recipiente para extracción de células está dentro de dicho sistema cerrado;

un conducto configurado para permitir el paso de dicho primer componente que comprende una población de células que comprende células madre derivadas de tejido adiposo de dicho recipiente para extracción de tejido (12) a dicho recipiente para extracción de células árabes que se mantiene un sistema cerrado;

un concentrador celular colocado dentro de dicho recipiente para extracción de células (26), que está configurado para facilitar la concentración de dicho primer componente que comprende una población de células que comprende células madre derivadas de tejido adiposo para obtener una población concentrada de células que comprende células madre derivadas de tejido adiposo, en la que dicho concentrador celular comprende una centrífugadora o un filtro de membrana que gira; y

una salida (32) configurada para permitir la retirada aséptica de dicha población concentrada de células que comprende células madre derivadas de tejido adiposo.

En referencia a los métodos que se desvelan en el presente documento, el procesamiento de tejido adiposo se produce en un sistema que mantiene una vía de fluido/tejido cerrada, estéril. Esto se consigue mediante el uso de un conjunto unido, ensamblado previamente de recipientes cerrados, estériles y tubos que permiten la transferencia de elementos de tejido y fluido dentro de una vía cerrada. Este conjunto de procesamiento se puede unir a una serie de reactivos de procesamiento (por ejemplo, solución salina, enzimas, etc.) insertado en un dispositivo que puede controlar la adición de reactivos, temperatura, y tiempo de procesamiento liberando de este modo a los técnicos de la necesidad de gestionar el proceso de forma manual. En un ejemplo preferente que se desvela en el presente documento, todo el procedimiento desde la extracción del tejido hasta el procesamiento y colocación en el receptor se realizaría en la misma instalación, de hecho, incluso dentro de la misma habitación del paciente que experimenta el procedimiento.

En el presente documento se desvela un método, en el que se procesa tejido adiposo sin procesar hasta retirar básicamente adipocitos maduros y tejido conectivo obteniendo de este modo una pluralidad de células derivadas del tejido adiposo heterogéneas adecuadas para su colocación dentro del organismo de un receptor. Las células se pueden colocar en el receptor en combinación con otras células, tejido, fragmentos de tejido, otros estimulantes del crecimiento y/o diferenciación celular. Las células, con cualquiera de los aditivos que se han mencionado anteriormente, se pueden colocar en la persona de la que se obtuvieron en el contexto de un solo procedimiento de operación con la intervención de derivar un beneficio terapéutico, estructural, o cosmético al receptor.

Se desvela un método para tratar a un paciente, método que incluye las etapas de: a) proporcionar un sistema para retirada de tejido; b) retirar tejido adiposo de un paciente usando el sistema para retirada de tejido, teniendo el tejido adiposo 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 de su procesamiento; y d) administrar las células madre a un paciente sin retirar las células madre del sistema para retirada de tejido antes de su administración al paciente.

En el presente documento también se desvela un método para tratar a un paciente que incluye: a) proporcionar un sistema para retirada de tejido adiposo; b) retirar tejido adiposo de un paciente usando el sistema para retirada de tejido adiposo, teniendo el tejido adiposo una concentración de células madre; c) procesar el tejido adiposo para aumentar la concentración de células madre en el tejido adiposo; d) mezclar el tejido adiposo que tiene las células madre concentradas con otra parte unitaria de tejido adiposo; y e) administrar el tejido adiposo con el aumento de concentración de células madre a un paciente.

En el presente documento se desvela un sistema de acuerdo con la invención que incluye a) un recipiente para extracción de tejido que incluye i) un puerto de entrada para extraer tejido estructurado para recibir el tejido adiposo retirado de un paciente; y ii) un filtro colocado dentro del recipiente y que se estructura para retener tejido adiposo retirado de un paciente y para pasar tejido no adiposo retirado del paciente; b) un recipiente de mezcla acoplado al recipiente para extracción de tejido para recibir células madre obtenidas del tejido adiposo sin retirada de las células madre del sistema para retirada de tejido, y que incluye un puerto de aditivo para la administración de al menos un aditivo para su mezcla con las células madre contenidas en el mismo; y c) una salida estructurada para permitir que las células en el recipiente de mezcla se retiren del sistema para extracción de tejido para su administración a un paciente.

En el presente documento se desvela una composición que incluye una primera parte de tejido adiposo retirado de un paciente que tiene una concentración de células madre, y una segunda parte del tejido adiposo retirado del paciente que tiene una concentración de células madre superior a la de la primera parte de tejido adiposo.

Cualquier característica o combinación de características que se describen en el presente documento están incluidas dentro del alcance de la presente invención con la condición de que las características incluidas en cualquiera de tales combinaciones no sea mutuamente incoherente como será evidente a partir del contexto, esta

memoria descriptiva, y el conocimiento de una persona con experiencia habitual en la materia. Las ventajas y aspectos adicionales de la presente invención son evidentes en la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 representa un sistema para retirada de tejido para procesar tejido adiposo.

La Fig. 2 representa un recipiente para extracción de tejido del sistema para retirada de tejido de la Fig. 1.

La Fig. 3 es una vista de una sección transversa parcial del recipiente para extracción de tejido de la Fig. 2.

La Fig. 4 representa un dispositivo de procesamiento para automatizar el funcionamiento de un sistema para retirada de tejido.

La Fig. 5 es un gráfico que representa el peso del tejido frente a la dosis celular.

La Fig. 6 es un gráfico que representa los efectos del lipoaspirado procesado en ratones tratados con alcohol.

La Fig. 7 es una fotomicrografía de tejido hepático de un ratón tratado con alcohol que recibió lipoaspirado procesado.

Descripción detallada de las realizaciones preferentes en la actualidad

Ahora se hará referencia con detalle a las realizaciones de la invención preferentes en la actualidad, ejemplos de las cuales se ilustran en las figuras adjuntas. Siempre que sea posible, en las figuras se usan los mismos números de referencia o números similares y la descripción para hacer referencia a las mismas partes o partes similares. Se debería indicar que las figuras se presentan en forma simplificada y no se presentan a escala exacta. En referencia a la divulgación en el presente documento, solamente con fines de conveniencia y calidad, los términos con respecto a direcciones, tales como, parte superior, parte inferior, izquierda, derecha, arriba, abajo, sobre, encima de, debajo de, por debajo de, parte posterior, y parte frontal, se usan con respecto a las figuras adjuntas. Tales términos de dirección no se deberían interpretar como limitantes del alcance de la invención en manera alguna.

Aunque en el presente documento la divulgación 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 interpretar que la finalidad de la siguiente descripción detallada, aunque analizando realizaciones a modo de ejemplo, es que cubre todas las modificaciones, alternativas, y equivalentes de las realizaciones ya que pueden entrar dentro del espíritu y al alcance de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención se puede poner en práctica en conjunto con diversas técnicas de separación celular o tisular que se usan convencionalmente en la técnica, y solamente algunas de las etapas del proceso que se practica normalmente se incluyen en el presente documento ya que son necesarias para proporcionar una comprensión de la presente invención.

En el presente documento se desvela una población de células presentes en el tejido adiposo, y sistemas y métodos para administrar la población de células en un paciente humano o animal. La población de células del tejido adiposo se puede usar como una fuente de células para aplicaciones terapéuticas y cosméticas. Entre otras cosas, las células se pueden usar para medicina regenerativa, tal como enfermedades que se pueden tratar con células en regeneración. Las células de la población se pueden administrar a un paciente sin otros adipocitos o tejido conectivo, o se pueden administrar mezcladas junto con tejido adiposo en una cantidad concentrada, como se analiza en el presente documento.

Se ha descubierto que el tejido adiposo es una fuente especialmente rica de células madre. Este hallazgo se puede deber, al menos en parte, a la facilidad para retirar el componente de célula no madre principal del tejido adiposo, el adipocito. Por lo tanto, en estudios tanto en seres humanos como en animales, el lipoaspirado procesado (PLA) contiene células madre a una frecuencia de al menos un 0,1 %, y más habitualmente superior a un 0,5 %. En ciertas realizaciones de la invención, se ha obtenido un PLA que contiene entre aproximadamente un 2-12 % de células madre. Incluso en realizaciones adicionales, el PLA se procesa para obtener una población de células en la que las células madre constituyen hasta un 100 % de las células en la población. La cantidad desvelada de células madre obtenidas de acuerdo con la invención en el presente documento es básicamente superior a la frecuencia publicada de 1 de 100.000 (0,001 %) en médula ósea (Castro-Malaspina, Ebell *et al.* 1984) (Muschler, Nitto *et al.* 2001). Además, la extracción de tejido adiposo está asociada con una disminución de la morbilidad que la extracción de un volumen similar de médula ósea (Nishimori, Yamada *et al.* 2002). Además, el tejido adiposo contiene células precursoras endoteliales, que son capaces de proporcionar terapia a pacientes (véase por ejemplo, Masuda, H., C. Kalka, y T. Asahara, Endothelial progenitor cells for regeneration. *Hum Cell*, 2000, 13 (4): p. 153-60; Kaushal, S., *et al.*, Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nat Med*, 2001, 7 (9): p. 1035-40; y Kawamoto, A., *et al.*, Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*, 2001, 103 (5): p. 634-7.

Como se usa en el presente documento, "tejido adiposo" se refiere a un tejido que contiene múltiples tipos de células incluyendo adipocitos y células microvasculares. Tejido adiposo incluye células madre y células precursoras endoteliales. Por consiguiente, tejido adiposo se refiere a grasa que incluye el tejido conectivo que almacena la grasa.

Como se usa en el presente documento, "unidad de tejido adiposo" se refiere a una cantidad discreta o que se puede medir de tejido adiposo. Una unidad de tejido adiposo se puede medir determinando el peso y/o volumen de la unidad. Basándose en los datos identificados anteriormente, una unidad de lipoaspirado procesado, retirado de un paciente, tiene un componente celular en el que al menos un 0,1 % de componentes celulares células madre. En referencia a la divulgación en el presente documento, una unidad de tejido adiposo puede hacer referencia a toda la cantidad de tejido adiposo retirada de un paciente, o una cantidad que es inferior a toda la cantidad de tejido adiposo retirada de un paciente. Por lo tanto una unidad de tejido adiposo se puede combinar con otra unidad de tejido adiposo para formar una unidad de tejido adiposo que tiene un peso o volumen que es la suma de las unidades individuales.

Como se usa en el presente documento, "parte" se refiere a una cantidad de un material que es inferior que un total. Una parte secundaria se refiere a una cantidad que es inferior a un 50 %, y una parte principal se refiere a una cantidad superior a un 50 %. Por lo tanto, una unidad de tejido adiposo que es inferior a la cantidad total de tejido adiposo retirado de un paciente es una parte del tejido adiposo retirado.

Como se usa en el presente documento, "célula madre" se refiere a una célula pluripotente con el potencial de diferenciarse en una diversidad de otros tipos celulares, que realiza una o más funciones específicas y que tiene la capacidad de autorrenovación. Algunas de las células madre que se desvelan en el presente documento pueden ser pluripotentes.

Como se usa en el presente documento, "lipoaspirado procesado" (PLA) se refiere a tejido adiposo que se ha procesado para separar el componente celular activo (por ejemplo, el componente que contiene células madre) de los adipocitos maduros y tejido conectivo. Por lo general, PLA se refiere al sedimento de células obtenido por lavado y separación de las células del tejido adiposo. Por lo general el sedimento se obtiene por centrifugación de una suspensión de células de modo que las células se agregan en el fondo de un recipiente de centrifugadora.

En la práctica de los métodos que se desvelan en el presente documento, las células que se administran a un paciente se obtienen de tejido adiposo. El tejido adiposo se puede obtener mediante cualquier método conocido por una persona con una experiencia habitual en la materia. Por ejemplo, el tejido adiposo se puede retirar de un paciente mediante lipoplastia asistida por succión, lipoplastia asistida por ultrasonidos, y lipectomía por escisión. Además, los procedimientos pueden incluir una combinación de tales procedimientos, tales como una combinación de lipectomía por escisión y lipoplastia asistida por succión. Como el tejido o alguna fracción del mismo están destinados al reimplante en un paciente, el tejido adiposo se debería extraer una manera que conserva la viabilidad del componente celular y que minimiza la probabilidad de contaminación del tejido con organismos potencialmente infecciosos, tales como bacterias y/o virus. Por lo tanto, la extracción de tejido se debería realizar de una forma estéril o aséptica para minimizar la contaminación. La lipoplastia asistida por succión puede ser deseable para retirar el tejido adiposo de un paciente ya que proporciona un método mínimamente invasivo para extraer tejido con un potencial mínimo de daño a las células madre que se puede asociar con otras técnicas, tales como lipoplastia asistida por ultrasonidos.

Para procedimientos de lipoplastia asistida por succión, el tejido adiposo se extrae mediante la inserción de una cánula en cerca de un depósito de tejido adiposo presente en el paciente seguido de aspiración del tejido adiposo en un dispositivo de succión. Una pequeña cánula se puede acoplar a una jeringa, y el tejido adiposo se puede aspirar usando fuerza manual. El uso de una jeringa u otro dispositivo similar puede ser deseable para extraer cantidades relativamente moderadas de tejido adiposo (por ejemplo, de 0,1 ml a varios cientos de mililitros de tejido adiposo). Los procedimientos que usan estos dispositivos relativamente pequeños tienen la ventaja de que los procedimientos se puede realizar solamente con anestesia local, en oposición a la anestesia general. Los volúmenes mayores de tejido adiposo por encima de ese intervalo (por ejemplo, superiores a varios cientos de mililitros) pueden requerir anestesia general de acuerdo con el criterio del donante y la persona que realiza el procedimiento de extracción. Cuando se desea retirar volúmenes mayores de tejido adiposo, en el procedimiento se pueden usar cargas relativamente más grandes y dispositivos de succión automatizados.

Los procedimientos de lipectomía por escisión incluyen, y no se limitan a, procedimientos en los que se retiran tejidos que contienen tejido adiposo (por ejemplo, piel) como una parte secundaria del procedimiento; es decir, cuando el fin principal de la cirugía es la retirada del tejido (por ejemplo, piel en cirugía bariátrica o cosmética) y en que se retira tejido adiposo junto con el tejido de interés primario.

El tejido adiposo que se retira de un paciente se extrae en un dispositivo para su procesamiento adicional. Como se analiza en el presente documento, y en una realización, el dispositivo se diseña para y se dedica a la finalidad de extraer tejido para preparar una población de células de tejido adiposo procesado, que incluye células madre y/o células precursoras endoteliales.

La cantidad de tejido extraído dependerá de una serie de variables que incluyen, pero no se limitan a, el índice de masa corporal detonante, la disponibilidad de sitios de extracción de tejido adiposo accesibles, medicaciones y afecciones simultáneas y que existen previamente (tales como terapia con anticoagulantes), y en la finalidad clínica para la que se está extrayendo el tejido. La experiencia con 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 sangre del receptor) muestra que el injerto depende de la dosis celular con efectos de umbral. Por lo tanto, es probable que el principio general "más es mejor" se aplicará dentro de los límites establecidos con otras variables y que, cuando sea factible, la extracción extraerá 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 aumento del contenido de grasa en el individuo o beso. Por lo tanto, puede ser deseable obtener cantidades mayores de tejido de donantes con sobrepeso en comparación con las cantidades que se retirarían de pacientes más delgados. Esta observación también indica que el dispositivo de utilidad y métodos que se desvelan el presente documento no se limitan a individuos con cantidades grandes de tejido adiposo.

Tabla 1: Efecto del Índice de Masa Corporal en el rendimiento de Tejido y Célula

Estado del Índice de Masa Corporal	Cantidad de Tejido Obtenida (g)	Rendimiento Celular Total ($\times 10^7$)
Normal	641 $\pm$ 142	2,1 $\pm$ 0,4
Obeso	1,225 $\pm$ 173	2,4 $\pm$ 0,5
Valor de p	0,03	0,6

Los pacientes sometidos a tratamiento de acuerdo con la divulgación en el presente documento reciben una concentración diferente de células madre que con otros tratamientos que usan tejido adiposo o células madre derivadas de tejido adiposo. Por lo tanto, el tejido adiposo que se extrae de un paciente se procesa para cambiar la concentración de células madre que se administran al paciente. En un ejemplo, los pacientes reciben una mayor concentración de células madre que la concentración de las células madre presente por lo general en los trasplantes de tejido adiposo y otras terapias similares basadas en células madre. Las células madre concentradas se pueden administrar en una composición que comprende células madre derivadas de tejido adiposo y/o células precursoras endoteliales básicamente libres de adipocitos maduros y tejido conectivo, o, como otro ejemplo, las células madre concentradas se pueden administrar en una composición que comprende una unidad de tejido adiposo con una cantidad mayor de células madre. Una composición derivada de tejido adiposo de acuerdo con la divulgación en el presente documento incluye una concentración de células madre que es mayor que la concentración de células madre que se encuentran en una unidad de equivalente de tejido adiposo sin procesar. La composición puede tener un componente celular en el que al menos un 0,1 % de las células son células madre. La composición puede tener un componente celular en el que las células madre comprenden entre aproximadamente un 2 % y un 12 % del componente celular. Mayores concentraciones de células madre, tales como de hasta un 100 %, también se incluyen en diferentes composiciones. La composición puede incluir componentes adicionales, tales como factores de diferenciación celular, promotores del crecimiento, agentes inmunosupresores, o dispositivos médicos, como se analiza en el presente documento. Para obtener ciertas composiciones en las que la composición contiene principalmente un tipo de célula (por ejemplo, células madre derivadas de tejido adiposo o células precursoras endoteliales derivadas de tejido adiposo, se puede usar cualquier método adecuado para separar los diferentes tipos de células, tal como el uso de anticuerpos específicos de células que reconocen y se unen a los antígenos presentes en cualquiera de células madre o células precursoras endoteliales.

Para la mayoría de las aplicaciones, la preparación de la población de células activa necesitará la supresión del componente de los adipocitos cargado de grasa maduros del tejido adiposo. Por lo general, esto se consigue mediante una serie de etapas de lavado y desagregación en las que el tejido se aclara primero para reducir la presencia de lípidos libres (liberados de adipocitos rotos) y elementos de la sangre periférica (liberados de vasos sanguíneos seccionados durante la extracción de tejidos), y luego desagregados para liberar adipocitos intactos y otras poblaciones de células de la matriz de tejido conectivo. En ciertas situaciones, la totalidad del componente de los adipocitos, o un componente de células no madre, se separa del componente de células madre del tejido adiposo. En otras situaciones, solamente una parte o partes del componente de los adipocitos se separan de las células madre. Por lo tanto, en ciertas situaciones, las células madre se pueden administrar con células precursoras endoteliales.

El aclarado es una etapa opcional, pero preferente, en la que el tejido se mezcla con soluciones para retirar por lavado componentes del lípido libre y de una sola célula, tales como los componentes en la sangre, dejando atrás fragmentos de tejido adiposo intacto. En una situación, el tejido adiposo que se retira del paciente se mezcla con solución salina isotónica u otra solución o soluciones fisiológicas (por ejemplo, Plasmalyte®, de Baxter Inc o Normoso® de Abbott Labs). Los fragmentos de tejido adiposo intacto se puede separar del lípido libre y las células mediante cualquier medio conocido para las personas con una experiencia habitual en la materia, que incluye, pero

no se limita, filtración, decantación, sedimentación, o centrifugación. En el ejemplo ilustrado que se desvela en el presente documento, el tejido adiposo se separa del tejido no adiposo usando un filtro colocado dentro de un recipiente para extracción de tejido, como se analizan en el presente documento. En otros ejemplos, el tejido adiposo se separa del tejido no adiposo usando un recipiente para extracción de tejido que usa técnicas de decantación, sedimentación, y/o centrifugación para separar los materiales.

Los fragmentos de tejido intacto se desagregan a continuación usando cualquier técnica o método convencional, incluyendo fuerza mecánica (troceado o fuerzas de cizalla), digestión enzimática con enzimas proteolíticas individuales o combinatorias, tales como colagenasa, tripsina, lipasa, H1 liberado, como se desvela en la Patente de Estados Unidos N° 5.952.215, y pepsina, o una combinación de métodos mecánicos y enzimáticos. Por ejemplo, el componente celular de los fragmentos de tejido intacto se puede desagregar mediante métodos que usan disociación de tejido adiposo mediada por colagenasa, similar a los métodos para extraer células endoteliales microvasculares en el tejido adiposo, como se desvela en la Patente de Estados Unidos N° 5.372.945. En las patentes de Estados Unidos N°s 5.830.714 y 5.952.215, y en Williams, S. K., S. McKenney, *et al.* (1995). "Collagenase lot selection and purification for adipose tissue digestion". *Cell Transplant* 4 (3): 281-9 se desvelan métodos adicionales que usan colagenasa que se pueden usar en la práctica de la invención. De forma análoga, se puede usar una proteasa neutra en lugar de colagenasa, como se desvela en Twentyman, P. R. y J. M. Yuhas (1980). "Use of bacterial neutral protease for disaggregation of mouse tumours and multicellular tumor spheroids". *Cancer Lett* 9 (3): 225-8. Además, los métodos pueden usar una combinación de enzimas, tales como una combinación de colagenasa y tripsina, como se desvela en Russell, S. W., W. F. Doe, *et al.* (1976). "Inflammatory cells in solid murine neoplasms. I. Tumor disaggregation and identification of constituent inflammatory cells". *Int J Cancer* 18 (3): 322-30; o una combinación de una enzima, tal como tripsina, y disociación mecánica, como se desvela en Engelholm, S. A., M. Spang-Thomsen, *et al.* (1985). "Disaggregation of human solid tumours by combined mechanical and enzymatic methods". *Br J Cancer* 51 (1): 93-8.

La población de células activas (lipoaspirado procesado) se puede obtener a continuación a partir de los fragmentos de tejido desagregados mediante reducción de la presencia de adipocitos maduros. Una suspensión del lipoaspirado procesado y el líquido en el que se desagregó el tejido adiposo se pasa a continuación a otro recipiente, tal como un recipiente para extracción de células. La suspensión puede fluir a través de uno o más conductos al recipiente para extracción de células usando una bomba, tal como una bomba peristáltica, que retira la suspensión del recipiente para extracción de tejido y la impulsa al recipiente para extracción de células. Otras realizaciones pueden emplear el uso de gravedad o un vacío a la vez que se mantiene un sistema cerrado. La separación de las células en la suspensión se puede conseguir mediante sedimentación con densidad de flotación, centrifugación, elutriación, adherencia diferencial y elución de restos en la fase sólida, selección mediada por anticuerpos, diferencias en la carga eléctrica; perlas inmunomagnéticas, clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), u otros medios. Algunos ejemplos de estas técnicas y dispositivos diversos para realizar las técnicas se pueden encontrar en Hemstreet, G. P., 3º, P. G. Enoch, *et al.* (1980). "Tissue disaggregation of human renal cell carcinoma with further isopycnic and isokinetic gradient purification". *Cancer Res* 40 (4): 1043-9; Schweitzer, C. M., van, *et al.* (1995). "Isolation and culture of human bone marrow endothelial cells". *Exp Hematol* 23 (1): 41-8; Gryn, J., R. K. Shadduck, *et al.* (2002). "Factors affecting purification of CD34(+) peripheral blood stem cells using the Baxter Isolex 300i". *J Hematother Stem Cell Res* 11 (4): 719-30; Prince, H. M., J. Bashford, *et al.* (2002). "Isolex 300i CD34-selected cells to support multiple cycles of high-dose therapy". *Cytotherapy* 4 (2): 137-45; Watts, M. J., T. C. Somervaille, *et al.* (2002). "Variable product purity and functional capacity after CD34 selection: a direct comparison of the ClineMACS (v2,1) and Isolex 300i (v2,5) clinical scale devices". *Br J Haematol* 118 (1): 117-23; Mainwaring, G. y A. F. Rowley (1985). "Separation of leucocytes in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*) using density gradient centrifugation and differential adhesion to glass coverslips". *Cell Tissue Res* 241 (2): 283-90; Greenberg, A. W. y D. A. Hammer (2001). "Cell separation mediated by differential rolling adhesion". *Biotechnol Bioeng* 73 (2): 111-24; y documentos de Patente de Estados Unidos N°s 6.277.060; 6.221.315; 6.043.066; 6.451.207; 5.641.622; y 6.251.295. En referencia a los métodos que se desvelan en el presente documento, las células en la suspensión se pueden separar del componente celular de la suspensión usando un filtro de membrana que gira. En referencia a los métodos que se desvelan en el presente documento, las células en la suspensión también se pueden separar del componente celular usando una centrifugadora. En una de tales realizaciones a modo de ejemplo, el recipiente para extracción de células puede ser una bolsa flexible que está estructurada para su colocación en una centrifugadora (por ejemplo, de forma manual o mediante robótica). En otras realizaciones, no se usa una bolsa flexible. Después de la centrifugación, el componente celular forma un sedimento, que a continuación se puede volver a suspender con una solución tamponada de modo que las células se pueden pasar a través de uno o más conductos a un recipiente de mezcla, como se analizan en el presente documento. Los fluidos de la resuspensión se pueden proporcionar mediante cualquier medio adecuado. Por ejemplo, un tampón se puede inyectar en un puerto en el recipiente para extracción de células, o el recipiente para extracción de células puede incluir una reserva de tampón que se puede mezclar con el sedimento de células mediante ruptura de la reserva. Cuando se usa un filtro de membrana que gira, la resuspensión es opcional dado que las células permanecen en un volumen de líquido después del procedimiento de separación.

Aunque ciertas realizaciones de la invención se dirigen a métodos de desagregación completa del tejido adiposo para separar las células activas de los adipocitos maduros y tejido conectivo, algunas realizaciones adicionales de la invención se dirigen a métodos en los que el tejido adiposo solamente se desagrega parcialmente. Por ejemplo, la

desagregación parcial se puede realizar con una o más enzimas, que se retiran de la al menos una parte del tejido adiposo inicialmente, con respecto a un periodo de tiempo en el que la enzima de otro modo se dejaría en el mismo para desagregar totalmente el tejido. Tal proceso puede necesitar menos tiempo de procesamiento.

En un ejemplo en particular, el tejido se lava con solución salina isotónica tamponada estéril y se incuba con colagenasa a una concentración de colagenasa, temperatura, y tiempo suficientes para proporcionar una desagregación adecuada. En otro ejemplo, la enzima colagenasa usada será aprobada para uso humano por la autoridad pertinente (por ejemplo, la U.S. Food and Drug Administration). Algunas preparaciones de colagenasa adecuadas incluyen colagenasa recombinante y no recombinante. La colagenasa no recombinante se puede obtener en F. Hoffmann-La Roche Ltd, Indianapolis, IN y/o Advance Biofactures Corp., Lynbrook, NY. La colagenasa recombinante también se puede obtener como se desvela en la Patente de Estados Unidos N° 6.475.764.

En un ejemplo, algunas soluciones contienen colagenasa a concentraciones de aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml y se incuban de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 38 °C de aproximadamente 20 minutos a aproximadamente 60 minutos. Estos parámetros variarán de acuerdo con la fuente de la enzima colagenasa, optimizada mediante estudios empíricos, para validar que el sistema es eficaz en la extracción de las poblaciones de células deseadas en un marco de tiempo apropiado. Una concentración, tiempo y temperatura preferentes en particular es 20 µg/ml de colagenasa (Blendzyme 1, Roche) incubada durante 45 minutos, a aproximadamente 37 °C. En otro ejemplo, la enzima colagenasa usada es material aprobado para uso humano por la autoridad pertinente (por ejemplo, la U.S. Food and Drug Administration). La colagenasa usada debería estar libre de microorganismos y contaminantes, tales como endotoxinas.

Después de la desagregación, la población de células se puede lavar/aclarar para retirar aditivos y/o productos secundarios del proceso de desagregación (por ejemplo, colagenasa y lípidos libres recién liberados). La población de células activa se podría concentrar a continuación mediante centrifugación u otros métodos conocidos por las personas con experiencia habitual en la materia, como se ha analizado anteriormente. Estas etapas de lavado/concentración después del procesamiento se pueden aplicar por separado o de forma simultánea.

En referencia a los métodos que se desvelan en el presente documento, las células se pueden concentrar y la colagenasas se puede retirar pasando la población de células a través de un sistema de membrana de centrifugación o continuo o similar, tal como, por ejemplo, el sistema que se desvela en las Patentes de Estados Unidos N°s 5.034.135; y 5.234.608.

Además de lo mencionado anteriormente, existen muchos métodos de lavado posterior que se pueden aplicar para purificación adicional de la población de células activas. Estos incluyen tanto selección positiva (selección de las células diana), selección negativa (retirada selectiva de células no deseadas), como combinaciones de los mismos.

En una realización, un material en fase sólida con propiedades adhesivas seleccionado para permitir la adherencia diferencial y/o elución de una subpoblación de células dentro del lipoaspirado procesado se inserta en el sistema después de la etapa de lavado celular. Este enfoque general se ha realizado en transfusión de sangre clínica en el que se usan filtros para captura de leucocitos de forma diferencial para suprimir glóbulos rojos transfundidos de glóbulos blancos contaminantes (Soli, M., *et al.*, 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*, 2001, 81 (2): p. 108-12; Smith, J.W., Apheresis techniques and cellular immunomodulation. *Ther Apher*, 1997, 1 (3): p. 203-6). Los filtros de este tipo se distribuyen en Pall Bedical (Leukogard RS y Purecell RCQ) y Asahi (RS2000). También se ha aplicado adherencia diferencial para selección positiva de monocitos (Berdel, W.E., *et al.* Purification of human monocytes by adherence to polymeric fluorocarbon. Characterization of the monocyte-enriched cell fraction. *Immunobiology*, 1982, 163 (5): p. 511-20) y células madre epidérmicas (Bickenbach, J.R. y E. Chism, Selection and extended growth of murine epidermal stem cells in culture. *Exp Cell Res*, 1998, 244 (1): p. 184-95). En este ejemplo, el lipoaspirado procesado se pasaría a través de un material de filtro bajo condiciones de flujo y tampón predeterminadas para estimular la adherencia diferencial de células diana y poblaciones de células no deseadas. Para selección positiva, el material y las condiciones de filtro permitirían la adherencia preferencial de células diana a la vez que el material no deseado pasaría libremente a través del filtro y se eliminaría por lavado con exceso de tampón. Las células diana se eluirían del filtro cambiando las condiciones tales como caudal, pH, fuerza iónica, y/o presencia de cationes necesarios para la adhesión. El material de filtro se podría presentar en forma de una malla tridimensional, casete empaquetado de pequeñas partículas, fibras huecas u otros mecanismos con área superficial elevada. En una realización preferente, este dispositivo de filtros sería una parte integral del conjunto desechable que se muestra en la Figura 1 y se insertaría en el dispositivo que se muestra en la Figura 4. Tanto el conjunto como el dispositivo se tendrían que modificar ligeramente de los de estos ejemplos que se muestran en las figuras especificadas; en la Figura 1 para incluir el filtro y el alojamiento y en la Figura 4 para permitir la inserción del alojamiento del filtro y los tubos (incluyendo válvulas) necesarios para el mantenimiento de una ruta de fluido cerrada, estéril. Como alternativa, la cámara de mezcla (Componente 108 de la Figura 4; componente 30 de la Figura 1) se podría sustituir con los ajustes del dispositivo y filtro/alojamiento respectivamente.

Un ejemplo alternativo de este enfoque de adherencia diferencial incluiría el uso de anticuerpos y/o combinaciones de anticuerpos que reconocen moléculas de superficie expresadas de forma diferencial en células diana y no deseadas. La selección sobre la base de la expresión de marcadores de superficie celular específicos of (o

combinaciones de los mismos) es otra técnica aplicada normalmente en la que los anticuerpos se unen (directa o indirectamente) a una estructura de soporte en fase sólida (Geiselhart, A., *et al.*, Positive selection of CD56+ lymphocytes by magnetic cell sorting. *Nat Immun*, 1996, 15 (5): p. 227-33; Formanek, M., *et al.*, Magnetic cell separation for purification of human oral keratinocytes: an effective method for functional studies without prior cell subcultivation. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 1998, 255 (4): p. 211-5; Graepler, F., U. Lauer, y M. Gregor, Magnetic cell sorting for parietal cell purification using a new monoclonal antibody without influence on cell function. *J Biochem Biophys Methods*, 1998, 36 (2-3): p. 143-55; Kobari, L., *et al.*, CD133+ cell selection is an alternative to CD34+ cell selection for ex vivo expansion of hematopoietic stem cells. *J Hematother Stem Cell Res*, 2001, 10 (2): p. 273-81; Mohr, M., *et al.*, 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*, 2001, 7 (1): p. 51-7; y Pugh, R.E., *et al.*, CD19 selection improves the sensitivity of B cell lymphoma detection. *J Hematother*, 1998, 7 (2): p. 159-68). Este enfoque tiene aplicaciones evidentes en selección tanto positiva como negativa en las que, por ejemplo, los glóbulos blancos residuales se podrían retirar mediante el uso del anticuerpo CD45). De forma análoga, Reyes *et al.*, han aplicado una mezcla de anticuerpos compleja en la selección de una célula precursora adulta pluripotencial de médula ósea humana (Reyes, M., *et al.*, Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 2001, 98 (9): p. 2615-25). Por ejemplo, un anticuerpo tal como AP2 (Joyner, C.J., *et al.*, Development of a monoclonal antibody to the aP2 protein to identify adipocyte precursors in tumours of adipose differentiation. *Pathol Res Pract*, 1999, 195 (7): p. 461-6) que se une específicamente a células adipocíticas se podría usar para suprimir preferentemente células adipocíticas residuales (incluyendo adipocitos y adipoblastos inmaduros). La selección positiva se podría aplicar mediante el uso de anticuerpos específicos para la población o poblaciones de células diana. Por ejemplo, Quirici *et al.*, han usado anticuerpos para el Receptor del Factor de Crecimiento Nervioso para enriquecer células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (Quirici, N., *et al.*, Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol*, 2002, 30 (7): p. 783-91).

En un ejemplo de un enfoque basado en anticuerpos de acuerdo con la divulgación en el presente documento, un anticuerpo (por ejemplo AP2) o un cóctel de anticuerpos (por ejemplo AP2, CD3, CD19, CD11b) lipoaspirado al procesado. Un experto en la materia reconocerá muchos otros anticuerpos y combinaciones de anticuerpos y estos ejemplos se proporcionan solamente a modo de ejemplo. Después de la incubación, en condiciones determinadas previamente para permitir la unión óptima de estos anticuerpos a sus antígenos relacionados, las células se la varían pasando a través del filtro de membrana que gira u otro ejemplo de la cámara de lavado celular para retirar exceso de anticuerpo, sin unir. Las células se pasarían a continuación sobre una estructura de fase sólida similar a la que se describe en ejemplo mencionado anteriormente pero en la que la fase sólida se ha unido a un anticuerpo secundario capaz de unión de alta afinidad a los anticuerpos primarios unidos ahora a la superficie celular. Las células diana, por ejemplo la célula madre derivada de tejido adiposo, pasaría libremente a través de este filtro en virtud de la ausencia de expresión de antígenos de superficie celular reconocidos por el anticuerpo seleccionado (cóctel de anticuerpos) creando de este modo un sistema de selección negativa. En esta realización, el conjunto desechable (Figura 3) y el dispositivo (Figura 4) se someterían a modificaciones menores muy similares a las que se han descrito en el ejemplo mencionado anteriormente.

Se podría conseguir una selección positiva mediada por anticuerpos de forma similar mediante la inclusión de un tercer aditivo que facilita la separación de las células del soporte de fase sólida. En este ejemplo, la enzima papaína o cimpapaina se podría añadir para escindir las moléculas de anticuerpo antibody y liberar células del soporte de fase sólida (Civin, C.I., *et al.*, Positive stem cell selection basic science. *Prog Clin Biol Res*, 1990, 333 (387): p. 387-401; análisis 402). Otra alternativa sería el uso de péptidos específicos que competirían con el antígeno de superficie celular por la unión a los anticuerpos, como se describe en Tseng-Law *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N° 6.017.719.

El sedimento celular se puede volver a suspender, formar capas sobre (o bajo) un material fluido formado en a un gradiente de densidad continuo o discontinua y colocar en una centrifugadora para separación de las poblaciones de células sobre la base de la densidad celular. Algunos ejemplos de medios adecuados para la formación de tales Gradientes incluyen Percoll y Ficoll-Paque (Qian, X., L. Jin, y R.V. Lloyd, Percoll Density Gradient-Enriched Populations of Rat Pituitary Cells: Interleukin 6 Secretion, Proliferative Activity, and Nitric Oxide Synthase Expression. *Endocr Pathol*, 1998, 9 (1): p. 339-346; Smits, G., W. Holzgreve, y S. Hahn, 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*, 2000, 263 (4): p. 160-3) o Ficoll-Paque (Lehner, M. y W. Holter, Endotoxin-free purification of monocytes for dendritic cell generation via discontinuous density gradient centrifugation based on diluted Ficoll-Paque Plus. *Int Arch Allergy Immunol*, 2002, 128 (1): p. 73-6). Van Merris *et al.*, (Van Merris, V., *et al.*, Separation of bovine bone marrow in maturation-related myeloid cell fractions. *Vet Immunol Immunopathol*, 2001, 83 (1-2): p. 11-7) usados como un gradiente de Percoll de tres etapas discontinuas para separar células mieloides bovinas de acuerdo con su estado de maduración en esta base. Este procedimiento sería capaz de separar ciertas poblaciones de células sanguíneas residuales y adipocitos inmaduros (pre-adipocitos) de la población de células.

En un ejemplo similar de acuerdo con la divulgación en el presente documento, también se pueden usar enfoques de flujo continuo tales como aféresis (Smith, J.W., Apheresis techniques and cellular immunomodulation. *Ther Apher*, 1997, 1 (3): p. 203-6) y elutriación (con o sin contracorriente) (Lasch, J., G. Kullertz, y J.R. Opalka, Separation

of erythrocytes in age-related fractions by density or size? Counterflow centrifugation. Clin Chem Lab Med, 2000, 38 (7): p. 629-32; Ito, Y. y K. Shinomiya, 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, 2001, 16 (4): p. 186-91; Dlubek, D., *et al.*, Enrichment of normal progenitors in counter-flow centrifugal elutriation (CCE) fractions of fresh chronic myeloid leukemia leukapheresis products. Eur J Haematol, 2002, 68 (5): p. 281-8). Tales mecanismos se han usado para fraccionar células sanguíneas, incluyendo la separación de glóbulos rojos sanguíneas basándose en la edad (Lasch, J., G. Kullertz, y J.R. Opalka, Separation of erythrocytes in age-related fractions by density or size? Counterflow centrifugation. Clin Chem Lab Med, 2000, 38 (7): p. 629-32) y la aplicación de este enfoque general para purificación adicional de células de interés de lipoaspirado procesado será rápidamente evidente para un experto en la materia. Este enfoque puede requerir modificación del dispositivo de la Figura 4 y el conjunto desechable (Figura 3) de modo que el dispositivo se integraría con un segundo dispositivo que proporciona la capacidad de aféresis o elutriación.

La adherencia a plástico seguido de un breve periodo de expansión celular también se ha aplicado en poblaciones de células madre adultas derivadas de médula ósea (Jaiswal, N., *et al.*, Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. J Cell Biochem, 1997, 64 (2): p. 295-312; Hou, L., *et al.*, Study of in vitro expansion and differentiation in neuron-like cells of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi, 2002, 23 (8): p. 415-9). Este enfoque usa condiciones de cultivo para expandir de forma preferencial una población aunque otras poblaciones se mantienen (y por lo tanto se reducen por dilución con el crecimiento de las células seleccionadas) o se pierden debido a la ausencia de condiciones de crecimiento requeridas. Sekiya *et al.* han descrito condiciones que se podrían usar a este respecto para células madre derivadas de médula ósea (Sekiya, I., *et al.*, Expansion of Human Adult Stem Cells from Bone Marrow Stroma: Conditions that Maximize the Yields of Early Progenitors and Evaluate Their Quality. Stem Cells, 2002, 20 (6): p. 530-41). Este enfoque (con o sin adherencia diferencial al plástico de cultivo tisular) se podría aplicar a los métodos que se desvelan en el presente documento. En este método, las células se retiran del dispositivo que se muestra en la Figura 4 y se colocan en un segundo dispositivo que proporciona el componente de cultivo celular. Este podría estar en forma de una incubadora de cultivo tisular de laboratorio convencional o un dispositivo de estilo Biorreactor tal como el que se describe en Tsao *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos Nº 6.001.642, o en Armstrong *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos Nº 6.238.908. En una realización alternativa, el componente de mezcla (el componente 108 del dispositivo que se muestra en la Figura 4; el componente 30 en la Figura 3) se podría reemplazar con un componente de Biorreactor que permite la adherencia y/o el cultivo celular a corto plazo del lipoaspirado procesado. Esta realización alternativa permitiría la integración del componente de Biorreactor al dispositivo y eliminar la necesidad de retirar las células de este dispositivo y colocación dentro de otro.

En ciertos métodos que se desvelan en el presente documento, la población de células activas se administra directamente en el paciente. En otras palabras, la población de células activas (por ejemplo, las células madre y/o células precursoras endoteliales) se administran al paciente sin ser retiradas del sistema o expuestas al entorno externo del sistema antes de su administración al paciente. La provisión de un sistema cerrado reduce la posibilidad de contaminación del material que se está administrando al paciente. Por lo tanto, el procesamiento del tejido adiposo en un sistema cerrado proporciona ventaja sobre los métodos existentes porque es más probable que la población de células activas sea estéril. En tal método, el único momento en el que las células madre y/o células precursoras endoteliales se exponen al entorno externo, o se retiran del sistema, es cuando las células se están retirando en un dispositivo de aplicación y se están administrando al paciente. En una realización, el dispositivo de aplicación también prevé formar parte del sistema cerrado. Por lo tanto, las células usadas en estos ejemplos no se procesan para cultivo, ni se crioconservan.

Las células activas que se han concentrado, como se ha descrito anteriormente, se pueden administrar a un paciente sin procesamiento adicional, o se pueden administrar a un paciente después de su mezcla con otros tejidos o células. Las células activas concentradas (por ejemplo, células madre o células precursoras endoteliales) se pueden mezclar con una o más unidades de tejido adiposo que no se han procesado del mismo modo. Por lo tanto, poniendo en práctica los métodos que se desvelan en el presente documento, se puede administrar al paciente una composición que comprende tejido adiposo con un aumento de la concentración de células activas. Los volúmenes de las diversas unidades de tejido adiposo pueden ser diferentes. Por ejemplo, un volumen puede ser superior a al menos un 25 % que el volumen de otra unidad de tejido adiposo. Además, un volumen puede ser superior a al menos un 50 %, tal como al menos un 100 %, e incluso un 150 % o más superior que el volumen de otra unidad de tejido adiposo. Además, la composición deseada se puede obtener por mezcla de una primera unidad de tejido adiposo con la población de células activas concentradas, que puede ser un sedimento celular que contiene las células activas, con una u otras unidades más de tejido adiposo. En ciertos ejemplos, estas otras unidades no tendrán un aumento de la concentración de células madre, o en otras palabras, tendrán una concentración de células activas inferior a la contenida en la primera unidad de tejido adiposo. En otros ejemplos, una de las unidades es material crioconservado que contiene, por ejemplo, un aumento de la concentración de células activas.

En otros ejemplos de acuerdo con la divulgación en el presente documento, al menos una parte de la población de células activas se almacena para un implante/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 retiene para una aplicación posterior mientras que la parte se aplica inmediatamente al paciente. El almacenamiento

moderado a largo plazo de toda o parte de las células en un banco de células también está dentro del alcance de la presente invención, como se desvela en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 10/242.094, con el título 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 Estados Unidos N° 60/322.070 presentada el 14 de septiembre de 2001. En tal ejemplo, las células se pueden mezclar con una o más unidades de tejido adiposo recién preparado o conservado para proporcionar una composición que contienen las células madre a una concentración más elevada que una unidad de tejido adiposo antes del procesamiento.

Al final del procesamiento, las células concentradas se pueden cargar en un dispositivo de administración, tal como una jeringa, para colocación en el receptor mediante técnicas subcutánea, intravenosa, intramuscular, o intraperitoneal. En otras palabras, las células se pueden colocar en el paciente mediante cualquier medio conocido por las personas con experiencia habitual en la materia en la técnica, por ejemplo, se pueden inyectar en los vasos sanguíneos para administración sistémica o local, en tejido (por ejemplo, músculo cardíaco, o músculo esquelético), en la dermis (subcutánea), en espacio tisular (por ejemplo, pericardio o peritoneo), o en tejidos (por ejemplo, colocación periuretral), u otra ubicación. En el presente documento se desvela la colocación mediante aguja o catéter, o mediante implantación quirúrgica directa en asociación con aditivos tales como una matriz formada previamente.

La población de células activas se puede aplicar sola o en combinación con otras células, tejido, fragmentos de tejido, hueso desmineralizado, factores de crecimiento tales como insulina o fármacos tales como miembros de la familia de la tiaglitazona, compuestos biológicamente activos o inertes, armazones de plástico reabsorbibles, o destinado al aumento de la administración, eficacia, tolerabilidad, o función de la población. La población de células también se debe modificar mediante inserción de ADN o mediante colocación en cultivo celular de un modo tal como para cambiar, aumentar, o subcomplementar la función de las células para derivación de un fin cosmético, estructural, o terapéutica. Por ejemplo, las personas con experiencia habitual en la materia conocen técnicas de transferencia genética para células madre, como seres de la en Mosca, J. D., J. K. Hendricks, *et al.* (2000). "Mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery". Clin Orthop (Suppl 379): S71-90; y pueden incluir técnicas de transfección viral, y de forma más específica, técnicas de transferencia de genes del virus adenoasociados, como se desvela en Walther, W. y U. Stein (2000). "Viral vectors for gene transfer: a review of their use in the treatment of human diseases". Drugs 60 (2): 249-71, y Athanasopoulos, T., S. Fabb, *et al.* (2000). "Gene therapy vectors based on adeno-associated virus: characteristics and applications to acquired and inherited diseases (review)". Int J Mol Med 6 (4): 363-75. También se pueden realizar técnicas no basadas en virus como se desvela en Muramatsu, T., A. Nakamura, *et al.* (1998). "In vivo electroporation: a powerful and convenient means of nonviral gene transfer to tissues of living animals (Review)". Int J Mol Med 1 (1): 55-62.

Por ejemplo, las células se podrían mezclar con fragmentos sin procesar de tejido adiposo y colocar de nuevo en el receptor usando una aguja de calibre muy grande o cánula para liposucción. La transferencia de grasa autóloga sin complemento con células procesadas es un procedimiento habitual en cirugía plástica y reconstructiva. Sin embargo, los resultados pueden ser impredecibles ya que el material transferido tiende a reabsorberse rápidamente dando como resultado un injerto inestable. Las células derivadas de tejido adiposo de la invención que, por ejemplo, se suprimen básicamente de adipocitos maduros pueden proporcionar un entorno que soporta la supervivencia prolongada y la función del injerto.

La población de células también se podría colocar en el receptor y rodear con una funda de plástico reabsorbible tal como la fabricada por MacroPore Biosurgery, Inc. (documentos de Patente de Estados Unidos N°s 6.269.716 y 5.919.234). En esta configuración, la funda evitaría el prolapso del músculo y otro tejido blando en el área de una fractura ósea permitiendo de este modo que las células derivadas de tejido adiposo procesadas emplazadas estimulen la reparación de la fractura. El efecto beneficioso se podría aumentar mediante el complemento con componentes adicionales tales como factores de crecimiento de proteína pro-osteogénica o andamios biológicos o artificiales.

Las células también se podrían combinar con un gen que codifica un factor de crecimiento pro-osteogénico que permitiría que las células actuaran como su propia fuente de factor de crecimiento durante la curación o fusión ósea. La adición del gen se podría realizar mediante cualquier tecnología conocida en la técnica que incluye, pero no se limita a, transducción adenoviral, "pistolas genéticas", transducción mediada por liposomas, y transducción mediada por retrovirus o lentivirus.

En particular cuando las células y/o tejido que contienen las células se administran a un paciente distinto del paciente del que se obtuvieron las células y/o tejido, se puede administrar uno o más agentes inmunosupresores al paciente que recibe las células y/o tejido para reducir, y preferentemente para prevenir, el rechazo del trasplante. Algunos ejemplos de agentes inmunosupresores adecuados con los métodos que se desvelan en el presente documento incluyen agentes que inhiben las rutas de coestimulación de linfocitos T/linfocitos B, tales como agentes que interfieren con el acoplamiento de los linfocitos T y los linfocitos B a través de las rutas CTLA4 y B7, como se desvela en la Pub. de Patente de Estados Unidos N° 20020182211. Otros ejemplos incluyen ciclosporina, miofenilato de mofetilo, rapamicina, y globulina anti-timocítica.

En ciertos ejemplos que se desvelan en el presente documento, las células se administran a un paciente con uno o más agentes de diferenciación celular, tales como citoquinas y factores de crecimiento. Algunos ejemplos de diversos agentes de diferenciación celular se desvelan en Gimble, J. M., C. Morgan, *et al.* (1995). "Bone morphogenetic proteins inhibit adipocyte differentiation by bone marrow stromal cells". *J Cell Biochem* 58 (3): 393-402; Lennon, D. P., S. E. Haynesworth, *et al.* (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 (1): 211-22; Majumdar, M. K., M. A. Thiede, *et al.* (1998). "Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells". *J Cell Physiol* 176 (1): 57-66; Caplan, A. I. y V. M. Goldberg (1999). "Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissues". *Clin Orthop* (367 Suppl): S12-6; Ohgushi, H. y A. I. Caplan (1999). "Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering". *J Biomed Mater Res* 48 (6): 913-27; Pittenger, M. F., A. M. Mackay, *et al.* (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells". *Science* 284 (5411): 143-7; Caplan, A. I. y S. P. Bruder (2001). "mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century". *Trends Mol Med* 7 (6): 259-64; Fukuda, K. (2001). "Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering". *Artif Organs* 25 (3): 187-93; Worster, A. A., B. D. Brower-Toland, *et al.* (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 (4): 738-49; Zuk, P. A., M. Zhu, *et al.* (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies". *Tissue Eng* 7 (2): 211-28; y Mizuno, H., P. A. Zuk, *et al.* (2002). "Myogenic differentiation by human processed lipoaspirate cells". *Plast Reconstr Surg* 109 (1): 199-209; análisis 210-1.

Mediante la administración de las células madre y/o células precursoras endoteliales a un paciente, se pueden tratar numerosas enfermedades, que incluyen, pero no se limitan a, trastornos, enfermedades o lesiones relacionados con los huesos, que incluyen fracturas de unión lenta/sin unión, osteoporosis (relacionada con la edad o inducida por quimioterapia), enfermedades de los huesos heredadas (osteogénesis imperfecta); trastornos o enfermedades relacionados con el tejido adiposo; enfermedades, trastornos, o lesiones relacionados con el hígado, que incluyen insuficiencia hepática, hepatitis B, y hepatitis C; infartos de miocardio, que incluyen ataque cardíaco o insuficiencias cardíacas crónicas; enfermedades renales o daño en el riñón; enfermedades o daño o necrosis en la retina; curación de heridas (por ejemplo, por cirugía o úlceras diabéticas); trastornos del músculo esquelético tanto traumáticos como heredados; reparación de cartílago y articulaciones tanto traumática como autoinmune; lesiones pulmonares; diabetes; trastornos intestinales; trastornos, enfermedades o lesiones del sistema nervioso, tales como trastornos, enfermedades, o lesiones del sistema nervioso central, que incluyen lesiones en la médula espinal, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, y apoplejía.

Las células madre también se pueden administrar a un paciente con fines cosméticos, tales, aumentando o mejorando características físicas, que incluyen reducción de arrugas, aumento de la masa orgánica, y similares.

Un sistema para retirada de tejido para retirar tejido adiposo de un paciente se ilustra en la Fig. 1. En una realización amplia, el sistema para retirada de tejido 10 incluye un recipiente para extracción de tejido 12 y un recipiente de mezcla 30 acoplado al recipiente para extracción de tejido 12. El acoplamiento entre el recipiente de mezcla 30 y el recipiente para extracción de tejido 12 define preferentemente un sistema cerrado en el que el tejido que se dirige desde el recipiente para extracción de tejido 12 al recipiente de mezcla 30 no está expuesto al entorno externo. El sistema 10 también incluye una salida 32 que está estructurada para permitir la retirada de células madre concentradas del sistema para extracción de tejido 10 para administrar a un paciente. El recipiente para extracción de tejido 12 incluye un puerto de entrada para extraer tejido 14 y un filtro 16. El filtro 16 se coloca dentro del recipiente, y está estructurado para retener tejido adiposo y para pasar tejido no adiposo como, por ejemplo, los tejidos que se retiran del paciente. Más específicamente, el filtro 16 permite el paso de lípidos libres, sangre, y solución salina, mientras que retiene fragmentos de tejido adiposo durante, o en otra realización después, de la extracción inicial del tejido adiposo. En ese respecto, el filtro 16 incluye una pluralidad de poros, de cualquiera del mismo o diferentes tamaños, pero que varían en su tamaño de aproximadamente 20 µm a 5 mm. En una realización preferente, el filtro es una malla de poliéster de calidad médica de aproximadamente 200 µm de espesor con un tamaño de poro de aproximadamente 265 µm y aproximadamente un 47 % de área abierta. Este material alberga el tejido durante el aclarado pero permite el paso de las células a través de la malla después de la desagregación del tejido. Por lo tanto, cuando los tejidos se aspiran del paciente, el tejido no adiposo se puede separar del tejido adiposo. El recipiente de mezcla 30 incluye un puerto de aditivo 31 que está estructurado para permitir que un usuario administre un aditivo al recipiente de mezcla 30 para su mezcla con las células madre contenidas en el recipiente de mezcla 30. En una realización preferente, las dimensiones del recipiente para extracción de tejido 12 deberían ser tales que permiten la retención de aproximadamente 1 litro de fragmentos de tejido dentro del filtro. En otras realizaciones, el recipiente para extracción de tejido 12 se puede dimensionar para que albergue un volumen mayor o menor de fragmentos de tejido; por ejemplo, el recipiente para extracción de tejido se puede dimensionar para que almacene al menos 100 ml de fragmentos de tejido adiposo, y hasta aproximadamente 2 l de fragmentos de tejido adiposo.

Haciendo referencia a las características adicionales presentes en el sistema 10 de la Fig. 1, el puerto de entrada de tejido 14 se acopla a la cánula 24 por medio del tubo 22 para definir una línea de retirada de tejido. En la realización ilustrada, la cánula 24 es una cánula de liposucción de un solo uso, integrada, y el tubo es un tubo flexible. La cánula

está dimensionada para su inserción en un paciente para retirar tejido adiposo del paciente. El tubo 22 usado en el sistema debería ser capaz de resistir la presión negativa asociada con la lipoplastia asistida por succión para reducir la probabilidad de colapso. El recipiente para extracción de tejido 12 también incluye un puerto de aspiración 18 colocado en el lado opuesto del filtro 16 del puerto de entrada de tejido 14. El puerto de aspiración 18 está estructurado para su acoplamiento a un dispositivo de succión 20, que se puede manejar de forma manual o de forma automática. El dispositivo de succión 20 puede ser una jeringa o puede ser un vacío eléctrico, entre otras cosas. El dispositivo de sección 20 sería capaz de proporcionar una presión negativa suficiente al recipiente 12 y a la cánula 24 para aspirar tejido de un paciente. Como se ilustra, el dispositivo de succión 20 se acopla al puerto de aspiración 18 por medio del tubo 22.

Se ilustra que el sistema para retirada de tejido 10 también incluye un recipiente para extracción de células 26 colocado entre el recipiente para extracción de tejido 12 y el recipiente de mezcla 30. El recipiente para extracción de células 26 está colocado dentro del sistema 10 de modo que las células, tales como células madre, pasan desde el recipiente para extracción de tejido 12 al recipiente para extracción de células 26 antes de su paso al recipiente de mezcla 30. En la realización ilustrada, el recipiente para extracción de células 26 se acopla al recipiente para extracción de tejido 12 por medio de un puerto para extracción de tejido 48. En una realización del sistema 10, el recipiente para extracción de células 26 incluye un concentrador celular (no se muestra) que facilita la separación de las células en una suspensión. Un ejemplo de un concentrador celular es un dispositivo de centrifugación que puede separar células de otros materiales basándose, por ejemplo, en el tamaño o la densidad de las células. Otro ejemplo es un filtro de membrana que gira, como se analizaba anteriormente. También se ilustra que el sistema 10 incluye un filtro 28 estructurado para el paso de las células desde el recipiente para extracción de células 26 hasta el recipiente de mezcla 30, y para evitar el paso de material de tamaño mayor, es decir, por ejemplo que el de las células. El recipiente para extracción de células 26 también incluye una salida hacia el recipiente para desechos 36. La dirección del flujo del material contenido en el recipiente para extracción de células 26 se determina mediante la colocación de una o más válvulas que pueden controlar si el material fluye hacia el recipiente para desechos 36 o el recipiente de mezcla 30.

En la realización ilustrada, el filtro de células 28 comprende una pluralidad de poros que tienen un diámetro, o longitud inferior a 200 μm . En ciertas realizaciones, los polos pueden tener diámetros que son inferiores a 200 μm . En otras realizaciones, los poros tienen diámetros entre 20 y 200 μm . El filtro de células 28 puede estar separado del recipiente para extracción de células 26 o puede estar contenido dentro del recipiente para extracción de células 26. El filtro de células 28 también puede estar formado de forma íntegra en el recipiente para extracción de células 26. Algunas realizaciones adicionales del sistema 10 no incluyen el filtro 28. El recipiente para extracción de células se puede fabricar a partir de cualquier material adecuado. Por ejemplo, el recipiente para extracción de células 26 puede ser una bolsa de plástico, tal como las usadas convencionalmente en el procesamiento de sangre en bancos de sangre; o en otras realizaciones, puede ser estructuralmente rígida. En ciertas realizaciones, el recipiente para extracción de células 26 puede incluir una cámara para preparación de componentes y una cámara para lavado/separación celular.

En ciertas realizaciones, la cámara para preparación de componentes incluye uno o más puertos para adición de agentes que puede potenciar el proceso de separación de células madre para su administración a un paciente, tales como factores de crecimiento o tampones para volver a suspender las células, como se ha analizado anteriormente. En estas realizaciones, la cámara para preparación de componentes incluye preferentemente un dispositivo de mezcla para mezclar o agitar las células y aditivos en el recipiente. La cámara para preparación de componentes también incluye uno o más cortos para retirar las células extraídas en la misma. Se puede proporcionar un puerto para que pasen las células hacia el recipiente de mezcla 30. Se pueden proporcionar otros puertos para dirigir las células, o una parte de las células, a otras dianas, tales como materiales para implante, que incluyen fragmentos de hueso; o a dispositivos para cultivo o purificación de células. En una realización, la cámara para lavado/separación celular incluye un componente de filtro de membrana que gira, que se puede usar como el concentrador celular además de o, preferentemente, como una alternativa al dispositivo para centrifugación.

También se ilustra que el sistema 10 incluye una línea a la recuperación de tejido 34 que está colocada para proporcionar un conducto desde el recipiente para extracción de tejido 12 hasta el recipiente de mezcla 30. Por lo tanto, la línea para recuperación de tejido 34 pasado dirige el tejido contenido dentro del recipiente para extracción de tejido 12 al recipiente de mezcla 30 en el que el tejido se puede mezclar con células obtenidas del recipiente para extracción de células 26. En la realización ilustrada, la línea para recuperación de tejido 34 se extiende al recipiente para tejido 12 para retirar tejido adiposo está contenido en el filtro 16. El tejido se hace pasar o se dirige a través de línea para recuperación de tejido 34 usando una o más bombas o dispositivos de succión para hacer pasar el tejido adiposo que se ha aclarado, pero no necesariamente desagregado.

En una realización, el sistema 10 incluye un dispositivo para el control de la temperatura que está colocado con respecto al sistema 10 para ajustar la temperatura del material contenido del recipiente para extracción de tejido 12. En ciertas realizaciones, El dispositivo para el control de la temperatura es un calentador, y en otras realizaciones, el dispositivo para el control de la temperatura es un refrigerador. En realizaciones adicionales, el dispositivo para el control de la temperatura puede ser capaz de cambiar entre un calentador y un refrigerador. El dispositivo para el control de la temperatura puede ser un dispositivo que ajusta la temperatura del tejido adiposo contenido en el

recipiente para extracción de tejido 12, o puede ser un dispositivo que está colocado para cambiar la temperatura del fluido que se está administrando al recipiente para extracción de tejido 12. Se ha encontrado que el calentamiento del tejido adiposo facilita la desagregación del tejido para aumentar la separación del componente celular activo. Además, en ciertas realizaciones es deseable enfriar una parte del tejido, preferentemente el componente celular activo para proporcionar protección las células. Incluso la refrigeración suave de las células puede proporcionar protección adecuada para aumentar la supervivencia celular durante el procesamiento.

Se ilustra que la salida 32 del sistema para retirada de tejido 10 es un componente del recipiente de mezcla 30. En realizaciones adicionales, la salida 32 está separada del recipiente de mezcla 30. La salida 32 comprende preferentemente un cierre que mantiene la configuración sellada del sistema para retirada de tejido 10, y en ciertas realizaciones, la salida 32 comprende una membrana impermeable a fluidos (por ejemplo, una membrana que es impermeable a líquidos y aire). La salida 32 se debería estructurar para hacer pasar la composición en el recipiente de mezcla 30 a un paciente en las condiciones apropiadas. Por ejemplo, si se usa una jeringa para retirar la composición, la salida 32 debería ser capaz de acomodar una aguja de la jeringa sin comprometer la esterilidad del sistema o composición. En realizaciones adicionales, si la salida se acopla a un dispositivo que está configurado para administrar la composición, pero no para retirar la composición, tal como una cánula que administra la composición mediante la aplicación de presión positiva para desplazar la composición a través de la cánula, la salida 32 se debería configurar para permitir que la composición contenida en el recipiente de mezcla 30 pase en la cánula. En otras realizaciones, la salida 32 puede comprender, o se puede acoplar de una forma de sistema cerrado al dispositivo para administrar la composición, tal como una aguja de una jeringa una cánula para administrar la composición mediante la aplicación de presión positiva.

También se ilustra que el sistema para retirada de tejido 10 incluye un recipiente para desechos 36 colocado para extraer desechos desde el recipiente para extracción de tejido 12. En la realización ilustrada, el recipiente para desechos 36 también se acopla y se coloca para recibir desechos desde el recipiente para extracción de células 26. Se proporciona un recipiente para lavado 38 en comunicación fluida con la línea de lavado 39 para administrar un fluido de lavado, tal como solución salina o cualquier otro tampón adecuado, desde el puerto de lavado 46 hasta el recipiente para extracción de tejido 12. El recipiente para extracción de tejido 12 también incluye una entrada de aire 40 para controlar la cantidad de presión dentro del recipiente para extracción de tejido 12. Se proporciona una línea de aditivo 42 en el recipiente para extracción de tejido 12 para permitir la adición de un aditivo al recipiente para extracción de tejido 12. En referencia a los métodos que se desvelan el presente documento, se proporciona una línea de aditivo 42 para administrar una o más enzimas al recipiente para extracción de tejido 12 para facilitar la separación del componente celular activo del resto del tejido adiposo contenido en el filtro 16. Como se ilustra, la línea de aditivo 42 comprende una aguja 44 que se puede usar para recibir la enzima desde el recipiente adecuado.

Una realización en particular de componentes del sistema para retirada de tejido 10 se ilustra en las Figs. 2 y 3 en el que los mismos números representan las mismas partes. In la realización en particular de las Figs. 2 y 3, el recipiente para extracción de tejido 12 incluye un cuerpo que mantiene su forma cuando se aplica succión al recipiente. Más específicamente, el recipiente para extracción de tejido 12 incluye un cuerpo rígido, por ejemplo, un cuerpo construido con un policarbonato de calidad médica que contiene un bolsillo de filtro más o menos cónico de poliéster de calidad médica con un tamaño de malla de 275 μm . El recipiente para extracción de tejido rígido puede tener un tamaño de aproximadamente veinte centímetros de altura y aproximadamente trece centímetros de diámetro; el espesor de la pared puede ser de aproximadamente 0,318 centímetros. Se accede al interior del cilindro a través de dos puertos para tubo de succión, dos puertos contuvo para conexión a través de tecnología de acoplamiento estéril, y dos puertos para acceso de punción con aguja a través de un tabique de goma. La misma funcionalidad se podría conseguir con diferentes materiales, tamaño de malla, y el número y tipo de puertos. Por ejemplo, tamaños de poro de la malla inferiores a 100 μm o tan grandes como varios miles de micrómetros conseguirían la misma finalidad de permitir el paso de solución salina y células sanguíneas a la vez que se retienen agregados y fragmentos de tejido adiposo. De forma análoga, la finalidad del dispositivo se podría conseguir mediante el uso de un material de plástico rígido alternativo, mediante la sustitución de la cánula desechable por una cánula estéril de múltiples usos, no desechable, o mediante otras muchas modificaciones que serían conocidas por los expertos en la materia. Sin embargo, en otras realizaciones del sistema para retirada de tejido 10, el recipiente para extracción de tejido 12 puede incluir un cuerpo plegable, tal como una bolsa para extracción de tejido. En tales sistemas, la bolsa se proporciona preferentemente con un soporte, tal como un marco interno o externo, que ayuda a reducir la probabilidad de que la bolsa se pliegue después de la aplicación de succión a la bolsa.

Para reducir la contaminación dentro del sistema para retirada de tejido 10, se pueden proporcionar uno o más elementos de sujeción 23 en las diversas líneas o conductos para controlar el flujo de material a través de las líneas a los diversos componentes del sistema. Los elementos de sujeción 23 permiten que un usuario selle de forma eficaz diversas regiones del sistema para retirada de tejido 10. En una realización preferente, uno o más de los componentes del sistema 10 son desechables. Al evitar la reutilización de los componentes de la presente realización se ayuda a reducir la contaminación que puede estar asociada con el uso repetido de diversos componentes. Además, la provisión de los componentes en un conjunto desechable proporciona la ventaja de que se pueden esterilizar todos los componentes de una sola de, lo que puede reducir sustancialmente el tiempo necesario para poner en práctica los métodos que se desvelan en el presente documento. En realizaciones total o

parcialmente automatizadas, se pueden implementar válvulas controladas por ordenador además o como una alternativa a los elementos de sujeción 23.

Además, el sistema para retirada de tejido 10 puede incluir dispositivos o componentes adicionales que permiten, entre otras cosas, la determinación del volumen de material retenida el filtro 16, para permitir el registro de la información escrita con respecto al proceso de extracción o procesamiento, o realizar otras funciones complementarias tales como la unión del dispositivo a un soporte o base durante la operación.

Los componentes del sistema para retirada de tejido 10 se deberían fabricar con materiales que no son reactivos con fluidos o tejidos biológicos, y no reactivos con agentes usados en el procesamiento de fluidos y tejidos biológicos. Además, los materiales a partir de los se fabrican que los diversos componentes deberían ser capaces de resistir la esterilización, tal como mediante autoclave, e irradiación, que incluye, pero no se limita a radiación beta o gamma. La sujeción del tubo y de la cánula se puede fabricar con cualquier material adecuado, tal como polietileno. La cánula se puede fabricar con acero inoxidable.

De acuerdo con la invención que se desvela en el presente documento, el sistema para retirada de tejido 10 proporciona un sistema cerrado que es conveniente para la retirada, procesamiento, y administración de células madre encontradas en el tejido adiposo. El sistema se puede colocar cerca del paciente para la retirada del tejido adiposo, y el tejido se puede procesar sin que sea necesario que el tejido se retire del sistema. Por lo tanto, se proporciona un sistema que puede proporcionar composiciones con aumento de células madre recientes a un paciente, y reduce los riesgos potenciales asociados con el cultivo y/o la conservación de células madre.

Haciendo referencia a la divulgación en el presente documento, un método para la extracción de tejido de un paciente puede incluir la siguiente etapas: (i) preparar al paciente como para una lipoplastia tradicional; (ii) retirar la cánula y el sistema para retirada de tejido de los materiales de envasado al campo estéril; (iii) conectar una bomba de liposucción (con trampa convencional y filtros microbianos en línea) albarazado de la manguera que se dirige desde el recipiente para extracción de tejido; (iv) asegurar que los elementos de sujeción con tornillo de los tubos no se comprometen en los puertos de succión del recipiente para la extracción de tejido; (v) usar la cánula como una cánula de liposucción regular para retirar tejido adiposo no deseado; (vi) aplicar con una realización de operación manual dos elementos de sujeción con tornillo de los tubos para sellar el recipiente para extracción de tejido después de que se haya extraído la cantidad deseada de tejido adiposo con el recipiente para extracción de tejido; y (vii) asegura que el recipiente para extracción de tejido está marcado adecuadamente con una etiqueta para identificación del paciente identification, y registrar otra información en la etiqueta (fecha y hora del procedimiento, etc.) de acuerdo con la práctica institucional.

Haciendo referencia al sistema para retirada de tejido 10 ilustrado, el tejido se extrae directamente en los componentes de procesamiento mediante la unión del tubo 22 a la fuente de succión 20 con una trampa de fluido en línea e insertando la cánula 24 en el sitio de extracción. A continuación, el tejido adiposo se aspira en el recipiente para extracción de tejido 12 en el que se retiene con el filtro 16 mantenido dentro del recipiente para extracción de tejido 12. Después de la extracción de tejido, el tejido adiposo extraído se puede aclarar con un fluido de lavado, tal como solución salina isotónica estéril, contenida en el recipiente de lavado 38 y se añade al recipiente para extracción de tejido 12 a través de una línea de lavado 39. Cuando el recipiente para extracción de tejido 12 está fabricado con un material rígido en la realización ilustrada para soportar la succión en la extracción, el aire desplazado desde el alojamiento durante la adición de solución salina se puede descargar a través del puerto de entrada de aire 40. Como alternativa, el aire se puede desplazar en el recipiente para desechos 36 o lugar para alojamiento similar. Una vez que el tejido se aclara, se puede permitir que el material de desecho fluya en el recipiente para desechos 36.

Haciendo referencia a la divulgación en el presente documento, las unidades de tejido adiposo intacto se pueden retirar del recipiente para extracción de tejido 12 antes de la desagregación del tejido adiposo en el recipiente para extracción 12. Las unidades de tejido adiposo intacto se pueden pasar a lo largo de la línea para recuperación de tejido 34 de modo que las unidades se pueden distribuir al recipiente de mezcla 30. En estos ejemplos, el tejido intacto se puede mezclar con las células madre antes de su administración a un paciente.

Después de haber extraído el tejido, la aguja 44 se puede insertar en un vial estéril de solución enzimática que contiene colagenasa que a continuación se pasa al recipiente para extracción de tejido 12 en el que se mezcla con el tejido adiposo a o aproximadamente a 37 °C durante 30-60 minutos. Las etapas de lavado se pueden repetir según sea necesario y el tejido desagregados se puede lavar después de la elución de la población de células activas para maximizar el rendimiento. Al final de la desagregación del tejido, el recipiente para extracción de tejido 12 se coloca en vertical para permitir la flotación de los adipocitos. A continuación, se permite que la población de células activas fluya en el recipiente para extracción de células 26 en el que las células se separan de la colagenasa y del lípido libre residual. Las células se pueden lavar y/o concentra con cualquier método conocido para las personas con una experiencia habitual en la materia que incluye, pero no se limita a, lavados con centrifugación/resuspensión secuenciales o mecanismos de flujo continuo. A continuación, se permite que las células lavadas, concentradas fluyan en el recipiente de mezcla 30 en el que se pueden mezclar con tejido intacto de la línea para recuperación de tejido 34 y/o cualquier aditivo pretendido antes de su retirada a través de la salida 32

para su administración a un paciente. El material contenido en el recipiente para extracción de células 26 se puede filtrar usando el filtro celular 28 seguido de lavado para aumentar la retirada de células residuales y agregados tisulares no deseados que podría conducir la embolia después de su aplicación.

Durante el procesamiento, se pueden añadir uno o más aditivos a los diversos recipientes cuando sea necesario para aumentar los resultados. Algunos ejemplos de aditivos incluyen agentes que optimizan el lavado y la desagregación, aditivos que aumentan la viabilidad de la población de células activas durante el procesamiento, agentes antimicrobianos (por ejemplo, antibióticos), aditivos que lisan adipocitos y/o glóbulos rojos, o aditivos que enriquecen las poblaciones de células de interés (mediante adherencia diferencial arrestos en fase sólida o para estimular de otro modo la reducción por enriquecimiento sustancial de las poblaciones de células).

En los ejemplos mencionados anteriormente, el recipiente para extracción de tejido 12 es intrínseco a los componentes de procesamiento del sistema para retirada de tejido 10. Como alternativa un recipiente para extracción de tejido separado, tal como el que se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 10/242.094, con el título 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 Estados Unidos Nº 60/322.070 presentada el 14 de septiembre de 2001. En las Patentes de Estados Unidos Nº 6.316.247 y 5.372.945 se desvelan recipientes para extracción de tejido potenciales adicionales.

Como se ha indicado anteriormente, los métodos se pueden automatizar proporcionando uno o más dispositivos adicionales que pueden realizar de forma automática las etapas de los métodos. En tales realizaciones, un dispositivo de procesamiento (por ejemplo, microprocesador u ordenador personal) es un dispositivo para automatizar parcial o completamente las etapas que se han descrito anteriormente. Algunos ejemplos de etapas susceptibles de dicha automatización incluyen, pero no se limitan a, controlar la entrada y salida de fluidos y tejidos a lo largo de trayectorias de los tubos en particular mediante el control de bombas y válvulas del sistema o dispositivo de procesamiento; detectar bloqueos con sensores de presión; mecanismos de mezcla, medir la cantidad de tejido y/o fluido a mover a lo largo de una ruta en particular usando mecanismos volumétricos; mantener las temperaturas de los diversos componentes usando dispositivos para el control del calor; lavar y concentrar la célula, e integrar el proceso con mecanismos de sincronización y software. En una realización, el software puede controlar los parámetros del proceso para permitir la producción de una población de células separadas para parámetros unidos por el operario. Por lo tanto, el dispositivo o dispositivos de automatización mejoran el rendimiento de los procedimientos y proporcionan extracción automática del tejido adiposo y procesamiento del tejido adiposo para administración a un paciente.

Un dispositivo de automatización en particular se ilustra en la Fig. 4. Un recipiente para retirada de tejido (no se muestra) se coloca en un dispositivo 100 usando marcas de guía codificadas por color 112-118 para alinear e insertar apropiadamente el tubo en las rutas apropiadas. El dispositivo 100 incluye una pluralidad de válvulas 105 y 110, y una pluralidad de bombas 104 y 109. El tubo se coloca en una serie de válvulas 105, 110 y bombas 104, 109 que están controladas con un sistema de microprocesador integrado para coordinar el flujo de fluido y tejido de acuerdo con el programa definido por el usuario, la selección del programa está mediada a través de un panel de interfase del usuario 106. Un recipiente de solución salina se coloca en una estructura de soporte 101 y se une al recipiente para extracción de tejido. Un vial o tubo de colagenasa u otro medio o mezcla de disociación de tejido (no se muestra) se inserta en el recipiente para extracción de tejido en el punto 103. Una bolsa para desechos (no se muestra) se inserta en una estructura de soporte 111, la cámara/recipiente de separación celular para extracción de células se coloca en una estructura de soporte 107, y el recipiente de mezcla de tejido/células se coloca en la estructura de soporte 108. El recipiente para extracción de tejido se coloca en la cámara de agitación/incubación 102.

El tejido adiposo se puede extraer en el recipiente para extracción de tejido mientras que el recipiente está en una posición dentro del dispositivo o antes de la colocación dentro del dispositivo. El dispositivo puede contener un inserto transparente opcional 119 u otro dispositivo que permite la determinación del volumen de tejido dentro del recipiente para extracción de tejido. Como alternativa, el volumen se puede determinar por medida del peso del material contenido en la cámara de agitación/incubación 102 (que corresponde al recipiente para extracción de tejido 12). Este volumen se puede presentar en la pantalla de la interfase de usuario 106.

A continuación, el microprocesador abre las válvulas 105 en las líneas 114 y 115 y activa las bombas 104 en la línea 114 a la introducción de solución salina en la cámara de extracción 102 y retirada del material de desecho 115 a la bolsa para desechos 111. Durante este proceso, la cámara de extracción se agita con sacudidas, y se mantiene a una temperatura programada mediante dispositivos de calentamiento integrados en la cámara 102. En ciertos ejemplos, el procesamiento del tejido puede usar solución salina calentada previamente en cuyo caso el papel del dispositivo de calentamiento de la cámara de agitación/incubación es mantener la temperatura en el punto programado previamente determinado en lugar de aumentar la temperatura.

Una vez que el tejido se lava, alguna fracción de un 0 % a un 100 % del tejido adiposo lavado, intacto se puede retirar de la cámara de incubación 102 mediante activación de la bomba 109 y la válvula 110 en la línea 116. En este momento, la retirada del material se mantiene en la cámara de mezcla 108. El medio de disociación 103 se añade al material que permanece en la cámara 102 abriendo la válvula 105 en la línea 113, cerrando otras válvulas y

activando la bomba 104 en la línea 113. Después de la adición de medio de disociación, la cámara 102 se agita y se mantiene en la temperatura como se ha descrito anteriormente. Al final del periodo de incubación programado, la agitación se detiene para permitir la flotación de los adipocitos. Se puede añadir solución salina adicional para facilitar este proceso. Después de la flotación de los adipocitos, las válvulas en las líneas 112 y 115 se abren para permitir la retirada de la población de células diana de la cámara 102 en la cámara de lavado celular 107. Las células lavadas se retiran a través de la línea 117 en la Cámara de mezcla 108, el sobrenadante y la solución de lavado se retiran en la cámara para desechos 111 a través de la línea 118. La solución salina adicional se pasa del sistema a través de la línea 114 para completar el proceso de lavado. Las células se mezclan en la cámara 108 con cualquier tejido intacto retirado a través de la línea 116 al inicio del procesamiento. La mezcla se puede conseguir mediante cualquier medio conocido por los expertos en la materia que incluye, pero no se limita a, agitación con sacudidas/inversión de la cámara, o mediante compresión pulsada o por rodillos el movimiento. El material mezclado se puede retirar a continuación a través del puerto en la cámara de mezcla del conjunto desechable.

El dispositivo incluye un mecanismo controlado con microprocesador para automatizar el proceso de acuerdo con parámetros programados previamente 106. Este sistema también incluía el uso de sensores de presión para la detección de bloqueos y mecanismos similares de control de seguridad y calidad. En una realización preferente, el componente de software del sistema incluiría extracción automatizada de "datos del desarrollo" que incluyen, por ejemplo, los números de lote de los componentes desechables, medidas de temperatura y volumen, parámetros del volumen tisular y del número de células, dosis de enzimas aplicadas, tiempo de incubación, identidad del operario, fecha y hora, identidad del paciente, etc.. En una realización preferente del dispositivo, se integraría un sistema de lectura de código de barras para permitir la entrada de datos de estas variables (por ejemplo número de lote y fecha de caducidad del conjunto desechable, número de lote y fecha de caducidad de la Colagenasa, identificadores del paciente/muestra, etc.) en el controlador del dispositivo como parte de la documentación del procesamiento. Esto reduciría la posibilidad de errores en la entrada de datos. Este dispositivo se podría incorporar fácilmente en el sistema controlador usando un USB u otro puerto y sistema de interfase conocidos en la técnica. De este modo, el dispositivo proporcionaría el control integrado de la entrada de datos y documentación del proceso. Un informe impreso de estos parámetros formaría parte de los parámetros definidos por el usuario de una operación programada del dispositivo. Naturalmente, esto necesitaría la integración de un componente de impresión (hardware y controlador) o controlador de impresión en el software más un conector de salida de interfase para una impresora (por ejemplo, un puerto USB) en el hardware del dispositivo.

En una realización más, el software incorporado en el controlador podría solicitar a los usuarios a través de las etapas necesarias la inserción adecuada de tubos y otros elementos en el dispositivo. El software también iniciaría pruebas el ensayo automatizado para confirmar la inserción correcta del tubo, ausencia de bloqueos, etc.

El enfoque general para el procesamiento en este dispositivo usaría los mismos parámetros que los que se describen en cualquier parte en la presente divulgación para procesamiento manual de células.

Otras muchas conformaciones de los mecanismos manipulados usados para el procesamiento celular sean evidentes para un experto en la materia y la presente descripción se incluye solamente como un ejemplo. Por ejemplo, se puede producir mezcla y desagregación de tejido y solución salina durante el lavado mediante agitación tal como en el presente ejemplo o mediante recirculación de fluidos. El lavado celular se puede mediar mediante un mecanismo de flujo continuo tal como el enfoque de membrana que gira, adherencia diferencial, centrifugación diferencial (que incluye pero no se limita a, sedimentación diferencial velocidad, o separación en gradiente), o mediante una combinación de medios. De forma análoga, los componentes adicionales para permitir la manipulación adicional de células que incluyen la adición de factores de crecimiento u otros modificadores de la respuesta biológica (Lind, M., Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. *Acta Orthop Scy Suppl*, 1998, 283: p. 2-37; Hanada, K., J.E. Dennis, y A.I. Caplan, Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morfogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res*, 1997, 12 (10): p. 1606-14; Lieberman, J.R., *et al.*, Regional gene therapy with a BMP-2-producing murine stromal cell line induces heterotopic and ortotopic bone formation in rodents. *J Orthop Res*, 1998, 16 (3): p. 330-9), mezcla de células con otros componentes estructurales (por ejemplo, fragmentos de hueso (Jean, J.L., S.J. Wang, y M.K. Au, Treatment of a large segmental bone defect with allograft and autogenous bone marrow graft. *J Formos Med Assoc*, 1997, 96 (7): p. 553-7), colágeno (Saadeh, P.B., *et al.*, Repair of a Critical Size Defect in the Rat Mandible Using Allogenic Type I Collagen. *J Craniofac Surg*, 2001, 12 (6): p. 573-579) y/o componentes sintéticos destinados al implante con las células en el receptor (Petite, H., *et al.*, Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol*, 2000, 18 (9): p. 959-63, ;Gao, J., *et al.*, Tissue-Engineered Fabrication of an Osteochondral Composite Graft Using Rat Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng*, 2001, 7 (4): p. 363-71; Ohgushi, H. y A.I. Caplan, Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *J Biomed Mater Res*, 1999, 48 (6): p. 913-27; Caplan, A.I. y V.M. Goldberg, Principles of tissue engineered regeneration of skeletal tissues. *Clin Orthop*, 1999 (367 Suppl): p. S12-6). La manipulación después del procesamiento también puede incluir cultivo celular (Caplan, A.I. y S.P. Bruder, Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med*, 2001, 7 (6): p. 259-64; Petite, mencionado anteriormente; Zuk, P.A., *et al.*, Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell- based therapies. *Tissue Eng*, 2001, 7 (2): p. 211-28), transferencia genética (Luskey, B.D., *et al.*, Gene transfer into murine hematopoietic stem cells and bone marrow stromal cells. *Ann N Y Acad Sci*, 1990, 612 (398): p. 398-406; Grompe,

M., *et al.*, Therapeutic trials in the murine model of hereditary tyrosinaemia type I: a progress report. *J Inherit Metab Dis*, 1998, 21 (5): p. 518-31; Gazit, D., *et al.*, Engineered pluripotent mesenchymal cells integrate and differentiate in regenerating bone: a novel cell-mediated gene therapy. *J Gene Med*, 1999, 1 (2): p. 121-33; Mosca, J.D., *et al.*, Mesenchymal stem cells as vehicles for gene delivery. *Clin Orthop*, 2000 (379 Suppl): p. S71-90), o purificación celular adicional (Greenberg, A.W. y D.A. Hammer, Cell separation mediated by differential rolling adhesion. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 73 (2): p. 111-24; Mainwaring, G. y A.F. Rowley, Separation of leucocytes in the dogfish (*Scyliorhinus canicula*) using density gradient centrifugation and differential adhesion to glass coverslips. *Cell Tissue Res*, 1985, 241 (2): p. 283-90; Schweitzer, C.M., *et al.*, Isolation and culture of human bone marrow endothelial cells. *Exp Hematol*, 1995, 23 (1): p. 41-8). Los mecanismos para la realización de tales funciones se pueden integrar dentro del dispositivo que se muestra en la Figura 4 o se pueden incorporar en dispositivos separados.

Haciendo referencia a la divulgación en el presente documento, el tejido extraído en una trampa de tejido adiposo convencional se podría transferir en un conjunto de procesamiento diseñado para procesar otros tejidos. Por ejemplo, Baxter Inc. fabrica y comercializa una serie de bolsas de plástico y filtros destinados a su uso en la instalación de una extracción para trasplante de médula ósea ("Kit para Recogida de Médula Ósea con Pre-Filtros y Filtros En Línea Flexibles", Código de Producto, 4R2107, documentos de Patente de Estados Unidos N^{os} 4.346.703 y 5.724.988). Este conjunto de bolsa contiene una bolsa cónica grande con un filtro integrado de 800 µm que se podría usar para lavar el tejido adiposo extraído. En este ejemplo, los fragmentos de tejido adiposo con un tamaño superior a 800 µm quedarían retenidos en la bolsa. Estos fragmentos se podrían lavar a continuación mediante adición repetida de solución salina (u otra solución de lavado) seguido de retirada del material de desecho a través de puertos por debajo del filtro. La mezcla se podría conseguir manualmente o mediante el uso de un dispositivo de sacudida sobre el banco de trabajo y se podría aplicar calentamiento mediante el uso de una almohadilla térmica. La desagregación se podría producir dentro del diámetro interior de esta bolsa. Después de la desagregación, las células pasarían a través del filtro integrado de 800 µm (y opcionalmente a través de uno o más filtros de tamaño de malla más pequeño proporcionado con el kit) se extraerían a una bolsa de extracción (que también se proporciona). A continuación con esta bolsa se podría colocar en una centrifugadora (por ejemplo, una Sorval RC-3C) en la que las células se podrían lavar y concentrar en serie. Las células también se podrían lavar usando dispositivos de lavado celular existentes (muy desarrollados para lavado de productos de sangre humana) tales como los que se comercializan en Baxter Inc (Cytomate o Baxter CS3000) o en Cobe Inc. (Cobe Spectra). Los elementos desechables se pueden integrar usando los accesorios proporcionados por el fabricante o se podrían unir mediante el uso de un dispositivo de conexión estéril tal como los que se fabrican en Terumo Inc. De forma análoga, los mecanismos que se describen en este enfoque menos integrado se podrían unir a un controlador central y ensamblar como componentes de un dispositivo más integrado. Una bomba o batería de bombas peristáltica as se podría usar para automatizar el flujo de fluido con el uso de elementos de sujeción manuales o automatizados para abrir y cerrar las rutas de fluido.

En una realización preferente de la invención, el sistema para retirada de tejido y el conjunto de procesamiento estarían presentes en las proximidades del paciente que recibe el tratamiento, tales como en la sala de operaciones o en la sala de procedimiento para pacientes externos (de forma eficaz en la cabecera del paciente). Esto permite una extracción y procesamiento de tejido rápidos, eficaces, elimina la oportunidad de errores en la manipulación/etiquetado de la muestra de ensayo y por lo tanto permite la realización de todo el proceso en el transcurso de un solo procedimiento quirúrgico.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar situaciones y entornos en particular en los que se puede aplicar esta tecnología y no pretenden restringir al alcance de la invención y de las reivindicaciones incluidas en la presente divulgación.

Ejemplo 1: Transferencia de Grasa Autóloga

La transferencia de grasa autóloga es un procedimiento cosmético y estructural relativamente común que implica la extracción de tejido adiposo (grasa) desde una posición y reimplante en otra posición dentro del mismo individuo (Coleman, S. R. (1995). "Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations". *Aesthetic Plast Surg* 19 (5): 421-5; Coleman, S. R. (2001). "Structural fat grafts: the ideal filler?" *Clin Plast Surg* 28 (1): 111-9; Coleman, W. P., 3rd (1991). "Autologous fat transplantation". *Plast Reconstr Surg* 88 (4): 736.). Sin embargo, como se ha indicado anteriormente, este procedimiento se ve comprometido frecuentemente por un injerto incoherente dado que el material implantado se reabsorbe total o parcialmente o se sustituye tejido cicatricial (Eremia, S. y N. Newman (2000). "Long-term follow-up after autologous fat grafting: analysis of results from 116 patients followed at least 12 months after receiving the last of a minimum of two treatments". *Dermatol Surg* 26 (12): 1150-8). Al menos parte de la pérdida de función se puede atribuir a la necrosis del tejido graso implantado durante el momento en el que toma nuevos vasos sanguíneos para formar y alimentar el implante. Por lo tanto, el tejido implantado en zonas altamente vasculares tales como camas musculares muestran un mejor injerto que cuando se implanta en tejidos refundidos de una forma menos adecuada (Guerrerosantos, J., A. Gonzalez-Mendoza, *et al.* (1996). "Long-term survival of free fat grafts in muscle: an experimental study in rats". *Aesthetic Plast Surg* 20 (5): 403-8).

El lipoaspirado procesado preparado como se describe en la presente divulgación se ocupa de este tema complementando el implante con precursores endoteliales y células madre adicionales. Los fragmentos de tejido

adiposo extraído de ratas Wistar endogámicas se mezclaron con lipoaspirado procesado de acuerdo con los métodos que se desvelan en el presente documento. A continuación, esta composición se implantó por vía subcutánea en el muslo y por debajo del cuero cabelludo de las ratas receptoras. Como controles, un número igual de animales recibió solamente tejido adiposo (lipoaspirado no procesado) bajo el cuero cabelludo mientras que los animales que recibieron un implante en el muslo presentaban el muslo contralateral implantado solamente con tejido adiposo. Los injertos extrajeron un mes después del implante.

Los resultados (Fig. 5) muestran una tendencia de aumento del peso del injerto en implantes en el muslo con aumento de la dosis del lipoaspirado procesado. El examen histológico de los implantes mostró un aumento de la vascularidad de los injertos complementada con lipoaspirado procesado. Se observó una correlación similar con implantes de cuero cabelludo si bien con menor retención global debido a la baja vascularidad del cráneo dorsal en estas ratas.

En una aplicación clínica de esta tecnología, el lipoaspirado procesado derivado de acuerdo con la presente divulgación se prepara y se mezcla con fragmentos de tejido adiposo intacto (no desagregado), como se ha desvelado anteriormente. La composición que comprende la mezcla de tejido adiposo y las células madre se pueden implantar en el receptor para proporcionar una carga de tejido blando autólogo para corrección de defectos de contorno (arrugas, "agujeros", marcas de viruela, y defectos mayores) (Coleman, S. R. (2001). "Structural fat grafts: the ideal filler?" *Clin Plast Surg* 28 (1): 111-9) o para proporcionar soporte a estructuras dañadas tales como la uretra (Palma, P. C., C. L. Riccetto, *et al.* (1997). "Repeated lipoinjections for stress urinary incontinence". *J Endourol* 11 (1): 67-70; Lee, P. E., R. C. Kung, *et al.* (2001). "Periurethral autologous fat injection as treatment for female stress urinary incontinence: a randomized double-blind controlled trial". *J Urol* 165 (1): 153-8).

Ejemplo 2: Lesión Hepática Aguda

El daño hepático inducido por inyección intraperitoneal con alcohol alílico es un modelo común de lesión hepática aguda periportal (Lee, J. H., Z. Ilic, *et al.* (1996). "Cell kinetics of repair after allyl alcohol-induced liver necrosis in mice". *Int J Exp Pathol* 77 (2): 63-72; Werlich, T., K. J. Stiller, *et al.* (1999). "Experimental studies on the stem cell concept of liver regeneration. II". *Exp Toxicol Pathol* 51 (1): 93-8; Yin, L., D. Lynch, *et al.* (1999). "Participation of different cell types in the restitutive response of the rat liver to periportal injury induced by allyl alcohol". *J Hepatol* 31 (3): 497-507). Este modelo se ha acusado para demostrar la presencia de una población de células madre que es crítica para la regeneración hepática (Yavorkovsky, L., E. Lai, *et al.* (1995). "Participation of small intraportal stem cells in the restitutive response of the liver to periportal necrosis induced by allyl alcohol". *Hepatology* 21 (6): 1702-12; Werlich, T., K. J. Stiller, *et al.* (1999). "Experimental studies on the stem cell concept of liver regeneration. II". *Exp Toxicol Pathol* 51 (1): 93-8). Los inventores modificaron este modelo en ratones Swiss Webster en los que la lesión siga por alcohol fue seguida de inyección del lipoaspirado procesado. Los animales se sacrificaron a la semana y los hígados se extrajeron, se pesaron, y se prepararon para examen histológico. Los resultados (Figs. 6 y 7) muestran sustancialmente un aumento del peso del hígado en los animales que reciben lipoaspirado procesado. El análisis histológico presentaba histología normal dentro de los animales tratados sin evidencia de infiltrado leucocitario a ningún otro mecanismo que podría aumentar de forma anómala el peso del hígado.

En una instalación clínica, se extraería tejido adiposo de un paciente con daño hepático y se procesaría de acuerdo con la presente divulgación. A continuación, el lipoaspirado procesado se podría inyectar por vía intravenosa para administración sistémica o dirigida al hígado a través del sistema circulatorio hepático.

Ejemplo 3: Daño Cardíaco Agudo

El infarto de miocardio agudo (ataque cardíaco) da como resultado de lesión isquémica en el miocardio. El daño tisular se puede minimizar por perfusión del tejido dañado y por regeneración del tejido del miocardio (Murry, C. E., R. W. Wiseman, *et al.* (1996). "Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis". *J Clin Invest* 98 (11): 2512-23; Orlic, D., J. Kajstura, *et al.* (2001). "Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium". *Nature* 410 (6829): 701-5; Rajnoch, C., J. C. Chachques, *et al.* (2001). "Cellular therapy reverses myocardial dysfunction". *J Thorac Cardiovasc Surg* 121 (5): 871-8; Strauer, B. E., M. Brehm, *et al.* (2002). "Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans". *Circulation* 106 (15): 1913-8). El enfoque de cabecera que se describe en la presente divulgación proporcionaría una fuente potencialmente superior de células degenerativas en el que las células se podrían proporcionar en números y pureza mayores sin la morbilidad asociada con una extracción de médula ósea.

Ejemplo 4: Aplicación Alogénica para Enfermedad Hereditaria

Horwitz *et al.*, han demostrado que las células madre de médula ósea pueden proporcionar beneficio clínico a pacientes con un trastorno no hematopoyético, específicamente la Osteogénesis imperfecta (Horwitz, E. M., D. J. Prockop, *et al.* (1999). "Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta". *Nat Med* 5 (3): 309-13; Horwitz, E. M., D. J. Prockop, *et al.* (2001). "Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta". *Blood* 97 (5): 1227-31). En esos estudios, los autores intentaron compensar el número y frecuencia bajos de células madre no

hematopoyéticas en médula ósea mediante el crecimiento de células en cultivo para expandir y purificar el componente de MSC. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, el crecimiento de células en cultivo está asociado con preocupaciones técnicas y clínicas sustanciales y el potencial del tejido adiposo, procesado de acuerdo con la presente divulgación, para proporcionar una fuente de un gran número de células madre sin necesidad de cultivo celular representa una mejora importante potencial en el cuidado de los pacientes. En este modelo, un donante emparejado adecuadamente sin afectar con la enfermedad genética (genotipo normal o vehículo asintomático), preferentemente un hermano u otro pariente de primer grado, sería la fuente de células donantes aunque el uso de donantes sin relacionar esta dentro del alcance de la presente invención. Las células se extraerían del tejido adiposo para infusión en un paciente con una enfermedad heredada dando como resultado una función o regeneración tisular comprometida. Algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a Osteogénesis imperfecta, Distrofia de Muscular Duschene (y otras Distrofias Musculares), enfermedades degenerativas de la retina heredadas, tirosinemia hereditaria, y otras numerosas enfermedades hereditarias.

Un corolario de esto es que la aplicación de enfoques de terapia genética en los que el lipoaspirado (auto) procesado autólogo se modifica por inserción de un gen en el compartimento de la célula madre podría evitar la necesidad de un donante (no-auto) alogénico. Tal enfoque también se podría usar en el tratamiento de enfermedades infecciosas en las que se inserta un nuevo gen en las células madre. Por ejemplo, se podría usar un constructo antisentido o de ribozima para generar células capaces de proporcionar un efecto anti-VIH. Este enfoque también se podría usar para generar células madre capaces de actuar como vehículos para administración de fármacos.

Referencias

- Avital, I., D. Inderbitzin, *et al.* (2001). "Isolation, characterization, and transplantation of bone marrow-derived hepatocyte stem cells". *Biochem Biophys Res Commun* 288 (1): 156-64.
- Carmeliet, P. y A. Luttun (2001). "The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis". *Thromb Haemost* 86 (1): 289-97.
- Castro-Malaspina, H., W. Ebell, *et al.* (1984). "Human bone marrow fibroblast colony-forming units (CFU-F)". *Prog Clin Biol Res* 154: 209-36.
- Coleman, S. R. (1995). "Long-term survival of fat transplants: controlled demonstrations". *Aesthetic Plast Surg* 19 (5): 421-5.
- Coleman, S. R. (2001). "Structural fat grafts: the ideal filler?" *Clin Plast Surg* 28 (1): 111-9.
- Coleman, W. P., 3^o (1991). "Autologous fat transplantation". *Plast Reconstr Surg* 88 (4): 736.
- Connolly, J. F. (1998). "Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis". *Clin Orthop* (355 Suppl): S257-66.
- Eremia, S. y N. Newman (2000). "Long-term follow-up after autologous fat grafting: analysis of results from 116 patients followed at least 12 months after receiving the last of a minimum of two treatments". *Dermatol Surg* 26 (12): 1150-8.
- Fukuda, K. (2001). "Development of regenerative cardiomyocytes from mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering". *Artif Organs* 25 (3): 187-93.
- Guerrerosantos, J., A. Gonzalez-Mendoza, *et al.* (1996). "Long-term survival of free fat grafts in muscle: an experimental study in rats". *Aesthetic Plast Surg* 20 (5): 403-8.
- Horwitz, E. M., D. J. Prockop, *et al.* (1999). "Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta". *Nat Med* 5 (3): 309-13.
- Horwitz, E. M., D. J. Prockop, *et al.* (2001). "Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta". *Blood* 97 (5): 1227-31.
- Huang, J. I., S. R. Beanes, *et al.* (2002). "Rat extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells". *Plast Reconstr Surg* 109 (3): 1033-41; análisis 1042-3.
- Hutley, L. J., A. C. Herington, *et al.* (2001). "Human adipose tissue endothelial cells promote preadipocyte proliferation". *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281 (5): E1037-44.
- Kern, P. A., A. Knedler, *et al.* (1983). "Isolation and culture of microvascular endothelium from human adipose tissue". *J Clin Invest* 71 (6): 1822-9.
- Lee, J. H., Z. Ilic, *et al.* (1996). "Cell kinetics of repair after allyl alcohol-induced liver necrosis in mice". *Int J Exp Pathol* 77 (2): 63-72.
- Lee, P. E., R. C. Kung, *et al.* (2001). "Periurethral autologous fat injection as treatment for female stress urinary incontinence: a randomized double-blind controlled trial". *J Urol* 165 (1): 153-8.
- Mizuno, H., P. A. Zuk, *et al.* (2002). "Myogenic differentiation by human processed lipoaspirated cells". *Plast Reconstr Surg* 109 (1): 199-209; análisis 210-1.
- Murayama, T., O. M. Tepper, *et al.* (2002). "Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo". *Exp Hematol* 30 (8): 967-72.
- Murry, C. E., R. W. Wiseman, *et al.* (1996). "Skeletal myoblast transplantation for repair of myocardial necrosis". *J Clin Invest* 98 (11): 2512-23.
- Muschler, G. F., H. Nitto, *et al.* (2001). "Age- and gender-related changes in the cellularity of human bone marrow and the prevalence of osteoblastic progenitors". *J Orthop Res* 19 (1): 117-25.
- Nishimori, M., Y. Yamada, *et al.* (2002). "Health-related quality of life of unrelated bone marrow donors in Japan". *Blood* 99 (6): 1995-2001.

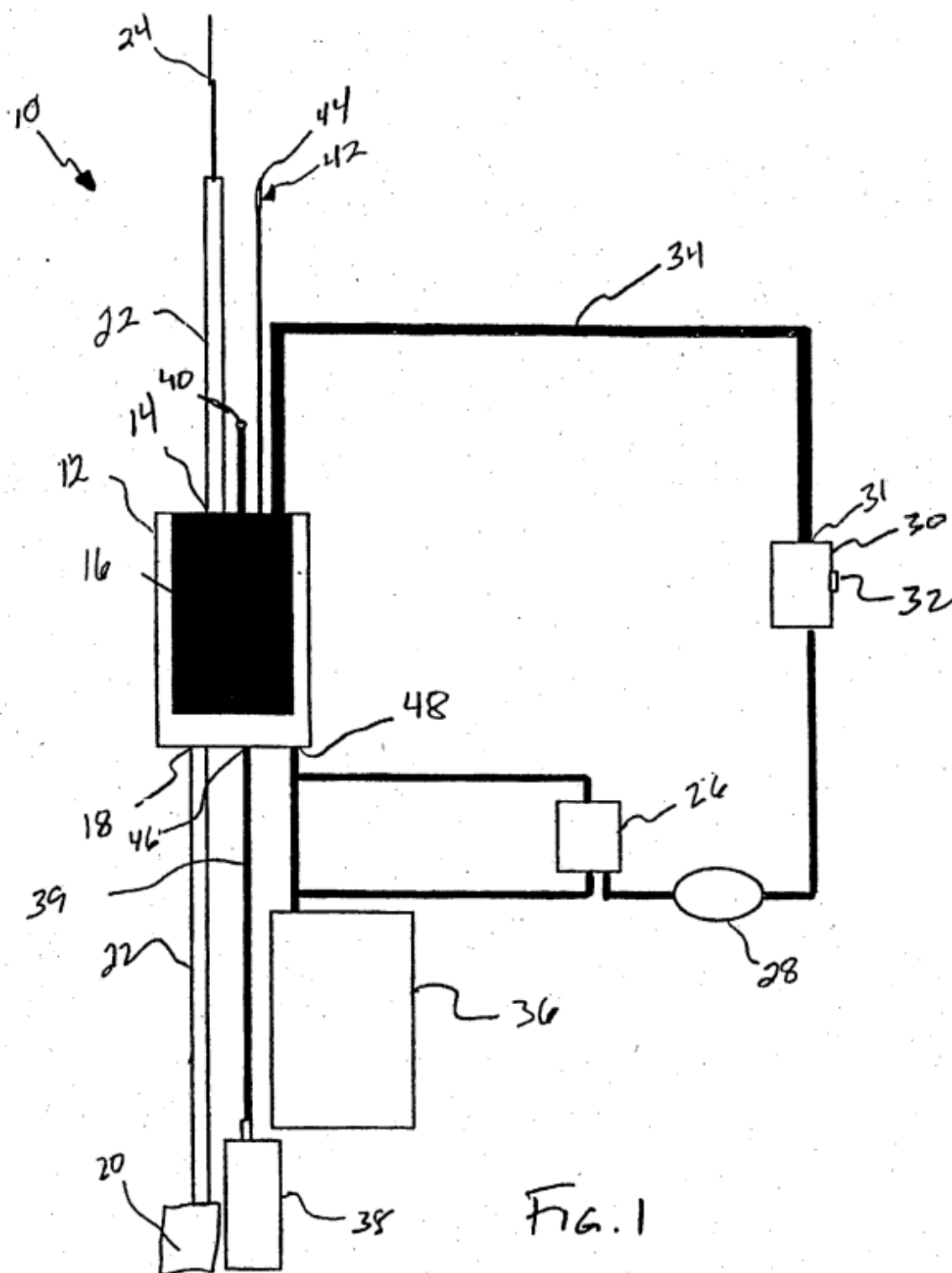
- Orlic, D., J. Kajstura, *et al.* (2001). "Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice". *Ann N Y Acad Sci* 938: 221-9; análisis 229-30.
- Orlic, D., J. Kajstura, *et al.* (2001). "Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium". *Nature* 410 (6829): 701-5.
- 5 Palma, P. C., C. L. Riccetto, *et al.* (1997). "Repeated lipoinjections for stress urinary incontinence". *J Endourol* 11 (1): 67-70.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, *et al.* (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells". *Science* 284 (5411): 143-7.
- 10 Prockop, D. J., S. A. Azizi, *et al.* (2000). "Potential use of marrow stromal cells as therapeutic vectors for diseases of the central nervous system". *Prog Brain Res* 128: 293-7.
- Rajnoch, C., J. C. Chachques, *et al.* (2001). "Cellular therapy reverses myocardial dysfunction". *J Thorac Cardiovasc Surg* 121 (5): 871-8, t&artType=abs&id=a112937&target=.
- Shi, Q., S. Rafii, *et al.* (1998). "Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells". *Blood* 92 (2): 362-7.
- 15 Strauer, B. E., M. Brehm, *et al.* (2002). "Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans". *Circulation* 106 (15): 1913-8.
- Takahashi, T., C. Kalka, *et al.* (1999). "Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization". *Nat Med* 5 (4): 434-8.
- Thomas, E. D. (1994). "Stem Cell Transplantation: Past, Present and Future". *Stem Cells* 12: 539-544.
- 20 Werlich, T., K. J. Stiller, *et al.* (1999). "Experimental studies on the stem cell concept of liver regeneration. II". *Exp Toxicol Pathol* 51 (1): 93-8.
- Yavorkovsky, L., E. Lai, *et al.* (1995). "Participation of small intraportal stem cells in the restitutive response of the liver to periportal necrosis induced by allyl alcohol". *Hepatology* 21 (6): 1702-12.
- 25 Yin, L., D. Lynch, *et al.* (1999). "Participation of different cell types in the restitutive response of the rat liver to periportal injury induced by allyl alcohol". *J Hepatol* 31 (3): 497-507.
- Zuk, P. A., M. Zhu, *et al.* (2001). "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell- based therapies". *Tissue Eng* 7 (2): 211-28.

REIVINDICACIONES

1. Una unidad de procesamiento de células madre derivadas de tejido adiposo autónomo (10), que comprende:

- 5 un recipiente para extracción de tejido que está configurado para recibir tejido adiposo sin procesar que se retira de un paciente, en la que dicho recipiente para extracción de tejido (12) se define mediante un sistema cerrado; un primer filtro (16) que está colocado dentro de dicho recipiente para extracción de tejido (12), en el que dicho primer filtro tiene un tamaño de poro de aproximadamente 20 μm a aproximadamente 5 mm y en el que dicho primer filtro está configurado para retener un primer componente de dicho tejido adiposo sin procesar y pasar un
10 segundo componente de dicho tejido adiposo sin procesar, de modo que dicho primer filtro separa dicho primer componente de dicho segundo componente, y en el que dicho primer componente comprende una población de células que comprende células madre derivadas de tejido adiposo y dicho segundo componente comprende adipocitos lípidos, sanguíneos, maduros, y solución salina; un recipiente para extracción de células (26), que está configurado para recibir dicho primer componente que
15 comprende una población de células que comprende células madre derivadas de tejido adiposo de dicho recipiente para extracción de tejido (12), en el que dicho recipiente para extracción de células está dentro de dicho sistema cerrado; un conducto configurado para permitir el paso de dicho primer componente que comprende una población de células que comprende células madre derivadas de tejido adiposo de dicho recipiente para extracción de tejido
20 (12) a dicho recipiente para extracción de células a la vez que mantiene un sistema cerrado; un concentrador celular colocado dentro de dicho recipiente para extracción de células (26), que está configurado para facilitar la concentración de dicho primer componente que comprende una población de células que comprende células madre derivadas de tejido adiposo para obtener una población concentrada de células que comprende células madre derivadas de tejido adiposo, en la que dicho concentrador celular comprende una
25 centrifugadora o un filtro de membrana que gira; y una salida (32) configurada para permitir la retirada aséptica de dicha población concentrada de células que comprende células madre derivadas de tejido adiposo.
2. La unidad de procesamiento celular de la reivindicación 1, en la que dicho recipiente para extracción de tejido (12) está configurado para recibir lipoaspirado.
3. La unidad de procesamiento celular de la reivindicación 2, en la que dicho recipiente para extracción de tejido (12) se acopla a una cánula (24).
- 35 4. La unidad de procesamiento celular de la reivindicación 2, en la que dicho recipiente para extracción de tejido se acopla a un dispositivo de succión (20).
5. La unidad de procesamiento celular de la reivindicación 1, en la que dicho recipiente para extracción de tejido (12) está configurado para recibir tejido adiposo que se retira mediante lipectomía por escisión.
- 40 6. La unidad de procesamiento celular de la reivindicación 1, en la que dicho primer filtro (16) es una malla de poliéster de calidad médica de aproximadamente 200 μm de espesor con un tamaño de poro de aproximadamente 265 μm y con una área abierta de aproximadamente un 47 %.
- 45 7. La unidad de procesamiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que dicho recipiente para extracción de tejido (12) está configurado para recibir un aditivo.
8. La unidad de procesamiento celular de la reivindicación 7 en la que dicho recipiente para extracción de tejido (12) está configurado para agitar dicho tejido adiposo y dicho aditivo.
- 50 9. La unidad de procesamiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que dicha unidad de procesamiento de células madre derivadas de tejido adiposo comprende una centrifugadora.
10. La unidad de procesamiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que dicho recipiente para extracción de células (26) comprende un filtro de membrana que gira.
- 55 11. La unidad de procesamiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende adicionalmente un segundo filtro configurado para pasar dicha población de células que comprende células madre de tejido adiposo y para retener material de tamaño superior al de dicha población de células.
- 60 12. La unidad de procesamiento celular de la reivindicación 11, en la que dicho segundo filtro está dentro de dicho recipiente para extracción de células (26).
13. La unidad de procesamiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en la que dicho recipiente para extracción de células (26) está configurado para recibir un aditivo.
- 65

14. La unidad de procesamiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que dicho recipiente para extracción de células (26) está configurado para lavar dicha población concentrada de células que comprende células madre derivadas de tejido adiposo.
- 5 15. La unidad de procesamiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la que el recipiente para extracción de células (26) está configurado para separar dicha población concentrada de células que comprende células madre derivadas de tejido adiposo basándose en una diferencia en la carga eléctrica.
- 10 16. La unidad de procesamiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, en la que el recipiente para extracción de células (26) comprende adicionalmente un medio para agitar dicha población concentrada de células que comprende células madre derivadas de tejido adiposo.
- 15 17. La unidad de procesamiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en la que el recipiente para extracción de células (26) comprende adicionalmente un medio para lavar dicha población concentrada de células que comprende células madre derivadas de tejido adiposo.
- 20 18. La unidad de procesamiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en la que dicho recipiente para extracción de células (26) comprende un medio para separar dicha población de células que comprende células madre derivadas de tejido adiposo mediante gradiente de densidad.
- 25 19. La unidad de procesamiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-18, en la que dicho recipiente para extracción de células (26) comprende un medio para separar dicha población de células que comprende células madre derivadas de tejido adiposo por adherencia a plástico.
- 30 20. La unidad de procesamiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-19, que comprende adicionalmente un recipiente de mezcla (30), en la que dicho recipiente de mezcla está unido a dicho recipiente para extracción de tejido (12) mediante un conducto configurado para mantener un sistema cerrado, en la que dicho recipiente de mezcla (30) comprende un puerto para la adición de un aditivo (31), en la que dicho recipiente de mezcla está dentro de dicho sistema cerrado, y en la que dicho recipiente para extracción de células está colocado entre dicho recipiente para extracción de tejido (12) y dicho recipiente de mezcla (30).
- 35 21. La unidad de procesamiento celular de la reivindicación 20, en la que dicho segundo filtro está colocado entre dicho recipiente para extracción de células (26) y dicho recipiente de mezcla (30).
- 40 22. La unidad de procesamiento celular de la reivindicación 21, en la que dicho segundo filtro tiene un tamaño de poro entre 20 μm y 200 μm .
23. La unidad de procesamiento celular de una cualquiera de las reivindicaciones 1-22, que comprende adicionalmente un controlador de la temperatura.



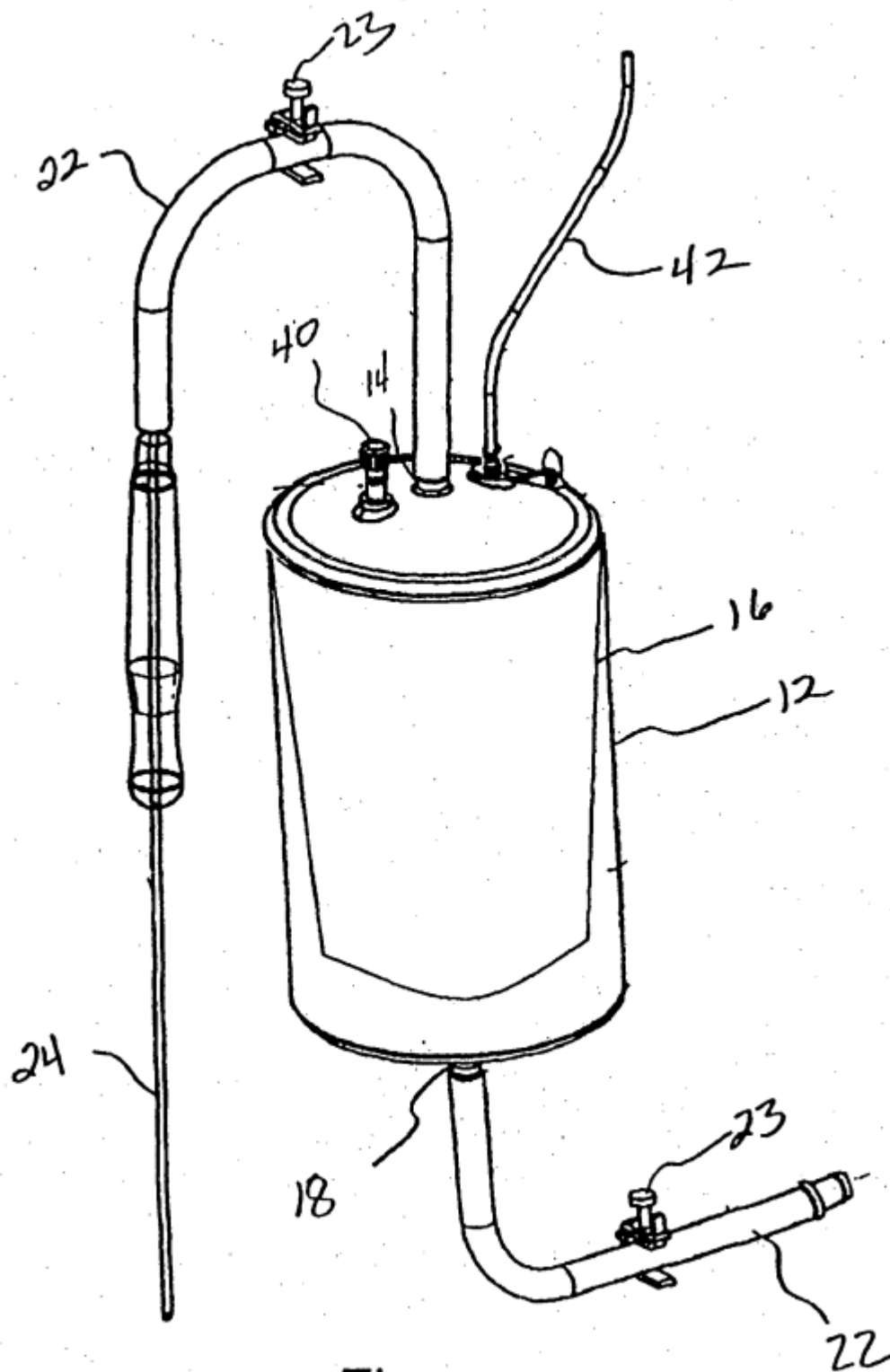


Fig. 2

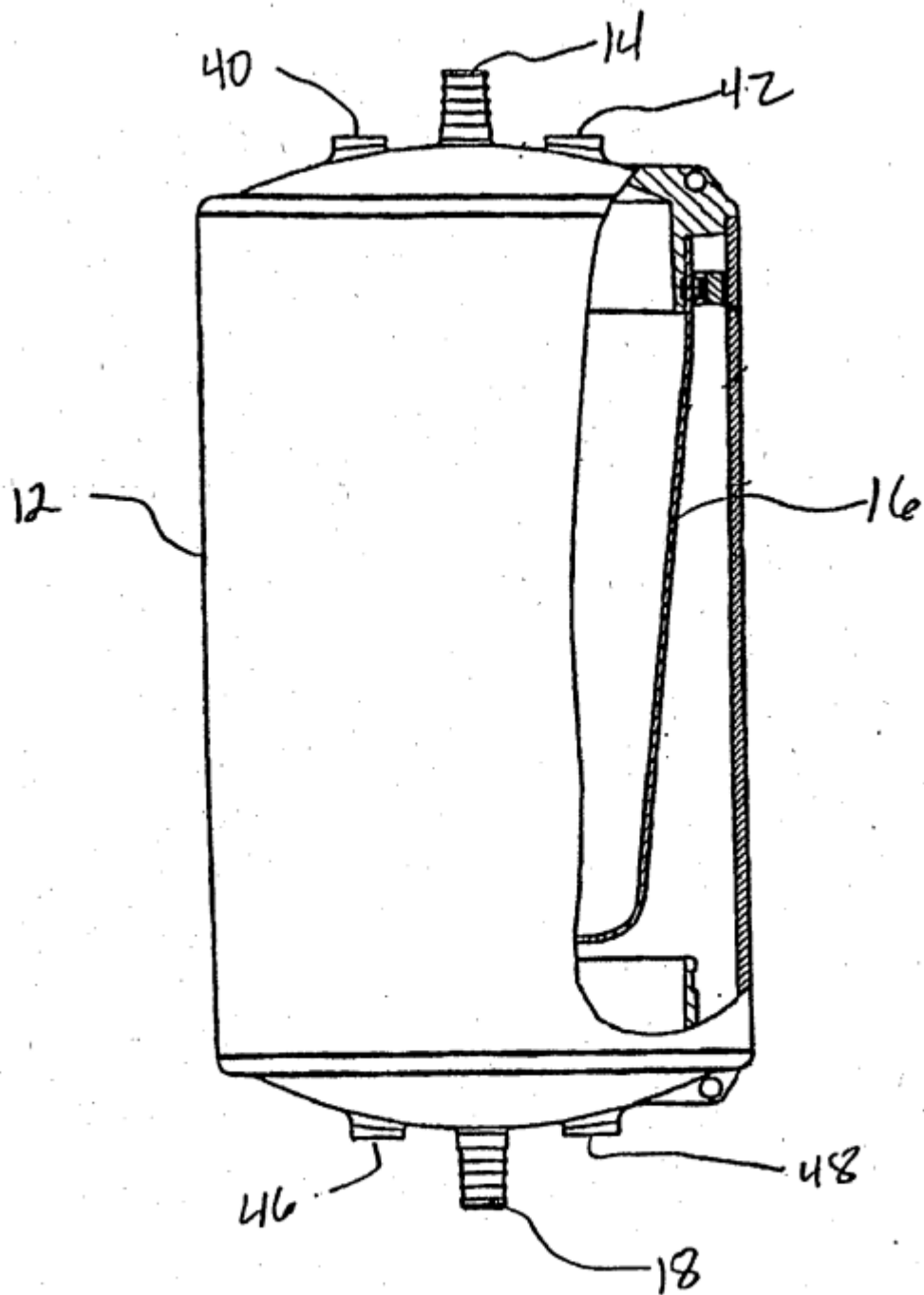


Fig. 3

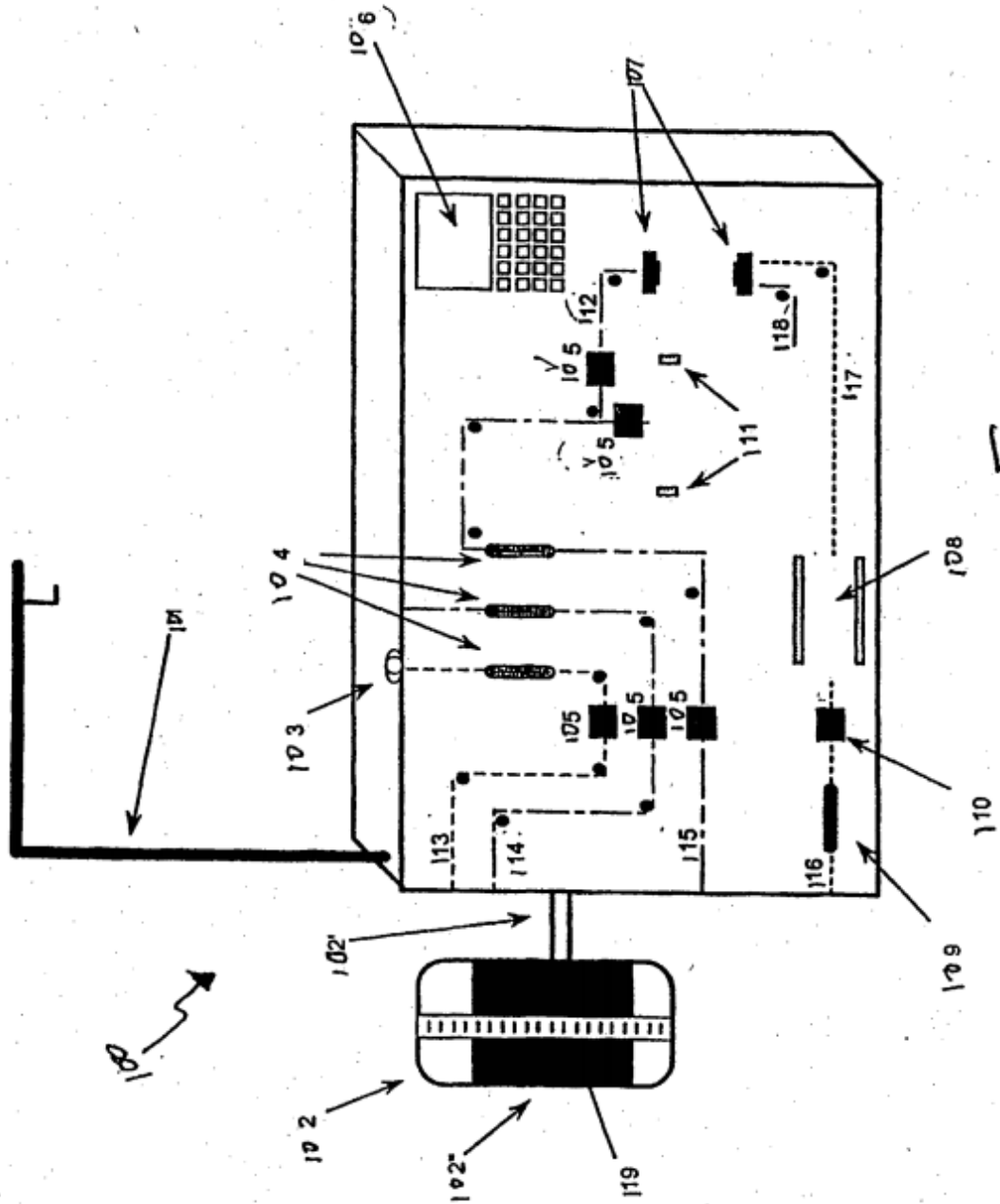


FIG. 4

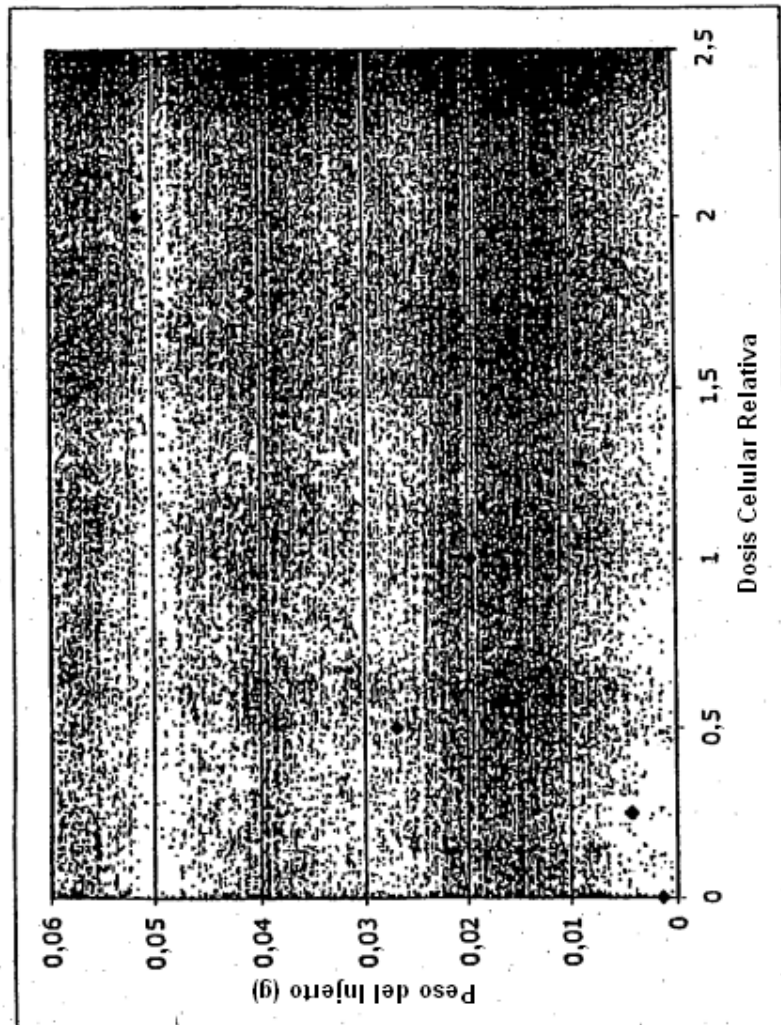


FIG. 5

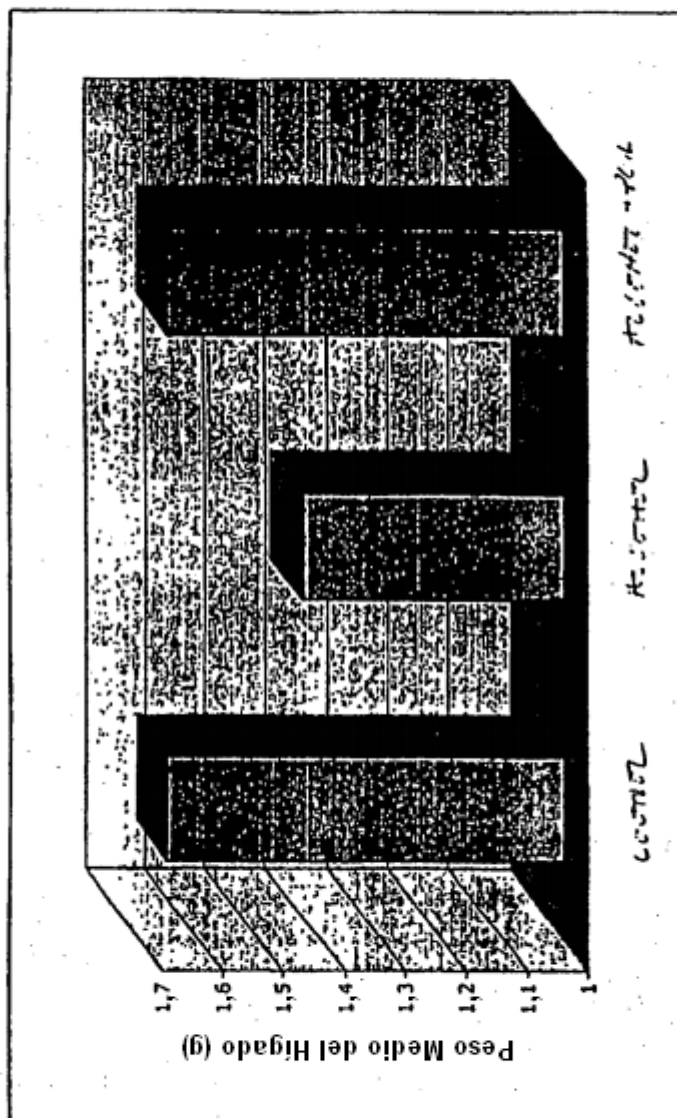


Fig. 6

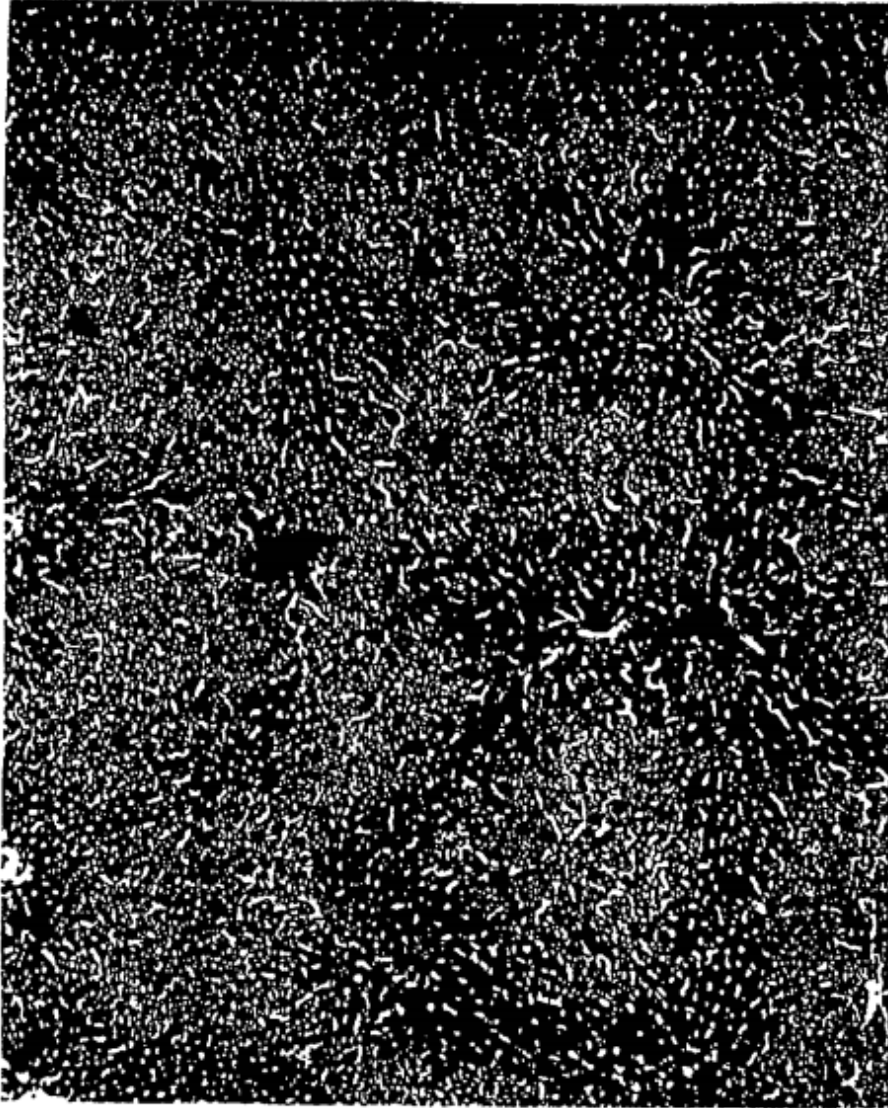


Fig. 7