

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 893**

51 Int. Cl.:

A61F 2/02

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.04.2010 PCT/US2010/033283**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.11.2010 WO10127310**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2010 E 10770460 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 2424463**

54 Título: **Sistemas, procedimientos y composiciones para optimizar injertos enriquecidos con tejido y células**

30 Prioridad:

01.05.2009 US 174860 P

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

20.07.2017

73 Titular/es:

**BIMINI TECHNOLOGIES LLC (100.0%)
420 Stevens Avenue, Suite 220
Solana Beach, CA 92075, US**

72 Inventor/es:

**PETERSON, ALVIN y
FORNACE, LUCAS**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 625 893 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

Sistemas, procedimientos y composiciones para optimizar injertos enriquecidos con tejido y células

5 La presente solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud provisional U.S.A. Nº 61/174.800, presentada el 1 de Mayo de 2009 por Peterson y otros, y titulada "SISTEMAS, PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES PARA OPTIMIZAR INJERTOS DE TEJIDO Y CÉLULAS".

10 Sector técnico de la invención

Las realizaciones dadas a conocer en esta memoria se refieren, en general, a composiciones que comprenden injertos, implantes o preparaciones trasplantables que comprenden tejido adiposo con y sin una población de células regenerativas derivadas de células adiposas (por ejemplo, una población concentrada de células regenerativas derivadas de las adiposas que comprende células madre) y procedimientos y sistemas para la preparación, optimización y aplicación de las mismas.

15 Antecedentes de la invención

La transferencia de tejido adiposo a diversas zonas del cuerpo es un procedimiento cosmético, terapéutico y estructural relativamente corriente que implica la recogida de tejido adiposo de una ubicación y la reimplantación del tejido recogido y, a menudo procesado, en otra ubicación (ver Coleman 1995; y Coleman 2001). Mientras que es utilizado ampliamente para la reparación de pequeños defectos cosméticos tales como pliegues faciales, arrugas, marcas de pústulas y cavidades; la transferencia de tejido adiposo ha sido utilizada recientemente para el aumento y la reconstrucción cosmética o terapéutica del pecho (Bircoll y Novack 1987; y Dixon 1988), y el aumento de los glúteos (Cardenas-Camarena, Lacouture y otros 1999; de Pedroza 2000; y Peren, Gomez y otros 2000).

En el pasado, los injertos de tejido adiposo y los procedimientos de transferencia de tejido adiposo han estado plagados de dificultades y de efectos colaterales incluyendo necrosis, absorción del implante por el cuerpo, infecciones (Castello, Barros y otros 1999; Valdatta, Thione y otros 2001), calcificaciones y cicatrices (Huch, Kunzi y otros, 1998), inconsistencia del injerto, (Eremia y Newman 2000), escasa durabilidad, y otros problemas que surgen de la falta de neovascularización y de la necrosis del tejido trasplantado. Uno de los mayores problemas de la transferencia de tejido adiposo es la absorción del implante por el cuerpo y la conservación del volumen de los injertos de tejido adiposo después de la transferencia. Cuando el tejido adiposo es recogido o lavado, el espacio entre los fragmentos individuales del tejido adiposo recogido se llena de líquido (por ejemplo, agua, sangre, soluciones tumescentes, aceite). Cuando este tejido y la mezcla de fluidos son implantados en un receptor, la porción líquida es absorbida rápidamente por el cuerpo con el resultado de pérdida de volumen. El proceso mediante el cual una cantidad de fluido es extraída del tejido y de la mezcla de fluidos se denomina frecuentemente como "secado del tejido adiposo" o "deshidratación del tejido adiposo". El contenido de leucocitos y de glóbulos rojos de la sangre y similares en el interior de un injerto de tejido adiposo puede afectar asimismo significativamente al volumen del injerto conservado después del trasplante del injerto, debido a la inducción o a la exacerbación de una respuesta inflamatoria. Otro aspecto de la retención del tejido se refiere a la cantidad de lípido en el interior del injerto de tejido adiposo. Se comprende que la presencia de lípido libre (significando lípidos liberados de los adipocitos muertos o dañados; denominados asimismo aceite) en los injertos de tejido adiposo pueden tener como resultado la inducción o la exacerbación de una respuesta inflamatoria con una actividad fagocítica sustancial y la consiguiente pérdida de volumen del injerto.

Es asimismo conocido que la mezcla de tejido adiposo sin procesar con una población concentrada de células regenerativas derivadas de las adiposas soluciona muchos de los problemas asociados con los injertos de tejido adiposo y con la transferencia de tejido adiposo, tal como se ha descrito anteriormente. Concretamente, suplementando un tejido adiposo no procesado con poblaciones concentradas de células derivadas de las adiposas que comprende células madre derivadas de las adiposas incrementa el peso, la vascularización y la retención de injertos grasos. (Ver la patente U.S.A. Nº 7.390.484 y la solicitud pendiente conjuntamente con la publicación de la patente U.S.A. Nº 2005/0025755). Los fragmentos de tejido adiposo suplementados o mezclados con una población concentrada de células que incluye células madre derivadas de las adiposas presentan una neoangiogénesis y una perfusión mejoradas en injertos, si se compara con tejidos sin suplementar solos, en modelos animales. Además, los injertos de tejido adiposo suplementados con células regenerativas derivadas de las adiposas que comprenden células madre derivadas de las adiposas, muestran un incremento de la retención y del peso del injerto a lo largo del tiempo si se compara con injertos sin suplementar. (Ver la publicación de la solicitud de patente U.S.A. Nº 2005/0025755). Además el procesado de tejido adiposo en un recorrido cerrado del fluido estéril reduce en gran manera la posibilidad de infección. La mejora en la transferencia autóloga de tejido adiposo descrita anteriormente que se observa en los modelos animales ha sido también reproducida en estudios clínicos humanos. Sin embargo, el aislamiento y la depuración de poblaciones concentradas de células regenerativas derivadas de las adiposas que comprende células madre derivadas de las adiposas (ADSC), implica habitualmente una serie de etapas de lavado, digestión, filtrado y centrifugado que puede reducir el rendimiento en células viables, requiere equipos mecánicos y personal clínico especializado y/o puede poner en riesgo la calidad, el aspecto, la longevidad, la hidratación o la eficacia del injerto. Además, el documento EP0040427 se refiere a una bolsa de recogida que tiene una primera

cámara y una segunda cámara que están definidas mediante un filtro que tiene poros, una abertura de entrada y de salida. El documento U.S.A. 6.316.247 se refiere a un sistema y un procedimiento para preparar tejido para un injerto adiposo. El documento EP0919249 se refiere al conjunto de un filtro para la sangre que comprende el cuerpo de una bolsa que tiene una entrada del flujo de sangre y una salida del flujo de sangre y está cargada con un material filtrante y una vasija de alojamiento para alojar dicho cuerpo de la bolsa, y un procedimiento de recuperación de los componentes sanguíneos mediante la utilización del conjunto filtrante.

La necesidad de planteamientos adicionales para la preparación y la optimización de injertos de tejido y de implantes y para aislar y/o concentrar células regenerativas derivadas de las adiposas, se manifiesta.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

Las realizaciones descritas en esta memoria se refieren a dispositivos para procesar injertos de tejido adiposo, así como a planteamientos para la preparación de injertos de tejido adiposo y a injertos de tejido adiposo suplementados con células regenerativas derivadas de células adiposas. De este modo, la invención se refiere a un dispositivo -300- para preparar tejido para un injerto de tejido adiposo que comprende:

una bolsa flexible, plegable -200-, que tiene una primera cámara -280- y una segunda cámara -290- que están definidas mediante un filtro -210- que tiene poros;

un separador situado en el interior de la segunda cámara -290-, en el que dicho separador -330- comprende una pantalla de separación -330- que tiene poros que son mayores que los poros del filtro; y en el que dicho separador define una tercera cámara en el interior de la segunda cámara -290-, y en el que los poros de dicho separador tienen aproximadamente desde 300 hasta aproximadamente 30.000 micras, y en el que el separador comprende uno o varios nervios, tirantes y otras características que crean un espacio entre la envoltura exterior -340- y el filtro;

una abertura de entrada -220- conectada a la bolsa flexible y plegable -200-, en la que dicha abertura de entrada está configurada para permitir la introducción aséptica de tejido adiposo en la primera cámara -280-; y

una abertura de salida -240- conectada a la bolsa flexible y plegable, en la que la abertura de salida -240- está configurada para extraer asépticamente líquido y células de la segunda cámara -290-.

Además, la invención se refiere también a un procedimiento para realizar un injerto de tejido adiposo, que comprende:

(a) introducir una primera porción de tejido adiposo sin procesar en la primera cámara -280- de un primer dispositivo según la invención;

(b) aclarar la primera porción de tejido adiposo sin procesar mediante la adición de una solución fisiológica de lavado a la primera cámara -280-; y

(c) extraer el fluido de la segunda cámara -290- del primer dispositivo, en la que el fluido es seleccionado de entre el grupo consistente en agua, solución fisiológica de lavado, sangre y lípido libre, o cualquier combinación de los mismos, secando de este modo el tejido adiposo.

Diversas realizaciones facilitadas en esta memoria se refieren a dispositivos para preparar tejido para un injerto de tejido adiposo. En algunas realizaciones, el dispositivo puede incluir una bolsa flexible y plegable que tiene una primera cámara y una segunda cámara, las cuales están definidas por medio de un filtro que tiene poros. El dispositivo puede incluir asimismo un separador situado en el interior de la segunda cámara, y una o varias aberturas de entrada y una abertura de salida conectada a la bolsa flexible, plegable. La abertura de entrada puede estar configurada para permitir la introducción aséptica de tejido adiposo en la primera cámara; y la abertura de salida puede estar configurada para extraer asépticamente líquido y células de la segunda cámara.

En algunas realizaciones, el separador puede ser una estructura porosa que flota libremente en el interior de la segunda cámara. En algunas realizaciones, el separador puede ser una estructura porosa que define una tercera cámara en el interior de la segunda cámara. En algunas realizaciones, el separador puede incluir un material que absorbe lípido, tal como una pantalla de malla de poliéster o similar. En algunas realizaciones, el separador puede ser una estructura porosa que tiene poros que son más grandes que los poros del filtro del sistema. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los poros del separador tienen un tamaño de poro que puede ser mayor o igual a unas 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 veces el tamaño del poro de los poros del filtro. En algunas realizaciones, el tamaño del poro del separador puede estar comprendido entre unas 300 y 2.000 μm . En algunas realizaciones, el tamaño del poro del filtro puede ser mayor o igual a unas 30 μm , por ejemplo, entre aproximadamente 30 μm y aproximadamente 200 μm . En algunas realizaciones, el tamaño del poro del filtro es de 35 μm .

En algunas realizaciones, la abertura de entrada puede estar configurada para ser fijada a una cánula, al tiempo que mantiene estéril el recorrido del fluido o del tejido.

5 En algunas realizaciones, el dispositivo puede incluir un segundo dispositivo, en el que el segundo dispositivo es un dispositivo de aislamiento de células regenerativas derivadas de las adiposas. En algunas realizaciones, el dispositivo de aislamiento de las células regenerativas derivadas de las adiposas puede estar fijado al primer dispositivo para preparar tejido para un injerto de tejido adiposo al tiempo que mantiene un recorrido cerrado. En algunas realizaciones, el dispositivo de aislamiento de las células regenerativas derivadas de las adiposas puede ser un dispositivo tal como el descrito anteriormente en esta memoria. En algunas realizaciones, el segundo dispositivo
10 puede estar conectado al dispositivo para la preparación de tejido para un injerto de tejido adiposo mediante un conducto que puede estar configurado para transferir células regenerativas aisladas derivadas de las adiposas desde el segundo dispositivo a la primera cámara del dispositivo para la preparación de tejido para un injerto de tejido adiposo. En algunas realizaciones, el conducto puede incluir una conexión en Y.

15 Algunas realizaciones facilitadas en esta memoria se refieren a un procedimiento para producir un injerto de tejido adiposo. El procedimiento puede incluir las etapas de obtener una primera porción de tejido adiposo sin procesar; aclarar la primera porción de tejido adiposo sin procesar con una solución fisiológica; y deshidratar el tejido adiposo aclarado hasta una cantidad de hidratación que sea menor que la cantidad de la hidratación presente en la primera porción de tejido adiposo sin procesar antes de la deshidratación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el tejido
20 adiposo aclarado es deshidratado hasta un contenido en líquido que es menor que aproximadamente 1/2, 1/3, o 1/4 de veces (preferentemente aproximadamente 1/3 de veces) que el de dicha primera porción de tejido adiposo sin procesar antes de la deshidratación.

25 En algunas realizaciones, la solución fisiológica puede ser solución de lactato de Ringer, solución de acetato de Ringer, solución salina, solución salina tamponadora de fosfato, solución de PLASMALYTE™, soluciones de cristaloides y de fluidos IV, soluciones coloidales y fluidos IV, cinco por ciento de dextrosa en agua (D5W), solución de Hartmann o similares.

30 En algunas realizaciones, el procedimiento puede incluir adicionalmente las etapas de aislar una población de células regenerativas derivadas de las adiposas de una segunda porción de tejido adiposo y poner en contacto el tejido adiposo deshidratado con la población aislada de células regenerativas derivadas de las adiposas en condiciones que permiten que la población aislada de células regenerativas derivadas de las adiposas atraviese por permeación el tejido adiposo deshidratado. En algunas realizaciones, la población aislada de células regenerativas derivadas de las adiposas no es sometida a centrifugado antes de ser puesta en contacto con el tejido adiposo
35 deshidratado. En algunas realizaciones, la población aislada de células regenerativas derivadas de las adiposas puede ser preparada en un dispositivo dado a conocer anteriormente en esta memoria, mediante el contacto del tejido adiposo presente en la primera cámara del dispositivo, por ejemplo, con unos medios de liberación de células de la matriz del tejido conectivo y una solución enzimática que comprende colagenasa en unas condiciones que liberan dichas células. En algunas realizaciones, las condiciones que liberan dichas células incluyen calor, enfriamiento, digestión mecánica, ultrasonidos o liberación asistida por láser, u otros medios conocidos en la técnica y descritos en la patente U.S.A. Nº 7.390.484. En algunas realizaciones, la etapa de contacto puede ser llevada a cabo en un segundo dispositivo (por ejemplo, un dispositivo que tenga la misma estructura que el primer dispositivo) fijado al primer dispositivo.

45 Algunas realizaciones, se refieren a un procedimiento para producir un injerto de tejido adiposo que incluye las etapas de obtener una primera porción de tejido adiposo sin procesar introduciendo la primera porción de tejido adiposo sin procesar en la primera cámara de un dispositivo descrito anteriormente; añadir una solución fisiológica de lavado a la primera cámara con el tejido adiposo sin procesar para aclarar el tejido adiposo sin procesar; y extraer el fluido (por ejemplo, agua, solución fisiológica de lavado, sangre, lípido libre, o similar, o cualquier combinación de los mismos) de la segunda cámara del dispositivo, secando de este modo el tejido adiposo y reduciendo el contenido en lípido libre.
50

55 En algunas realizaciones, el procedimiento puede incluir adicionalmente las etapas de aislar una población de células regenerativas derivadas de las adiposas de una segunda porción de tejido adiposo y poner en contacto el tejido adiposo deshidratado con la población aislada de células regenerativas derivadas de las adiposas en unas condiciones que permiten que la población aislada de células regenerativas derivadas de las adiposas atraviese por permeación el tejido adiposo deshidratado. En algunas realizaciones, la población aislada de células regenerativas derivadas de las adiposas no es sometida a centrifugado antes de ser puesta en contacto con el tejido adiposo deshidratado. En algunas realizaciones, la población aislada de células regenerativas derivadas de las adiposas es preparada en un dispositivo dado a conocer en esta memoria mediante el contacto del tejido adiposo presente en la primera cámara del dispositivo, por ejemplo, con unos medios de liberación de células de la matriz del tejido conectivo y una solución enzimática que comprende colagenasa en unas condiciones que liberan las células. En algunas realizaciones, dichas condiciones que liberan las células incluyen calor, enfriamiento, digestión mecánica, ultrasonidos o liberación asistida por láser, u otros medios conocidos en la técnica y descritos en la patente U.S.A. Nº 7.390.484. En algunas realizaciones, la etapa de contacto puede ser llevada a cabo en un segundo dispositivo (por ejemplo, un dispositivo que tiene la misma estructura que el primer dispositivo) fijado al primer dispositivo.
60
65

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- 5 La figura 1 muestra un diagrama que ilustra, a modo de ejemplo, los procedimientos de suplementado del injerto dados a conocer en esta memoria.
- La figura 2 muestra un diagrama de bloques de un recipiente flexible de recogida.
- 10 La figura 3 muestra un sistema, a modo de ejemplo, utilizado para optimizar un injerto de tejido adiposo. El injerto puede ser suplementado con células regenerativas derivadas de las adiposas.
- La figura 4 muestra aberturas y adaptadores en el sistema -300-.
- 15 La figura 5 muestra la membrana exterior -310- del sistema -300-.
- La figura 6 muestra el filtro -320- del sistema -300-.
- La figura 7 muestra la pantalla de separación -330- del sistema -300-.
- 20 La figura 8 muestra, a modo de ejemplo, cierres estancos -311- del sistema -300-.
- La figura 9 es una vista, en perspectiva, de un sistema -300- con aberturas y adaptadores -600-.
- 25 La figura 10 es una vista, en corte, de un conjunto -600- de la abertura del tejido utilizada con las aberturas del sistema -300-.
- La figura 11 es una vista, en corte, de un conjunto -600- de la abertura del tejido utilizado con las aberturas del sistema -300-.
- 30 La figura 12 es una vista, en corte, de una tapa -610- utilizada con el conjunto -600- de la abertura del tejido.
- La figura 13 es una ilustración, a modo de ejemplo, de un sistema -800- utilizado para optimizar un injerto de tejido adiposo.
- 35 Las figuras 14A y 14B son vistas, en perspectiva, a modo de ejemplo de un dispositivo de enriquecimiento del tejido. La figura 14A muestra un receptáculo con una primera cámara para el procesado de tejido adiposo, y una segunda cámara, para suplementar el tejido adiposo con lipo-digestato para realizar injertos. La figura 14B representa una plataforma o un cuerpo envolvente para el receptáculo mostrado en la figura 14A.
- 40 La figura 15 es un gráfico de barras que muestra el porcentaje del contenido en agua (v/v) de tejido adiposo sin procesar (control), tejido adiposo preparado mediante un procedimiento de preparación por gravedad (Gravedad), tejido adiposo preparado mediante un procedimiento de centrifugado (Centrifugado) y tejido adiposo secado preparado según los procedimientos y sistemas descritos en esta memoria (PureGraft).
- 45 La figura 16 es un gráfico de barras que muestra el porcentaje del contenido en lípido (v/v) de tejido adiposo sin procesar (control), tejido adiposo preparado mediante un procedimiento de preparación por gravedad (Gravedad), tejido adiposo preparado mediante un procedimiento de centrifugado (Centrifugado) y tejido adiposo secado preparado según los procedimientos y sistemas descritos en esta memoria (PureGraft).
- 50 La figura 17 es un es un gráfico de barras que muestra el contenido de glóbulos rojos (RBC) por gramo de tejido normalizado con respecto al contenido de glóbulos rojos presentes por gramo de tejido en el interior de injertos preparados según los procedimientos y sistemas descritos en esta memoria (PureGraft). Se muestran los datos del tejido adiposo sin procesar (control), tejido adiposo preparado mediante un procedimiento de preparación por gravedad (Gravedad), tejido adiposo preparado mediante un procedimiento de centrifugado (Centrifugado), y tejido adiposo preparado según los procedimientos y sistemas descritos en esta memoria (PureGraft).
- 55

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA REALIZACIÓN PREFERENTE

- 60 Las realizaciones dadas a conocer en esta memoria se refieren a procedimientos y sistemas para la producción de injertos de tejido adiposo (por ejemplo, "injertos de grasa") o implantes de tejido adiposo, tanto solos como suplementados, mejorados o reforzados con células regenerativas derivadas de las adiposas (por ejemplo, una población de células que comprende células madre derivadas de células adiposas, células endoteliales y/o células progenitoras). Las realizaciones dadas a conocer en esta memoria están basadas, en parte, en el descubrimiento de un dispositivo o sistema que puede ser utilizado para la preparación rápida y la optimización de injertos de tejido
- 65 adiposo, de implantes, y para la preparación de injertos e implantes enriquecidos con una población de células regenerativas derivadas de las adiposas (por ejemplo, una población de células que comprende células madre

derivadas de las adiposas) mediante, por ejemplo, circulación por gravedad y, si se desea, a falta de centrifugado, alta presión o filtrado en vacío. Tal como se describe en esta memoria más adelante, los injertos de tejido adiposo preparados utilizando los dispositivos dados a conocer en esta memoria tienen reducidos niveles de fluido, de células sanguíneas, y de lípido libre o contenido en aceite, comparados con los injertos preparados utilizando técnicas convencionales. De manera destacable, los injertos de tejido adiposo preparados utilizando los dispositivos dados a conocer en esta memoria no es preciso que estén sometidos a potentes fuerzas mecánicas que pueden conducir a una disminución de la viabilidad de la célula y a una reducción de la retención del injerto de tejido adiposo. Utilizando los dispositivos dados a conocer en esta memoria, se puede obtener un implante de tejido adiposo más predecible y más estable.

Las realizaciones dadas a conocer en esta memoria están basadas asimismo, en parte, en el descubrimiento por parte de los solicitantes de que fragmentos intactos de tejido adiposo o de “matriz de tejido adiposo sin procesar” pueden ser utilizados para filtrar, unir y concentrar de este modo de manera efectiva, *in situ*, las células regenerativas derivadas de las adiposas que están dispuestas en una solución *vis a vis* o en una suspensión de tejido adiposo digerido, o parcialmente o totalmente desagregado. En algunas realizaciones, se puede utilizar “tejido adiposo secado” o “tejido adiposo deshidratado” para filtrar, unir y concentrar de este modo de manera efectiva, *in situ*, células regenerativas derivadas de las adiposas dispuestas en forma de lipo-digestato. En algunas realizaciones la “matriz de tejido adiposo sin procesar” puede ser secada o deshidratada después de añadir el lipo-digestato. En consecuencia, se ha comprendido que en algunas realizaciones, ya no se precisa una concentración del componente celular de tejido adiposo desagregado antes del incremento, suplemento o refuerzo de un injerto de tejido adiposo o de un injerto graso.

A continuación se hará referencia en detalle a las realizaciones actualmente preferentes de la invención, de las cuales se muestran ejemplos en los dibujos adjuntos. Siempre que es posible se utilizan los mismos o similares números de referencia en los dibujos y en la descripción para hacer referencia a las mismas partes o a partes similares. Se debe observar que los dibujos están en una forma simplificada y no están a una escala exacta. Con referencia a la invención presente, únicamente a efectos de comodidad y de claridad, los términos que indican dirección tales como, superior, inferior, izquierda, derecha, arriba, abajo, encima de, sobre, abajo, debajo de, posterior y frontal, son utilizados con respecto a los dibujos adjuntos.

El objetivo de la siguiente descripción detallada, aunque comenta realizaciones a modo de ejemplo, debe ser interpretado como que abarca todas las modificaciones, alternativas y equivalentes de las realizaciones comprendidas dentro del alcance, tal como está definido por las reivindicaciones adjuntas. Ciertos aspectos de la presente invención pueden ser puestos en práctica conjuntamente con diversas técnicas de separación de células o de tejidos que son utilizadas convencionalmente en la técnica, y solamente una parte de las etapas del proceso habitualmente practicadas están incluidas en esta memoria cuando son necesarias para proporcionar una comprensión de la presente invención.

Tejido adiposo secado

Algunas realizaciones dadas a conocer en esta memoria se refieren a procedimientos para producir injertos secados de tejido adiposo que pueden ser utilizados directamente en procedimientos de trasplante autólogo, por ejemplo, trasplantes autólogos, o que pueden ser reforzados con células (por ejemplo, células regenerativas derivadas de las adiposas, células madre derivadas de las adiposas, o similares), aditivos o similares antes del trasplante.

El término “tejido adiposo” en algunos contextos se puede referir a grasa que incluye el tejido conectivo que almacena grasa. El tejido adiposo contiene múltiples tipos de células regenerativas incluyendo células madre derivadas de las adiposas (las “ADSC”), células endoteliales, progenitoras y precursoras, pericitos, macrófagos, fibroblastos, células linfáticas que incluyen células linfáticas endoteliales, etc. unidas por medio de la matriz del tejido conectivo.

Una “unidad de tejido adiposo” se refiere a una cantidad diferenciada o medible de tejido adiposo que puede ser medida mediante la determinación del peso y/o del volumen de la unidad. Una unidad de tejido adiposo se puede referir a la cantidad total de tejido adiposo extraída de un paciente, o a una cantidad que es menor que la cantidad total de tejido adiposo extraída del paciente. De este modo, una unidad de tejido adiposo puede ser combinada con otra unidad de tejido adiposo para formar una unidad de tejido adiposo que tenga un peso o un volumen que sea la suma de las unidades individuales.

El tejido adiposo utilizado en las realizaciones descritas en esta memoria puede ser obtenido mediante cualquier procedimiento conocido de un experto en la materia. Por ejemplo, el tejido adiposo puede ser extraído de un paciente mediante lipoplastia asistida por aspiración, lipoplastia asistida por ultrasonidos, lipectomía escisional, lipoplastia mediante chorro de agua, o similar. Además los procedimientos pueden incluir una combinación de dichos procedimientos, tales como una combinación de lipectomía escisional y lipoplastia asistida por aspiración. Preferentemente el tejido adiposo es recogido de una manera tal que preserva la viabilidad del tejido y de sus componentes celulares y minimiza la posibilidad de contaminación del material recogido con organismos potencialmente infecciosos tales como bacterias y/o virus.

En el caso de los procedimientos de lipoplastia asistida por aspiración, el tejido adiposo es recogido mediante la inserción de una cánula en el depósito de tejido adiposo, o cerca del mismo, presente en el sujeto, seguido de la aspiración de la adiposidad a un dispositivo de aspiración. La utilización de una jeringa u otro dispositivo similar puede servir para recoger cantidades relativamente moderadas de tejido adiposo (por ejemplo, desde 0,1 ml hasta varios centenares de mililitros de tejido adiposo). Los procedimientos que utilizan estos dispositivos relativamente pequeños tienen la ventaja de que los procedimientos pueden ser llevados a cabo solamente con anestesia local, a diferencia de la anestesia general. Los volúmenes mayores de tejido adiposo por encima de estos márgenes (por ejemplo, mayores de varios centenares de mililitros) pueden precisar anestesia general, a discreción del donante y de la persona que lleva a cabo el procedimiento de recogida. Cuando se desean extraer volúmenes mayores de tejido adiposo, se puede utilizar en el procedimiento cánulas relativamente grandes y dispositivos de aspiración automatizados.

Los procedimientos de lipectomía escisional incluyen procedimientos en los que el tejido que contiene tejido adiposo (por ejemplo, piel) es extraído mediante escisión, tal como una disección quirúrgica bajo visualización directa o indirecta del tejido que se está escindiendo.

La cantidad de tejido adiposo recogido para su utilización en los procedimientos dados a conocer en esta memoria depende de un número de variables que incluyen el índice de masa corporal del donante, la disponibilidad de sitios accesibles para la recogida del tejido adiposo, la medicación y condiciones preexistentes y concomitantes (tales como una terapia anticoagulante) y el objetivo para el que se va a recoger el tejido. El injerto de trasplantes de tejido adiposo ha demostrado que es dependiente de la dosis de células y tiene efecto umbral. De este modo, es probable que el principio general de que "más es mejor" sea aplicado dentro de unos límites determinados por otras variables y que cuando sea factible la recogida se debe recoger tanto tejido como sea posible.

En algunas realizaciones, por ejemplo en realizaciones en las que el tejido adiposo secado es utilizado para hacer un injerto de tejido adiposo reforzado o suplementado, la unidad de tejido adiposo es dividida en porciones. La primera porción del tejido adiposo no es digerida ni tampoco es procesada, ni aclarada o lavada para obtener tejido adiposo seco o deshidratado tal como se describe a continuación en esta memoria. La primera porción de tejido adiposo sin procesar, secado o deshidratado puede servir de base para el injerto que es suplementado con células regenerativas derivadas de las adiposas (por ejemplo, una población de células que comprende células madre derivadas de las adiposas y/o células endoteliales y/o células progenitoras) presentes en el lipo-digestato o en la población concentrada de células derivadas de las adiposas de la segunda porción. Una porción puede ser procesada tal como se describe más adelante para soltar o liberar las células regenerativas derivadas de las adiposas (por ejemplo, una población de células que comprende células madre derivadas de células adiposas, y/o células endoteliales y/o células progenitoras) desde la matriz de tejido conectivo para obtener un lipo-digestato o una población concentrada de células derivadas de las adiposas que comprende células regenerativas o células madre. Por ejemplo, se recogen dos unidades diferentes de tejido adiposo, por ejemplo, de las mismas o de diferentes zonas del sujeto o de diferentes sujetos. Una unidad puede ser procesada, tal como se describe más adelante, para obtener lipo-digestato o una población concentrada de células derivadas de las adiposas que comprenden células regenerativas o células madre, y la otra unidad puede servir como base para el injerto graso que es suplementado con células regenerativas derivadas de las adiposas (por ejemplo, lipo-digestato y/o una población de células que comprende células madre derivadas de las adiposas, y/o células endoteliales y/o células progenitoras). En una realización, una o ambas unidades de tejido adiposo pueden ser conservadas en frío de tal modo que el suministro del injerto al paciente pueda estar separado en el tiempo de la recogida del tejido. En una de dichas realizaciones, una o ambas unidades de tejido pueden ser conservadas en frío en el interior del dispositivo o del sistema de la presente invención en el que las cámaras del dispositivo están fabricadas de materiales que conservan la integridad estructural y mecánica durante los procesos de conservación en frío, almacenamiento en frío, descongelado y posterior utilización, tal como se describe en esta memoria. En otra de dichas realizaciones, el lipo-digestato o la población concentrada de células derivadas de las adiposas que comprende células regenerativas incluyendo células madre derivadas de las adiposas, puede ser conservado en frío antes de su utilización en el reforzamiento del injerto o del implante, tal como se describe en esta memoria.

El término "secado", tal como se utiliza en referencia a "tejido adiposo secado", se refiere a una unidad de tejido adiposo que tiene un menor contenido de líquido, por ejemplo, agua u otro líquido (por ejemplo, un fluido tumescente) presente en el "tejido adiposo secado" comparado con el tejido adiposo sin procesar del mismo sitio y del mismo sujeto (por ejemplo, una unidad equivalente (w/w) de tejido adiposo tomada del mismo sitio y del mismo sujeto que el tejido adiposo que fue secado).

El término "unidad equivalente" tal como se utiliza en esta memoria se puede referir a un volumen o un peso equivalente de tejido adiposo obtenido de un sujeto. Por ejemplo, una unidad equivalente puede significar un volumen (o un peso) equivalente de tejido adiposo obtenido de un sujeto. Por ejemplo, una unidad equivalente puede significar un volumen (o un peso) equivalente obtenido del mismo sitio (por ejemplo, glúteos, abdomen, muslo, espalda o similar) del mismo o de diferente sujeto.

"Tejido adiposo sin procesar" se refiere a tejido adiposo que no ha sido parcial o totalmente desagregado, es decir, sometiendo el tejido a una desagregación mecánica y/o enzimática. De este modo, el tejido sin procesar contiene fragmentos intactos de tejido que incluyen tejido conectivo unido a células regenerativas derivadas de las adiposas.

- Tal como se utiliza en esta memoria, "célula regenerativa derivada de células adiposas" se refiere a cualquier célula obtenida a partir de tejido adiposo, que produce o contribuye a una regeneración parcial o completa, a la reconstrucción o sustitución de la estructura o la función de un órgano, tejido, o unidad fisiológica, o sistema para proporcionar de este modo un beneficio terapéutico, estructural o cosmético. Los ejemplos de células regenerativas incluyen: células madre derivadas de las adiposas ("ADSC"), células endoteliales, células endoteliales precursoras, células endoteliales progenitoras, macrófagos, fibroblastos, pericitos, células musculares lisas, preadipocitos, adipocitos diferenciados o des-diferenciados, queratinocitos, células progenitoras y precursoras unipotentes y multipotentes (y su progenie) y linfocitos.
- En algunas realizaciones, el tejido adiposo secado tiene aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 12%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% (o cualquier porcentaje dentro de este margen) del contenido líquido (medido en volumen y/o en peso), de una unidad equivalente de tejido adiposo sin procesar. Por ejemplo, el tejido adiposo secado puede tener igual a o más de aproximadamente 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces o 10 veces (o cualquier número dentro de este margen) menos contenido de líquido que una unidad equivalente de tejido adiposo sin procesar. De manera similar, el término "deshidratado" tal como se utiliza en referencia a "tejido adiposo deshidratado" se refiere a un menor contenido en agua presente en el "tejido adiposo deshidratado" comparado con un tejido adiposo sin procesar o con una unidad equivalente de tejido adiposo sin procesar. Por ejemplo, el tejido adiposo secado puede tener aproximadamente más de o igual a 1,5 veces, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, o 10 veces (o cualquier número dentro de este margen) menos contenido de agua que una unidad equivalente de tejido adiposo sin procesar.
- En algunas realizaciones, el tejido adiposo "secado" descrito en esta memoria puede tener un contenido o un porcentaje menor de lípido y/o de glóbulos rojos o leucocitos comparado con una unidad equivalente de tejido adiposo sin procesar. En algunas realizaciones, el tejido adiposo secado puede tener menos de aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 12%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 90%, 95% o 99% (o cualquier porcentaje dentro de este margen), (o cualquier número dentro de este margen) de leucocitos en una unidad equivalente de tejido adiposo sin procesar y/o una unidad equivalente de tejido adiposo procesado utilizando un procedimiento de centrifugado, por ejemplo, en el que el tejido escindido es centrifugado en una centrífuga de ángulo fijo o en otra técnica convencional de preparación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el tejido adiposo secado puede contener menos de aproximadamente 75%, menos de 80%, menos de 85%, menos de 90%, menos de 95%, o menos, o cualquier porcentaje dentro de este margen, del número de leucocitos en una unidad equivalente de tejido adiposo.
- En algunas realizaciones, el tejido adiposo secado dado a conocer en esta memoria puede tener menos de aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 12%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 90% o 95% (o cualquier porcentaje dentro de este margen), (o cualquier número dentro de este margen) de glóbulos rojos en una unidad equivalente de tejido adiposo sin procesar, o de tejido adiposo preparado utilizando un procedimiento de centrifugado, por ejemplo, en el que el tejido escindido es centrifugado en una centrífuga de ángulo fijo o mediante otro planteamiento convencional de preparación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los injertos de tejido adiposo producidos en los sistemas dados a conocer en esta memoria contienen menos de aproximadamente el 75%, menos del 80%, menos del 85%, menos del 90%, menos del 95%, o menos, o cualquier porcentaje dentro de este margen, del número de glóbulos rojos en una unidad equivalente de tejido adiposo.
- En algunas realizaciones, los injertos de tejido adiposo secado dados a conocer en esta memoria tienen menos de aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 12%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 90% o 95% (o cualquier porcentaje dentro de este margen), (o cualquier número dentro de este margen) de lípido en una unidad equivalente de tejido adiposo sin procesar, o de tejido adiposo preparado mediante un protocolo convencional de centrifugado, por ejemplo, en el que el tejido adiposo escindido es centrifugado en una centrífuga de ángulo fijo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los implantes de tejido adiposo secado dados a conocer en esta memoria contienen menos de aproximadamente el 75%, menos del 80%, menos del 85%, menos del 90%, menos del 95%, o menos, o cualquier porcentaje dentro de este margen, del porcentaje del contenido de lípido libre presente en una unidad equivalente de tejido adiposo sin procesar.
- En algunas realizaciones, el tejido adiposo secado se obtiene disponiendo tejido adiposo sin procesar en un dispositivo que incluye un filtro y un separador, tal como se describe con más detalle más adelante. El filtro puede dividir el dispositivo en dos cámaras internas, definiendo de este modo una primera cámara y una segunda cámara o subsistema. El tejido adiposo se introduce en la primera cámara o subsistema del dispositivo, y preferentemente no entra en la segunda cámara del dispositivo. El filtro tiene una serie de poros que permiten la circulación libre de líquido, tal como agua, fluido tumescente, solución de lavado, (por ejemplo solución de lactato de Ringer, solución salina, PLASMALYTE™ y similares), lípido libre, aceite, células sanguíneas, células de la lisis del tejido adiposo y componentes sanguíneos en la segunda cámara, pero el tamaño del poro es tal que retiene el tejido adiposo no desagregado y los fragmentos de tejido en la primera cámara. La segunda cámara puede incluir un separador fabricado de un material que es absorbente de lípidos y/o de fluidos (por ejemplo, un diseño de malla que arrastra fluido desde la primera cámara), tal como se describe con más detalle más adelante. En realizaciones preferentes, el separador está fabricado de un material poroso, en el que los poros del separador son más grandes que los poros del filtro.

El tejido adiposo sin procesar en el interior de la primera cámara es aclarado o lavado con una solución fisiológica de lavado. En realizaciones preferentes, la solución fisiológica de lavado es introducida asépticamente en el dispositivo. En algunas realizaciones, la solución de lavado es introducida en la primera cámara. En algunas realizaciones, la solución de lavado es introducida en la segunda cámara y pasa a través del filtro al interior de la segunda cámara entrando de este modo en contacto con el tejido adiposo en la misma. En algunas realizaciones, la solución de lavado es introducida tanto en la primera cámara como en la segunda cámara.

En algunas realizaciones, el tejido adiposo y la solución de lavado son agitados (por ejemplo, mediante inversión, compresión o sacudida del dispositivo de manera suave), con el objeto de facilitar el aclarado y la separación del lípido libre, los leucocitos y los glóbulos rojos y el fluido tumesciente del tejido adiposo en la primera cámara. En otras realizaciones, el tejido adiposo en el interior de la primera cámara está en contacto con la solución de lavado a la que se permite que sea evacuada o extraída de la primera cámara del dispositivo sin agitación, por ejemplo por gravedad o por fuerzas de absorción.

En algunas realizaciones, el volumen de la solución de lavado utilizada para aclarar el tejido adiposo puede ser mayor que el volumen del tejido adiposo. Solamente a modo de ejemplo, en algunas realizaciones, se puede utilizar una solución de lavado mayor de o igual a aproximadamente 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml, 25 ml, 30 ml, 50 ml, 100 ml, 150 ml, 200 ml, 250 ml, 300 ml, 350 ml, 400 ml, 450 ml, 500 ml, 550 ml, 600 ml, 650 ml, 700 ml, 750 ml, 800 ml, 850 ml, 900 ml, 950 ml, 1.000 ml, 1.100 ml, 1.500 ml, 2.000 ml o cualquier cantidad dentro de estos volúmenes, para aclarar el tejido adiposo sin procesar.

Durante la etapa de lavado o de aclarado, el líquido, por ejemplo, solución de lavado, lípido libre, aceite, células sanguíneas, células lisadas del tejido adiposo y componentes sanguíneos, y similares, pasan a través de los poros del filtro entre la primera y la segunda cámaras del dispositivo. De este modo, la segunda cámara queda llena de líquido. El separador del interior de la segunda cámara puede actuar para arrastrar y retener fluido de la primera cámara hacia la segunda cámara, por ejemplo, actuando como un dispositivo de absorción. El desplazamiento del agua, del fluido tumesciente, la sangre y el lípido libre desde la primera cámara que aloja el tejido adiposo, seca y deshidrata el tejido adiposo. El fluido es extraído de la segunda cámara a través de una abertura. En algunas realizaciones, el fluido es extraído de la segunda cámara utilizando una bomba o un aspirador. En algunas realizaciones, se permite que el fluido sea vaciado desde la abertura que sale de la segunda cámara.

Los dispositivos a modo de ejemplo para producir tejido adiposo secado, así como los injertos de tejido adiposo suplementado o reforzado son explicados con más detalle más adelante haciendo referencia a las figuras 2 a 13.

En algunas realizaciones, las etapas de adición de la solución de lavado y de la extracción de los contenidos de la segunda cámara son repetidas 1 vez, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces, o más veces.

El tejido adiposo secado puede ser extraído (preferentemente de manera aséptica) de la primera cámara. En algunas realizaciones, el tejido adiposo secado es procesado adicionalmente (por ejemplo, mediante la adición de un aditivo, tal como se describe con más detalle más adelante).

Injertos de tejido adiposo suplementado

En esta memoria se describen procedimientos y sistemas para producir injertos de tejido adiposo suplementados, mejorados o reforzados, por ejemplo, en los que el injerto es tejido adiposo sin procesar o tejido adiposo secado. Por ejemplo, en algunos procedimientos descritos en esta memoria, los injertos de tejido adiposo reforzados o suplementados con células regenerativas derivadas de las adiposas o células madre derivadas de las adiposas, por ejemplo, con lipo-digestato o una población concentrada de células derivadas de las adiposas que comprende células regenerativas o células madre. Preferentemente, las células regenerativas adicionales derivadas de las adiposas o las células madre derivadas de las adiposas son obtenidas del mismo sujeto. En algunas realizaciones, las células regenerativas derivadas de las adiposas o las células madre derivadas de las adiposas pueden ser de un sujeto diferente.

Mediante algunos de los procedimientos descritos en esta memoria se aplica directamente, por ejemplo, lipoaspirado ("lipo-digestato") al tejido adiposo sin procesar, al tejido adiposo secado, o a la matriz de tejido adiposo sin procesar, y el tejido adiposo sin procesar, el tejido adiposo secado o la matriz de tejido adiposo sin procesar son utilizados como filtro o tamiz para retener componentes presentes en el lipo-digestato (por ejemplo, células regenerativas derivadas de las adiposas tales como una población de células que comprende células madre derivadas de las adiposas y/o células endoteliales y/o células progenitoras). Mediante este proceso se puede preparar rápidamente un injerto de tejido adiposo, un implante, o un injerto graso que ha sido enriquecido, suplementado o reforzado con dichas células regenerativas derivadas de las adiposas (por ejemplo, una población de células que comprende células madre derivadas de las adiposas y/o células endoteliales y/o células progenitoras) sin etapas adicionales de depuración adicional o de aislamiento que pueden ser engorrosas, precisar mucho tiempo y pueden tener un impacto en la viabilidad de las células. Mediante algunos de los procedimientos descritos en esta memoria, por

ejemplo, las poblaciones concentradas de células derivadas de las adiposas que comprenden células regenerativas o células madre son aplicadas directamente sobre el tejido adiposo sin procesar, sobre el tejido adiposo secado, o sobre la matriz de tejido adiposo sin procesar y sobre el tejido adiposo no procesado y el tejido adiposo secado.

5 A diferencia de los planteamientos actuales para aislar, depurar y concentrar las células regenerativas derivadas de las adiposas, algunos procedimientos dados a conocer en esta memoria utilizan la matriz intacta del tejido adiposo sin procesar, el tejido adiposo secado, para filtrar y concentrar suavemente las células regenerativas derivadas de las adiposas *in situ*, esto es, en la propia matriz y al hacerlo así evitar daños a la célula producidos por el centrifugado, la membrana, el gel o el gradiente, el filtrado y otras manipulaciones mecánicas del lipo-digestato.
 10 Adicionalmente, el planteamiento descrito en esta memoria promueve una distribución uniforme o sustancialmente completa de las células regenerativas exógenas derivadas de las adiposas (por ejemplo, una población de células que comprende células madre derivadas de las adiposas, y/o células endoteliales y/o células progenitoras) en todo el injerto de tejido adiposo.

15 Tal como se utiliza en esta memoria, "composición de células regenerativas" o "lipo-digestato" se refiere a la composición de células habitualmente presentes en un volumen de líquido después de que un tejido, por ejemplo, un tejido adiposo es lavado y desagregado, por lo menos parcialmente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una composición de células regenerativas o lipo-digestato puede comprender una solución de células que comprende una población de células derivadas de las adiposas que comprende células regenerativas derivadas de las adiposas,
 20 por ejemplo, células madre. En algunas realizaciones, las composiciones de células regenerativas pueden incluir muchos tipos diferentes de células regenerativas, incluyendo ADSC, células endoteliales, células endoteliales precursoras, células endoteliales progenitoras, macrófagos, fibroblastos, pericitos, células musculares lisas, preadipocitos, adipocitos diferenciados o des-diferenciados, queratinocitos, células progenitoras y precursoras unipotentes y multipotentes (y su progenie) y linfocitos. En algunas realizaciones, las composiciones de células regenerativas incluyen sólo uno, sólo dos, sólo tres, sólo cuatro o más tipos de células regenerativas. Las composiciones de células regenerativas y los lipo-digestatos pueden, en algunas realizaciones, contener asimismo uno o más contaminantes tales como colágeno, que puede estar presente en los fragmentos de tejido. En algunas realizaciones, el lipo-digestato o solución de células regenerativas está sustancialmente libre de fragmentos intactos de tejido adiposo.
 25 30

Tal como se utiliza en esta memoria "célula madre" se refiere a una célula regenerativa multipotente con potencial para diferenciarse en una diversidad de otros tipos de células que realizan una o varias funciones específicas y tienen la capacidad de autorenovarse. Algunas de las células madre dadas a conocer en esta memoria pueden ser pluripotentes.
 35

Tal como se utiliza en esta memoria "célula progenitora" se refiere a una célula regenerativa multipotente con potencial para diferenciarse en más de un tipo de células. "Célula progenitora", tal como se utiliza en esta memoria, se refiere asimismo a una célula regenerativa unipotente con potencial para diferenciarse solamente en un único tipo de célula que realiza una o varias funciones específicas y tiene una capacidad limitada o nula de autorenovarse. En particular, tal como se utiliza en esta memoria, "célula progenitora endotelial" se refiere a una célula unipotente o multipotente con potencial para diferenciarse en células endoteliales vasculares.
 40

Tal como se utiliza en esta memoria "célula precursora" se refiere a una célula regenerativa unipotente con potencial para diferenciarse en un tipo de célula. Las células precursoras y su progenie pueden conservar una capacidad proliferativa extensiva, por ejemplo, linfocitos y células endoteliales que pueden proliferar en condiciones apropiadas.
 45

Tal como se utiliza en esta memoria "número de células madre" o "frecuencia de células madre" se refiere al número de colonias observadas en un ensayo clonogénico con células adiposas derivadas (ADC) que están dispuestas en una placa con una baja densidad de células (< 10.000 células/cavidad) y crecen en un medio de soporte del crecimiento MSC (por ejemplo, el medio DMEM/F12 suplementado con 10% de suero fetal de ternero, 5% de suero equino y agentes antibióticos/antimicóticos. Las células pueden crecer durante dos semanas después de lo cual los cultivos pueden ser teñidos con hematoxilina. Las colonias de más de 50 células son anotadas como CFU-F. La frecuencia de células madre se calcula como el número de CFU-F observadas por cada 100 células nucleadas en la placa (por ejemplo: 15 colonias contadas en una placa iniciada con 1.000 células ADC nucleadas dan una frecuencia de células madre de 1,5%). El número de células madre se calcula como la frecuencia de células madre multiplicada por el número total obtenido de células ADC nucleadas. Un porcentaje elevado ($\approx 100\%$) de CFU-F crecidas a partir de células ADC indica la molécula CD105 de la superficie de la célula que se expresa asimismo mediante células madre derivadas de la médula (Barry y otros, 1999). CD105 se expresa asimismo mediante células madre derivadas de tejido adiposo (Zuk y otros, 2002). En algunas realizaciones, el tejido adiposo puede ser procesado según los procedimientos descritos en esta memoria para obtener lipo-digestato y/o una población concentrada de células derivadas de las adiposas, en la que, al menos, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de las células son células madre u otro tipo de células regenerativas de lipo-digestato o una población de células concentradas derivadas de las adiposas.
 50 55 60 65

Preferentemente, el tejido adiposo es procesado para producir lipo-digestato o una solución de células regenerativas en un sistema estéril cerrado con un recorrido fluido/tejido cerrado para evitar cualquier contacto con el ambiente exterior y eliminar la posibilidad de contaminación del entorno. Los dispositivos útiles para el procesado de tejido adiposo y para producir lipo-digestato son conocidos en la técnica. En realizaciones preferentes, el tejido adiposo es procesado para producir lipo-digestato al tiempo que mantiene un sistema completamente cerrado utilizando, por ejemplo, un dispositivo tal como el descrito en la patente U.S.A. Nº 7.390.484. En algunas realizaciones preferentes, el procedimiento de procesamiento del tejido adiposo no incluye centrifugado, elutriación, o cualesquiera otros planteamientos mecánicos para concentrar la población de células que comprende células regenerativas derivadas de las adiposas que produce o tiene potencial para producir una disminución de la viabilidad de las células regenerativas en la composición de células/lipo-digestato.

En algunas realizaciones, el proceso para obtener lipo-digestato incluye la extracción o la reducción del componente del tejido del adipocito maduro cargado de grasa de la porción o la unidad de tejido adiposo utilizada para producir el lipo-digestato o la población de células concentradas derivadas de las adiposas. En algunas realizaciones, el tejido adiposo es sometido a una serie de etapas de lavado y desagregación en las que, en primer lugar, el tejido es aclarado para reducir la presencia de lípidos libres (liberados de los adipocitos divididos) y de los elementos de la sangre periférica (liberada de los vasos sanguíneos seccionados durante la recogida del tejido). Por ejemplo, en algunas realizaciones, el tejido adiposo es mezclado con una solución salina isotónica, por ejemplo, una solución salina tamponadora de fosfato, u otras soluciones fisiológicas (por ejemplo, PLASMALYTE® de la firma Baxter Inc., NORMOSO® de la firma Abbott Labs, o solución Ringer de lactato). El tejido lavado puede ser desagregado a continuación para liberar adipocitos intactos y otras poblaciones de células de la matriz de tejido conectivo. En ciertas realizaciones, la totalidad del componente adipocito o el componente de células no regenerativas es separado del componente de células regenerativas del tejido adiposo. En otras realizaciones, solamente una porción o porciones del componente adipocito es separada de las células regenerativas. Los fragmentos intactos de tejido adiposo pueden ser separados de las células y lípidos libres mediante diversos planteamientos que incluyen, pero no están limitados a, filtrado, decantación, o sedimentación, o similar. Preferentemente, el tejido digerido no es sometido a centrifugado o a elutriación.

En algunas realizaciones, el tejido adiposo utilizado para generar el lipo-digestato es desagregado totalmente, mientras que en otras realizaciones es desagregado solo parcialmente. Los fragmentos intactos de tejido adiposo, por ejemplo, de tejido adiposo sin procesar o lavado pueden ser desagregados utilizando cualquier técnica o procedimiento convencional, incluyendo la fuerza mecánica (fuerzas de triturado o cizallado), digestión enzimática con enzimas proteolíticas solas o combinadas, tales como colagenasa, tripsina, lipasa, liberasa HI, tal como se da a conocer en la patente U.S.A. Nº 5.952.215, y pepsina, o una combinación de procedimientos mecánicos y enzimáticos. Otros procedimientos adicionales que utilizan colagenasa que pueden ser usados para desagregar tejido adiposo son dados a conocer en las patentes U.S.A. Nº 5.830.714 y 5.952.215 y en el documento de Williams, S. K., S. McKenney y otros (1995) "Selección y depuración de lotes de colagenasa para la digestión de tejido adiposo". *Trasplante de células* 4(3): 281-9. En algunas realizaciones, se pueden utilizar proteasas neutras para desagregar tejido, en vez o además de colagenasa, tal como se da a conocer en Twentyman, P. R. y J. M. Yuhas (1980). "Utilización de proteasa bacteriana neutra para la desagregación de tumores en ratones y tumores esferoidales multicelulares". *Cancer Lett* 9 (3): 225-8. En algunas realizaciones, el tejido adiposo es desagregado con una combinación de enzimas, tal como una combinación de colagenasa y tripsina, tal como se da a conocer en Russell, S. W., W. F. Doe y otros (1976) "Células inflamatorias en neoplasmas sólidos en murinos. Desagregación de tumores e identificación de células inflamatorias constituyentes" *Int. J. Cancer* 18(3): 322-30. En algunas realizaciones, el tejido adiposo puede ser desagregado utilizando una combinación de una enzima tal como tripsina y disociación mecánica, tal como se da a conocer en Engelholm, S.A., M. Spang-Thomsen y otros (1985) "Desagregación de tumores humanos sólidos mediante procedimientos mecánicos y enzimáticos combinados" *Br J Cancer* 51(1): 93-8.

En algunas realizaciones, una porción del tejido adiposo es desagregada totalmente para separar las células regenerativas derivadas de las adiposas (por ejemplo, células madre derivadas de las adiposas) de los adipocitos maduros y del tejido conectivo. En algunas realizaciones, una porción del tejido adiposo es desagregada solo parcialmente. Por ejemplo, la desagregación parcial puede ser realizada con una o varias enzimas que son extraídas antes, por lo menos, de una parte del tejido adiposo con respecto a la cantidad de tiempo que la enzima podría ser dejada en otro caso para desagregar totalmente la porción del tejido adiposo. Dicho proceso puede requerir menos tiempo de procesamiento.

En algunas realizaciones, una porción o una unidad de tejido adiposo es lavada con una solución salina tamponadora estéril isotónica y es incubada con colagenasa, con una concentración de colagenasa, una temperatura y un tiempo suficientes para producir la desagregación adecuada. Preferentemente, las enzimas utilizadas para la desagregación son las aprobadas para uso humano por la autoridad competente (por ejemplo la Administración U.S.A. de drogas y alimentos) y están libres de microorganismos y de contaminantes tales como endotoxina. Las preparaciones adecuadas de colagenasa incluyen colagenasa recombinante y no recombinante. La colagenasa no recombinante se puede obtener en la firma F. Hoffmann-LaRoche Ltd., Indianapolis, Ind. y/o en Advance Biofactures Corp., Lynbrook, N.Y. Las colagenasas recombinantes se pueden obtener asimismo tal como se da a conocer en la patente U.S.A. Nº 6.475.764.

A modo de ejemplo, en algunas realizaciones, el tejido adiposo es tratado con soluciones de colagenasa desde aproximadamente 0,5 µg/ml hasta aproximadamente 100 µg/ml, por ejemplo, colagenasa desde 10 µg/ml hasta aproximadamente 50 µg/ml y es incubado a una temperatura desde aproximadamente 30°C hasta aproximadamente 38°C desde aproximadamente durante 20 minutos hasta aproximadamente 60 minutos. Estos parámetros variarán según la fuente de la enzima de colagenasa, optimizados por estudios empíricos, con el objeto de validar que el sistema es efectivo para la extracción de las poblaciones deseadas de células en un marco de tiempos apropiado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el tejido es incubado con una solución que comprende colagenasa durante 10 a 15 minutos, aproximadamente a 37°C.

Después de la desagregación, el lipo-digestato puede ser lavado/aclarado para extraer aditivos y/o subproductos del proceso de desagregación, por ejemplo, colagenasa y/u otros agentes de desagregación enzimáticos, y lípido libre recién liberado.

En algunas realizaciones, el lipo-digestato puede ser aplicado a una porción de tejido adiposo secado sin procesar, en condiciones que permitan que el lipo-digestato penetre a través del tejido adiposo secado sin procesar. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el lipo-digestato puede ser resuspendido dispuesto en capas encima (o debajo) de una porción de tejido adiposo sin procesar, el tejido adiposo secado y el lipo-digestato son filtrados a través del tejido adiposo sin procesar (o del tejido adiposo secado) utilizando las fuerzas gravitatorias. En algunas realizaciones, el lipo-digestato es bombeado a través del tejido adiposo sin procesar, por ejemplo utilizando una bomba peristáltica, aspirador o similar. En algunas realizaciones, el lipo-digestato es añadido al tejido adiposo sin procesar para crear una mezcla, y la mezcla es agitada o sacudida, mecánica o manualmente. Cuando el lipo-digestato es filtrado a través del tejido adiposo sin procesar o mezclado con el mismo, las células regenerativas derivadas de las adiposas pueden quedar unidas por la matriz del tejido conectivo y la solución salina y otros fluidos circulan a través del tejido produciendo de este modo un injerto graso o un implante suplementado o mejorado con células regenerativas derivadas de las adiposas (por ejemplo, comprendiendo las células regenerativas derivadas de las adiposas, células madre). En algunas realizaciones la circulación, por ejemplo de solución salina, adipocitos maduros, glóbulos rojos y similares, es extraída a un recipiente de residuos. Los sistemas y dispositivos para generar injertos de tejido adiposo suplementado se comentan con mayor detalle más adelante y una realización del procedimiento está representada en el esquema mostrado en la figura 1.

La figura 1 muestra el esquema de un recorrido a modo de ejemplo para preparar un injerto de tejido adiposo suplementado. En la primera etapa, está dispuesta una unidad de tejido adiposo en un recipiente cerrado/estéril (por ejemplo una bolsa flexible plegable o un recipiente rígido tal como está descrito en otra parte en esta memoria) a través de una entrada. El tejido adiposo es aclarado/lavado y digerido en el interior del recipiente, al tiempo que mantiene un sistema cerrado, tal como está descrito en esta memoria. En la realización mostrada en la figura 1 el primer recipiente tiene una entrada y una salida. El primer recipiente mostrado en la figura 1 muestra una entrada única y una salida única, sin embargo, un experto en la materia comprenderá que los dispositivos descritos en esta memoria pueden incluir múltiples entradas, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más entradas y salidas. Preferentemente, la entrada o entradas y la salida o salidas están configuradas para una adición y/o extracción asépticas de los contenidos (por ejemplo, tejidos, aditivos, soluciones y similares) en el primer recipiente.

En la realización dada a conocer en la figura 1, una segunda unidad de tejido adiposo o una porción de la primera unidad de tejido adiposo está proporcionada en un segundo recipiente (por ejemplo, una bolsa flexible plegable o un recipiente rígido tal como está descrito en otra parte en esta memoria). En la realización mostrada en la figura 1, el segundo recipiente tiene una entrada o entradas y una salida o salidas. La entrada del segundo recipiente está configurada para la adición de contenidos (por ejemplo, lipo-digestato o poblaciones concentradas de células derivadas de las adiposas) en el interior del recipiente, preferentemente al tiempo que se mantiene un recorrido cerrado estéril del fluido. La salida está configurada para la extracción de los contenidos, por ejemplo, el exceso de solución de lavado, de lípido libre, sangre y similares del segundo recipiente.

En la realización mostrada en la figura 1, después de la digestión, el lipo-digestato y los fragmentos no desagregados de tejido adiposo y el lípido libre forman diferentes capas en el interior del primer recipiente. La capa de lipo-digestato puede salir (por ejemplo, a través de una bomba o aspirador tal como se muestra en la figura 1) a través de una salida en el recipiente cerrado, y entrar, por ejemplo, a través de un conducto que mantiene el sistema cerrado, en un recipiente separado que contiene tejido adiposo secado, sin procesar o lavado. El lipo-digestato del primer recipiente es mezclado con el tejido adiposo secado sin procesar en condiciones que permiten que las células regenerativas derivadas de las adiposas separadas en el lipo-digestato o la población concentrada de células derivadas de las adiposas, penetren a través del tejido adiposo. En la figura 1, las células regenerativas son bombeadas a través del tejido adiposo sin procesar o secado para crear el injerto de tejido adiposo suplementado.

En algunas realizaciones, todo exceso de lipo-digestato o de solución concentrada de células derivadas de las adiposas es recirculado a través del tejido adiposo secado, sin procesar, al segundo recipiente disponiendo un bucle aséptico en el segundo recipiente en el que el exceso de solución de células regenerativas o de lipo-digestato se vacía a través de una abertura de salida (salida) a un conducto que conduce a una abertura de entrada (entrada) en el recipiente que aloja el tejido adiposo.

Se comprenderá que al producir los injertos de tejido adiposo reforzado o suplementado descritos en esta memoria, los volúmenes de las diversas unidades o porciones de tejido adiposo utilizadas para producir el lipo-digestato o las soluciones concentradas de células derivadas de las adiposas y que sirven de base o fundamento para el injerto de tejido adiposo que es suplementado con células regenerativas derivadas de las adiposas o lipo-digestato, pueden ser iguales o pueden ser diferentes. Por ejemplo, el volumen de tejido adiposo utilizado para producir el lipo-digestato puede ser, por lo menos, mayor o igual de aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, o cualquier cantidad dentro de este margen, más que el volumen de otra unidad de tejido adiposo. En algunas realizaciones, el volumen de tejido adiposo utilizado para producir el lipo-digestato puede ser, por lo menos, mayor o igual de aproximadamente el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 210%, 220%, 230%, 240%, 250%, 260%, 270%, 280%, 290%, 300%, o cualquier cantidad dentro de este margen, menor que el volumen de otra unidad de tejido adiposo. En algunas realizaciones, la proporción de lipo-digestato : tejido injertado es de aproximadamente 0,25:1, 0,5:1, 0,75:1, 1:1, 1,25:1, 1,5:1, 1,75:1 o 2:1, o cualquier proporción dentro de este margen. Preferentemente, la proporción de lipo-digestato a tejido injertado es de menos de aproximadamente 1:1, tal como 0,5:1 o 0,25:1.

En algunas realizaciones, la porción de tejido adiposo procesado (por ejemplo, lipoaspirado digerido o una solución de células regenerativas) y/o una porción de tejido adiposo sin procesar, de tejido adiposo secado, y/o un injerto de tejido adiposo suplementado con células regenerativas derivadas de las adiposas descrito en esta memoria, puede ser combinada, reforzada, suplementada, mejorada o mezclada con aditivos tales como otras células, tejido, fragmentos de tejido, hueso desmineralizado, o factores o agentes tales como aditivos que realizan el lisado de los adipocitos y/o de los glóbulos rojos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la porción de tejido adiposo procesado y/o una porción de tejido adiposo sin procesar (o de tejido adiposo secado), y/o un injerto de tejido adiposo suplementado con células regenerativas derivadas de las adiposas descrito en esta memoria puede ser combinada, suplementada, o mezclada con aditivos de factor de crecimiento tales como insulina o medicamentos tales como elementos de la familia de la tiaglitazona, antibióticos, compuestos biológicamente activos o inertes tales como coagulasas, inhibidores de reagregación de las células, estructuras de plástico reabsorbibles, u otros aditivos previstos para mejorar el suministro, la eficacia, la tolerabilidad o la función de la población.

En ciertas realizaciones, el tejido adiposo sin procesar, el tejido adiposo secado, el lipo-digestato y/o los injertos de tejido adiposo suplementados pueden ser suplementados con uno o varios agentes aditivos de diferenciación celular, tales como citoquinas y factores de crecimiento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones son suplementadas con agentes o factores angiogénicos. En algunas realizaciones, el tejido adiposo sin procesar, el tejido adiposo secado, el lipo-digestato, y/o los injertos adiposos suplementados descritos en esta memoria están dotados de un factor o factores angiogénicos como un aditivo. Tal como se utiliza en esta memoria, el término "angiogénesis" se refiere al proceso mediante el cual se generan nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura y el tejido existentes (Folkman, 1995). Tal como se utiliza en esta memoria, el término "factor angiogénico" o "proteína angiogénica" se refiere a cualquier proteína conocida, péptido, u otro agente capaz de promover el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura existente ("angiogénesis"). Los factores angiogénicos adecuados a utilizar en la invención incluyen, pero no están limitados a: Factor de crecimiento de la placenta (Luttun y otros, 2002), Factor de estimulación de colonias de macrófagos (Aharinejad y otros, 1995), Factor de estimulación de colonias de granulocitos macrófagos (Buschmann y otros, 2003), Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)-A, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (Mints y otros, 2002), neuroplina (Wang y otros, 2003), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)-1, FGF-2(bFGF), FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6 (Botta y otros, 2000), Angiopoyetina 1, Angiopoyetina 2 (Sundberg y otros, 2002), eritropoyetina (Ribatti y otros, 2003), BMP-2, BMP-4, BMP-7 (Carano y Filvaroff, 2003), TGF-beta (Xiong y otros, 2002), IGF-1 (Shigematsu y otros, 1999), Osteopontina (Asou y otros, 2001), Pleyotropina (Beecken y otros, 2000), Activina (Lamouille y otros, 2002), Endotelina-1 (Bagnato y Spinella, 2003), y combinaciones de los mismos. Los factores angiogénicos pueden actuar de forma independiente o en combinación entre sí. Cuando actúan en combinación, los factores angiogénicos pueden actuar asimismo de forma sinérgica, con lo que el efecto combinado de los factores es mayor que la suma de los efectos de los factores individuales tomados por separado. El término "factor angiogénico" o "proteína angiogénica" abarca también análogos funcionales de dichos factores. Los análogos funcionales incluyen, por ejemplo, porciones funcionales de los factores. Los análogos funcionales incluyen asimismo anticuerpos anti-idiotípicos que se unen a los receptores de los factores y, de este modo, simulan la actividad de los factores que promueven la angiogénesis. Los procedimientos para generar dichos anticuerpos anti-idiotípicos son bien conocidos en la técnica y están descritos, por ejemplo, en el documento WO 97/23510.

De este modo, la presente invención permite que los injertos de tejido adiposo sean aplicados a un paciente distinto del paciente del que se obtuvieron las células y/o el tejido, pudiendo ser administrados uno o más agentes aditivos inmunosupresivos al paciente que recibe el injerto para reducir, y preferentemente evitar, el rechazo del trasplante. Los ejemplos de agentes inmunosupresivos adecuados con los procedimientos dados a conocer en esta memoria incluyen agentes que inhiben los recorridos de coestimulación de células T - / células B, tales como los agentes que interfieren con el acoplamiento de células T y células B a través de los recorridos CTLA4 y B7, tal como se da a

conocer en la publicación de la patente U.S.A. Nº 20020182211. Otros ejemplos incluyen ciclosporina, mofetilo de miofenilato, rapamicina y globulina anti-timocito.

En algunas realizaciones, por lo menos una porción del tejido sin procesar, el tejido adiposo secado el lipo-digestato y/o el injerto de tejido adiposo suplementado, son almacenados para una implantación/infusión posterior. Por ejemplo, las composiciones dadas a conocer en esta memoria (es decir, tejido sin procesar, tejido adiposo secado, lipo-digestato, poblaciones concentradas de células adiposas derivadas de células adiposas y/o injerto de tejido adiposo suplementado) pueden ser divididas en más de una unidad o una parte alícuota de tal modo que parte de la composición es conservada para una aplicación posterior mientras que parte es aplicada inmediatamente al paciente.

Al final del proceso, el injerto de tejido adiposo suplementado o reforzado puede ser cargado en un dispositivo de suministro tal como una jeringa, una estructura, una cápsula absorbible o un implante para su colocación en el receptor mediante, por ejemplo, técnicas subcutáneas. En otras palabras, el injerto graso suplementado, mejorado o reforzado o el implante pueden ser colocados en el paciente mediante cualquier medio conocido de los expertos en la materia, por ejemplo, pueden ser introducidos en la dermis (subcutáneos), en el espacio del tejido o en el interior de los tejidos (por ejemplo, pecho, glúteos, o similares) o en otra ubicación.

Dispositivos para producir injertos de tejido adiposo secado e injertos de tejido adiposo suplementados

Tal como se ha descrito anteriormente en esta memoria están dispuestos dispositivos y/o sistemas para producir injertos de tejido adiposo secados y suplementados o reforzados. Volviendo a la figura 2, en ella se muestra un sistema a modo de ejemplo para la producción de injertos de tejido adiposo adecuados para ser suplementados con células regenerativas derivadas de las adiposas. El sistema comprende un recipiente flexible de recogida -200-, por ejemplo, una bolsa de recogida de calidad médica con una capa de malla filtrante -210- que divide la bolsa en una primera cámara interna -280- y una segunda cámara interna -290-. En algunas realizaciones, el filtro puede comprender una pluralidad de aberturas o poros que permiten el paso de los contenidos, por ejemplo, adipocitos maduros, glóbulos rojos, solución salina, y similares desde la primera cámara interna al interior de la segunda cámara interna. Preferentemente la pluralidad de poros en el filtro son mayores de aproximadamente 30 µm. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la pluralidad de aberturas en el filtro pueden ser mayores que, menores que o iguales a 30 µm, 35 µm, 40 µm, 50 µm, 60 µm, 70 µm, 80 µm, 90 µm, 100 µm, 110 µm, 120 µm, 130 µm, 140 µm, 150 µm, 160 µm, 170 µm, 180 µm, 190 µm, 200 µm, 210 µm, 220 µm, 230 µm, 240 µm, 250 µm, 260 µm, 270 µm, 280 µm, 290 µm, y 300 µm, o cualquier número comprendido entre estos márgenes. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la pluralidad de aberturas en el filtro -210- pueden estar comprendidas entre aproximadamente 30 µm, hasta aproximadamente 500 µm, (por ejemplo, aproximadamente de 60 µm a 300 µm, tal como de 74 hasta aproximadamente 265 µm).

En algunas realizaciones, la primera cámara interna -280- incluye dos aberturas -220-, -230-. En algunas realizaciones, la segunda cámara interna -290- incluye una abertura -240-. En algunas realizaciones, el recipiente flexible de recogida -200- comprende un recipiente de lavado -250- para la solución de lavado o de aclarado que está acoplado funcionalmente a la cámara interna de recogida -280- a través de la abertura -220- para permitir el paso de la solución desde el recipiente -250- a la cámara interna -280- a través de un recorrido cerrado del fluido. En algunas realizaciones, la abertura -240- está acoplada funcionalmente a una bolsa de residuos -260- a través de la cual los contenidos tales como los glóbulos rojos, la solución fisiológica, los adipocitos maduros y similares son extraídos de la cámara interna -290-.

En algunas realizaciones el tejido adiposo es añadido a la cámara flexible de recogida -200- a través de la abertura -220-. En algunas realizaciones, una solución de aclarado como la solución de lactato de Ringer, es añadida a la primera cámara interna a través de la abertura -230-. El recipiente flexible de recogida es agitado o sacudido a continuación, por ejemplo, en un dispositivo de sacudida mecánica u otro dispositivo de agitación. Los glóbulos rojos, el exceso de solución de aclarado, las células lisadas y los adipocitos maduros y el lípido son extraídos del tejido presente en la cámara -280-.

En algunas realizaciones, el sistema está configurado para permitir la adición aséptica de lipo-digestato a la cámara interna -280- que aloja el tejido adiposo aclarado. Por ejemplo, el recipiente flexible de recogida -200- puede tener una abertura adicional para proporcionar un recorrido estéril de entrada al interior de la cámara interna -280- por el que se puede dirigir el lipo-digestato.

Las figuras 3 a 13 muestran realizaciones adicionales de los sistemas dados a conocer en esta memoria para la producción de injertos de tejido adiposo. Las figuras 3 y 4 muestran una configuración a modo de ejemplo de un sistema -300- que proporciona un proceso estéril, cerrado, para controlar la hidratación de un injerto de tejido adiposo, por ejemplo, para crear tejido adiposo secado. Por ejemplo, un problema corriente asociado a la preparación de implantes de tejido adiposo se refiere a la impredecibilidad del comportamiento del implante después de la implantación, debido a la reabsorción o a la absorción de fluidos en el cuerpo procedentes del tejido injertado. Tal como se describe más adelante, el sistema -300- proporciona al operario la posibilidad de reducir esta variabilidad mediante la creación de un injerto más seco que el que se obtiene convencionalmente del tejido adiposo. Además, este injerto o implante de tejido adiposo más seco puede estar, opcionalmente, suplementado con

lipo-digestato (o con poblaciones concentradas de células derivadas de las adiposas que comprenden células regenerativas) o aplicado directamente a un sujeto.

Las figuras 3 y 4 muestran la configuración de una realización del sistema -300- para la preparación de tejido adiposo secado. El sistema -300- comprende una primera envoltura exterior -310- y una segunda envoltura exterior -340- (denominadas conjuntamente y de manera intercambiable en esta memoria como "envolturas exteriores" o "envoltura exterior") cerradas herméticamente juntas para formar la capa exterior del sistema -300-. La figura 5 muestra, a modo de ejemplo, una envoltura exterior -310- (o -340-) utilizada en el sistema -300-. Tal como se describe más adelante, las envolturas exteriores -310-, -340- pueden estar fijadas, unidas o selladas entre sí para formar una bolsa flexible, plegable. La figura 8 muestra un detalle de un cierre estanco -311- a modo de ejemplo que puede ser utilizado en la fabricación del sistema -300-. La primera y la segunda envolturas exteriores -310- y -340- pueden estar fabricadas de cualquier material flexible de calidad médica conocido en la técnica, por ejemplo, Clase VI de calidad médica USP o acetato de etil vinilo (EVA) de calidad médica. En algunas realizaciones, el material flexible que forma la primera y la segunda envolturas exteriores puede estar fabricado de cualquier material que se pueda unir a sí mismo. En otras realizaciones, el material flexible que forma la primera y la segunda envolturas exteriores puede estar fabricado de cualquier material que pueda ser unido a sí mismo y que pueda aprisionar y/o sellar cualquier otro material presente en el sistema o en los subsistemas. Las envolturas exteriores pueden estar fabricadas asimismo de un material que pueda resistir la conservación en frío. Las envolturas exteriores pueden estar fabricadas asimismo de un material que pueda soportar un autoclave, materiales que sean transparentes o de colores, materiales que sean biocompatibles, materiales que sean resistentes a los fluidos corporales y/o materiales que sean esterilizables, por ejemplo, con radiación, óxido de etileno o calor seco.

Por ejemplo, el material puede ser EVA de calidad médica. Además, el material es tal que se pueda unir a sí mismo y aprisionar otro material, por ejemplo, filtros presentes en el interior del sistema. La unión se puede realizar por medio de procesos descritos adicionalmente en esta memoria tales como soldadura por RF. En ciertas realizaciones, las envolturas exteriores pueden ser selladas entre sí mediante un doble sellado por calor a lo largo del perímetro de las envolturas exteriores, como en el sistema -300- mostrado en las figuras 3 a 13. Las envolturas exteriores o cualquiera de los subsistemas pueden ser sellados utilizando adhesivos conocidos por los expertos en la técnica. Se pueden considerar los tipos de adhesivos a utilizar incluyendo su mecanismo de acción. Por ejemplo, se pueden utilizar adhesivos que se endurecen por la pérdida del disolvente, adhesivos que se endurecen por pérdida de agua, adhesivos que se endurecen mediante enfriamiento, adhesivos que se endurecen mediante reacción química, adhesivos que no se endurecen y adhesivos sensibles a la presión. Se pueden considerar mecanismos tales como la adhesión mediante adsorción física, adhesión mediante unión química, teoría electrostática de la adhesión, enclavamiento mecánico, adhesión por interdifusión, capas límite débiles, y adhesión sensible a la presión. Las superficies a unir deben ser tratadas también tales como la topografía de superficies, la termodinámica de superficies, y el análisis químico de superficies. Ciertas superficies a unir pueden requerir asimismo tratamientos previos particulares para un sellado óptimo. Por ejemplo, se pueden considerar tratamientos previos apropiados para metales, tratamientos previos para materiales inorgánicos, tratamientos previos para plásticos y tratamientos previos para elastómeros.

En algunas realizaciones, los sistemas y subsistemas creados poseen ventajosamente propiedades mecánicas que les permiten soportar tensiones. De este modo, se debe realizar un análisis global de tensiones, así como un análisis por elementos finitos de las uniones adhesivas. La durabilidad de las uniones adhesivas debe ser asimismo evaluada. Por ejemplo, se deben considerar aditivos para reducir la degradación foto-oxidativa. El comportamiento de las uniones estructurales a metales en entornos húmedos debe ser considerado. El agua y los adhesivos, el agua y las superficies adhesivas de interconexión, otros fluidos, y las uniones en madera deben ser asimismo considerados. En algunas realizaciones, puede ser necesario realizar un ensayo no destructivo utilizando ultrasonidos convencionales, dispositivos de ensayo de uniones, procedimientos de escaneado rápido y medición de la adecuación cohesiva. Asimismo, puede ser necesario evaluar el comportamiento al impacto de las uniones unidas con adhesivo. Por ejemplo, se puede evaluar un ensayo al impacto de adhesivos y de uniones fijadas con adhesivo, las características de los adhesivos bajo una alto índice de carga y la distribución de tensiones y la variación en las uniones fijadas con adhesivo sometidas a impacto. Asimismo, puede ser deseable evaluar la fractura mecánica de uniones adhesivas. Por ejemplo, criterios de energía respecto a fallos, intensidad de tensiones, velocidad de liberación de energía, energía de adherencia termodinámica, intrínseca, y práctica, evaluación de la energía de fractura y durabilidad. Otros factores que pueden ser evaluados incluyen fatiga, amortiguación de vibraciones, unión de materiales similares y disimilares y materiales compuestos de unión.

En una realización particular, las envolturas exteriores del sistema o de cualquiera de los subsistemas, o cualquier combinación adecuada pueden ser selladas utilizando soldadura por radiofrecuencia (RF). La soldadura por RF es denominada asimismo como soldadura dieléctrica o por alta frecuencia (HF). La soldadura por RF es un proceso de aplicación de radiofrecuencia para fundir materiales juntos. La soldadura resultante puede ser tan fuerte como los materiales originales. La soldadura por RF se basa en determinadas propiedades del material a soldar para producir generación de calor en un campo eléctrico que varía rápidamente. Concretamente, el proceso implica someter las piezas a unir a un campo electromagnético de alta frecuencia (13 - 100 MHz) aplicado entre dos varillas metálicas, que produce el calentamiento del material que va a ser fundido junto. Con la utilización de esta técnica solamente se pueden soldar ciertos materiales. El policloruro de vinilo (PVC) y los poliuretanos son los termoplásticos más

corrientes que pueden ser soldados mediante el proceso de RF. Es posible soldar mediante RF otros polímeros incluyendo nailon, PET, EVA y algunas resinas ABS aunque pueden requerir condiciones especiales. Por ejemplo, el nailon y el PET pueden ser soldados si se utilizan varillas de soldadura precalentadas además de la energía de RF. La soldadura mediante RF puede no ser adecuada para PTFE, policarbonato, poliestireno, polietileno o polipropileno. No obstante, se ha desarrollado una calidad especial de poliolefina que tiene la capacidad de ser soldada mediante RF.

La función primaria de la soldadura por RF es formar una unión en dos o más grosores de material laminar. Al incorporar un borde cortante junto a la superficie de soldadura, el proceso puede soldar y cortar simultáneamente un material. El borde cortante comprime suficientemente el plástico caliente para permitir que el exceso de material sobrante sea recortado, por lo que el proceso se denomina a menudo como soldadura de corte y sellado. Es asimismo posible soldar piezas adicionales de material sobre la superficie de un producto.

En algunas realizaciones, el sistema y los subsistemas pueden ser sellados asimismo utilizando soldadura por ultrasonidos. Cuando se une material mediante soldadura ultrasónica, la energía requerida es en forma de vibraciones mecánicas. La herramienta de soldadura (sonotrodo) se acopla a la pieza a soldar y se desplaza en dirección longitudinal. La pieza a soldar permanece estática. Las piezas que deben ser unidas son comprimidas simultáneamente una contra la otra. La acción simultánea de las fuerzas estáticas y dinámicas produce la fusión de las piezas sin tener que utilizar material adicional. Este procedimiento puede ser utilizado a escala industrial para unir tanto plásticos como metales que pueden ser utilizados en el sistema descrito en esta memoria. En el caso de soldadura ultrasónica de plásticos, el aumento térmico en la zona de la unión es producido por la absorción de vibraciones mecánicas, la reflexión de las vibraciones en la zona de conexión y la fricción de las superficies de las piezas. Las vibraciones son introducidas verticalmente. En la zona de contracción, se produce calor de fricción, de modo que el material se plastifica localmente, forjando una conexión indisoluble entre ambas piezas en un periodo de tiempo muy corto. El requisito previo es que ambas piezas a unir tengan un punto de fusión casi equivalente. La calidad de la unión de la soldadura ultrasónica es muy uniforme debido a que la transferencia de energía y el calor interno liberado permanecen constantes y está limitada a la zona de unión. Con el objeto de obtener un resultado óptimo, las zonas a unir deben estar preparadas para hacerlas adecuadas para la unión por ultrasonidos. Además de la soldadura de plásticos, los ultrasonidos pueden ser utilizados también para remachar partes de trabajo del sistema descrito en esta memoria o para incrustar piezas de metal en el plástico según se precise.

Un técnico en la materia comprenderá que el sistema dado a conocer en esta memoria puede estar fabricado de materiales distintos de los materiales flexibles descritos anteriormente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sistema o los componentes del sistema descrito en esta memoria pueden ser fabricados de metal. En dichas realizaciones, la soldadura ultrasónica de metales puede ser utilizada para unir o fijar entre sí componentes del sistema. A diferencia de otros procesos, las piezas a soldar no se calientan hasta el punto de fusión, sino que son conectadas aplicando presión y vibraciones mecánicas de alta frecuencia. A diferencia de la soldadura de plásticos, las vibraciones mecánicas utilizadas en la soldadura ultrasónica de metales son introducidas horizontalmente. Concretamente, durante la soldadura ultrasónica de metales, se inicia un proceso complejo que implica fuerzas estáticas, fuerzas de cizallado oscilatorias y un moderado incremento de la temperatura en la zona de la soldadura. La magnitud de estos factores depende del grosor de las piezas de trabajo, su estructura superficial y sus propiedades mecánicas. Las piezas de trabajo son colocadas entre una parte fija de la máquina, es decir, el yunque y el sonotrodo, que oscila horizontalmente durante el proceso de soldadura a alta frecuencia (habitualmente 20 o 35 o 40 kHz). La frecuencia de oscilación utilizada más corrientemente (frecuencia de trabajo) es de 20 kHz. Esta frecuencia está por encima de la que es audible por el oído humano y permite asimismo el mejor uso posible de la energía. En el caso de procesos de soldadura que solamente requieren una pequeña cantidad de energía, se puede utilizar una frecuencia de trabajo de 35 o 40 kHz.

El sistema -300- a modo de ejemplo mostrado en las figuras 3 a 13 comprende un primer y un segundo subsistema o una primera y una segunda cámaras creadas mediante la inserción de un material filtrante -320- entre la envoltura exterior -310- y la envoltura exterior -340-. El primer subsistema o cámara está definido por el área entre la envoltura exterior -310- y el material filtrante -320-, y el segundo subsistema o cámara está definido por el área entre el material filtrante -320- y la envoltura exterior -340-. En ciertas realizaciones, un doble sellado calorífico a lo largo del perímetro del sistema -300- aprisiona el material filtrante -320-, de tal modo que se forman dos subsistemas o cámaras distintos en el interior del sistema -300-. El material filtrante puede comprender una pluralidad de aberturas que teóricamente permitirían el paso de la mayoría de ciertos contenidos, por ejemplo, líquidos, fluidos tumescentes, glóbulos rojos, soluciones de lavado (por ejemplo, solución salina, solución de lactato de Ringer y similares), residuos celulares y la retención de la mayoría de ciertos contenidos, por ejemplo, adipocitos maduros, células regenerativas, células madre, células progenitoras y tejido conectivo. Los componentes que pasan a través y los que son retenidos son determinados por el tamaño de las aberturas en el material filtrante, es decir, generalmente los componentes más pequeños que las aberturas pasan a través y los componentes más grandes que las aberturas son retenidos. En consecuencia, el material filtrante puede ser seleccionado en base al tamaño de los componentes de interés. Se comprenderá que dependiendo de las condiciones del sistema, por ejemplo, presión, flujo de aire, viscosidad, etc. el número o el porcentaje de componentes más pequeños que las aberturas en el material filtrante que pasarán a través y el número o el porcentaje de componentes más grandes que las aberturas que serán retenidos, puede variar.

Preferentemente, el material filtrante tiene una pluralidad de poros que permiten una comunicación fluida en el interior o entre subsistemas. Los poros permiten que composiciones (o componentes de las mismas) introducidas en un subsistema se difundan en otro subsistema o viceversa. Los poros están situados preferentemente en una zona sustancial de la superficie de cualquier filtro que pueda ser utilizado. En la figura 6 se muestra un filtro a modo de ejemplo.

Cualquier filtro que permita un exceso de líquidos, de glóbulos rojos o de residuos celulares puede ser utilizado en el sistema -300-. Por ejemplo, cualquier filtro que retenga adipocitos, células regenerativas y células madre o tejido conectivo puede ser utilizado. Algunas realizaciones dan a conocer un sistema -300- en el que los poros del material filtrante -320- pueden variar desde aproximadamente 1 micra hasta aproximadamente 750 micras, por ejemplo, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740 o 750 micras o cualquier número o margen entre ellos. Preferentemente, la pluralidad de aberturas o poros en el material filtrante es mayor de 40 µm. Por ejemplo, en una realización, la pluralidad de aberturas en el material filtrante -320- puede tener 74 micras. En otras realizaciones, la pluralidad de aberturas puede variar desde aproximadamente 73 a 264 micras.

Tal como se muestra en las figuras 3 a 13, en algunas realizaciones, el segundo subsistema o cámara, es decir, la zona entre el material filtrante -320- y la envoltura exterior -340- descrita anteriormente puede estar además dividida en dos subsistemas tales que se forma un tercer subsistema o cámara. Por ejemplo, un separador -330-, por ejemplo una pantalla de separación, una malla o un filtro es insertado entre el material filtrante -320- y la envoltura exterior -340-. Un separador a modo de ejemplo que comprende una pantalla de separación se muestra en la figura 7. El segundo y el tercer subsistemas o cámaras pueden contener las soluciones, efluentes, residuos, desechos y otros materiales no deseados del primer subsistema. En ciertas realizaciones, el segundo y el tercer subsistemas o cámaras son parcialmente distintos uno de otro. En algunas realizaciones, el segundo y el tercer subsistemas o cámaras son totalmente distintos uno de otro. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el separador -330-, por ejemplo, la pantalla de separación tiene un grado de libertad o es totalmente libre para flotar en el interior del segundo subsistema, de tal modo que se forma un tercer subsistema que no está completamente separado del segundo subsistema. En otras realizaciones, el segundo y el tercer subsistemas son completamente distintos uno del otro porque el separador, por ejemplo, la pantalla de separación o similar está aprisionada entre las capas exteriores -310- y -340- utilizando cualquiera de los mecanismos de unión conocidos en la técnica o descritos en esta memoria, por ejemplo, unión por adhesivos, soldadura por RF o soldadura ultrasónica. Un experto en la materia comprenderá fácilmente que se pueden utilizar varios planteamientos para fijar las diferentes capas del sistema -300-, por ejemplo, la primera y la segunda envolturas exteriores, el filtro y el separador pueden ser seleccionados para garantizar una resistencia óptima del sellado.

En algunas realizaciones, el separador -330- (por ejemplo, una pantalla de separación) está configurado para minimizar el contacto entre el material filtrante -320- y la envoltura exterior -340-. Un contacto mínimo impide que el material filtrante -320- y la envoltura exterior -340- queden adheridos uno al otro durante el procesamiento del tejido (por ejemplo, si se crea un vacío en el interior de la bolsa). De este modo, la pantalla de separación -330- crea un espacio entre el material filtrante -320- y la envoltura exterior -340-. En ciertas realizaciones, el separador puede comprender nervios, tirantes y otras características que crean un espacio entre la envoltura exterior -340- y el filtro -320-. En otras realizaciones, el lado de la envoltura exterior -340- que está situado frente al material filtrante -320- puede ser rugoso para crear el espacio preciso, obviando de este modo la necesidad de un separador distinto. La creación de espacio entre el filtro y la envoltura exterior del sistema genera una fuerza en la bolsa que empuja, arrastra o absorbe el exceso de fluido procedente del tejido adiposo hacia el segundo y/o el tercer subsistema. El exceso de fluido puede ser dirigido a continuación a un recipiente de residuos. El espacio creado por el separador, por ejemplo, la pantalla de separación -330- y/o el material utilizado para crear el separador están asimismo diseñados, configurados o seleccionados preferentemente para absorber el lípido presente en el tejido adiposo contribuyendo de este modo a extraer el lípido y los fluidos del tejido en el interior del primer subsistema o cámara y a secar o deshidratar adicionalmente el tejido.

En ciertas realizaciones, el separador -330- está fabricado de un material poroso y/o comprende una pluralidad de aberturas o poros. En ciertas realizaciones, la pluralidad de poros del separador -330- pueden tener aproximadamente desde 300 hasta aproximadamente 3.000 micras o cualquier cantidad dentro de este margen, por ejemplo aproximadamente desde 500 hasta aproximadamente 2.000 micras. Preferentemente, la pluralidad de aberturas o poros tienen un diámetro que es mayor o igual a aproximadamente 300 micras, 400 micras, 500 micras, 600 micras, 700 micras, 800 micras, 900 micras, 1.000 micras, 1.100 micras, 1.200 micras, 1.300 micras, 1.400 micras, 1.500 micras, 1.600 micras, 1.700 micras, 1.800 micras, 1.900 micras, 2.000 micras, 2.100 micras, 2.200 micras, 2.300 micras, 2.400 micras, 2.500 micras, 2.600 micras, 2.700 micras, 2.800 micras, 2.900 micras, 3.000 micras o cualquier número dentro de este margen. En una realización, la pluralidad de aberturas tienen aproximadamente 1.000 micras. En algunas realizaciones, el separador está fabricado de un material poroso que tiene una zona abierta que es mayor o igual a aproximadamente 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, 20%, 22%, 24%, 26%, 28%, 30%, 32%, 35%, 36%, 38%, 40%, 42%, 44%, 46%, 48%, 50%, 52%, 54%, 56%, 58%, 60%, 62%, 65% o cualquier porcentaje dentro de este margen. Un experto en la materia comprenderá que los poros de tamaño más

grande permiten una transferencia o un vaciado más rápido de material de la primera cámara a la segunda cámara, y que el tamaño del poro del separador puede ser ajustado para equilibrar la absorción y/o el vaciado o las propiedades de filtración. En algunas realizaciones, el líquido y el lípido se adsorben a y o llenan las zonas abiertas del separador poroso. Los solicitantes han realizado el sorprendente descubrimiento de que en algunas realizaciones, los separadores que tienen unos poros más grandes que los poros del material filtrante, facilitan la extracción de fluido del tejido adiposo y de fluidos de la primera cámara del sistema. De este modo, en algunas realizaciones, el separador, por ejemplo, la pantalla de separación -330- es un material poroso en el que los poros tienen un diámetro o un tamaño más grande que el material filtrante -320- descrito anteriormente.

En algunas realizaciones, el separador comprende un material biocompatible que atrapa o absorbe lípido y/o fluidos. Por ejemplo, los separadores pueden estar fabricados de un poliéster, un nailon, rayón, nitrato de celulosa y acetato de celulosa. En algunas realizaciones, el separador está fabricado de un material flexible, y en algunas realizaciones, el separador está fabricado de un material rígido. Preferentemente, el separador está fabricado de una malla de poliéster, por ejemplo, con un tamaño de poro de 1.000 micras.

Tal como se muestra en las figuras 3 a 13, el sistema -300- puede tener una o varias aberturas para permitir la adición o la extracción de material hacia el interior y el exterior del sistema. Por ejemplo, el sistema -300- mostrado en las figuras 3, 4, 8 y 9 tiene tres aberturas separadas. Las aberturas -400- y -500- están en comunicación con el primer subsistema, por ejemplo, la zona entre la envoltura exterior -310- y el material filtrante -320-. La abertura -600- está en comunicación con el segundo y/o el tercer subsistema, por ejemplo, la zona entre el material filtrante -320- y la pantalla de separación -330- y/o la zona entre la pantalla de separación -330- y la envoltura exterior -340-. Sin embargo, en algunas realizaciones, el sistema puede incluir solo una abertura o solo dos aberturas, por ejemplo, una abertura de entrada y una abertura de salida. En otras realizaciones, el sistema puede incluir más de tres aberturas, por ejemplo, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aberturas.

En general, las aberturas comprenden por lo menos un orificio que se extiende desde el entorno al interior del sistema o subsistema o viceversa. Los orificios tienen un cierre hermético y estanco al agua a lo largo de las costuras de las aberturas. Tal como se describe más adelante, en algunas realizaciones, las aberturas están configuradas para ser acopladas a uno o varios conectores, conductos, conjuntos de aberturas, adaptadores, tapas o jeringas.

Las aberturas pueden proporcionar un punto de acceso para la introducción de diversos fluidos, por ejemplo, fluidos de lavado y aclarado y para la extracción de dichos fluidos y de los efluentes. Preferentemente, las aberturas pueden estar cerradas (por ejemplo con una válvula). En algunas realizaciones, las aberturas pueden ser cerradas manualmente por medio de una pinza. En algunas realizaciones, las aberturas pueden ser cerradas por medio de una tapa. En algunas realizaciones, las aberturas comprenden válvulas de autocierre, por ejemplo, una válvula deformable que proporciona un flujo unidireccional de fluido o de contenidos hacia la cámara o cámaras internas del sistema pero no al exterior de las mismas. En otras realizaciones, las válvulas deformables proporcionan un flujo bidireccional. Las válvulas deformables pueden estar fabricadas de cualquier material deformable conocido en la técnica, tal como caucho, neopreno, silicona, poliuretano o similar. En algunas realizaciones, las aberturas comprenden una válvula Luer activada. En algunas realizaciones las aberturas están situadas en el sistema de tal modo que cuando el sistema se mantiene vertical una o más válvulas están situadas en la parte inferior, de tal modo que los fluidos y el efluente salen con la ayuda de la fuerza gravitatoria, de aspiración o de presión. Otras aberturas pueden ser utilizadas asimismo con el sistema -300- de la invención, por ejemplo, aberturas para la ventilación, aberturas para añadir materiales o gases al sistema o subsistemas, etc.

Las aberturas en el sistema o en el subsistema pueden estar configuradas para ser interconectadas o acopladas directa o indirectamente (es decir, a través de un adaptador) a una jeringa o un catéter utilizados para la aspiración de material adiposo desde el cuerpo origen, de tal modo que el tejido adiposo es transportado directamente al sistema de forma anaeróbica. De manera similar, una cánula o una jeringa puede ser fijada a una abertura para el trasplante anaeróbico del tejido refinado. En consecuencia, en algunas realizaciones, las aberturas en el sistema o en el subsistema están configuradas para ser acopladas directa o indirectamente con jeringas desechables o reutilizables. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las aberturas están configuradas para ser acopladas directa o indirectamente con una jeringa de 1 cm³, una jeringa de 2 cm³, una jeringa de 5 cm³, una jeringa de 10 cm³, una jeringa de 20 cm³, una jeringa de 50 cm³, una jeringa de 60 cm³, una jeringa de 100 cm³, una jeringa de 250 cm³, o similar. En algunas realizaciones, las aberturas están configuradas para ser acopladas directa o indirectamente con una jeringa que tenga una punta con un gran orificio, por ejemplo, una jeringa Toomey.

En algunas realizaciones, el sistema -300- comprende un conjunto -700- de una abertura de acceso de tejido para facilitar el suministro o la eliminación aséptica de contenidos (por ejemplo, tejido adiposo), desde y hacia la primera cámara o subsistema. (Ver, por ejemplo, la figura 9). En las figuras 10 y 11 se muestra con más detalle el conjunto -700- de la abertura de acceso de tejido. En algunas realizaciones, el conjunto de la abertura de acceso de tejido comprende una abertura -710- cilíndrica con un gran orificio. El gran tamaño del orificio -710- facilita el suministro y la extracción de tejido en la primera cámara. Una válvula de plástico deformable -720- puede proporcionar una barrera que impide que el material pase a través de la abertura -710- al cuerpo de la abertura -730-. La válvula de plástico deformable -720- puede estar configurada para abrirse y permitir el flujo de los contenidos a través del orificio hacia el cuerpo -730- de la abertura de acceso de tejido, conduciéndolos a la primera cámara del sistema

mediante la introducción de la punta de una jeringa (no mostrada) en el mismo. La válvula de plástico deformable -720- vuelve a una posición de cierre por defecto tras la extracción de la punta de la jeringa de la válvula, sellando de este modo la abertura y bloqueando la circulación de cualquier contenido (por ejemplo, tejido o líquido) fuera del cuerpo de la abertura de acceso de tejido cuando no se está utilizando. En algunas realizaciones, el conjunto de la abertura de acceso de tejido está configurado para ser conectado a una tapa -740- para proporcionar un cierre adicional a la abertura de acceso de tejido cuando la abertura no se está utilizando. En la figura 12 se muestra una ilustración más detallada de una tapa -740- a modo de ejemplo. En algunas realizaciones, el conjunto de la abertura de acceso de tejido puede ser desmontado del sistema -300-. En algunas realizaciones, el conjunto de la abertura de acceso de tejido está fijado o unido al sistema -300-, por ejemplo, a través de un adhesivo tal como un adhesivo UV.

En algunas realizaciones, el adaptador o conector está configurado para unir la punta de una jeringa a una abertura del sistema. Tal como se ha descrito anteriormente, los adaptadores tales como los conjuntos de la abertura de tejido pueden estar integrados a la abertura o aberturas o pueden ser extraídos de la misma. En algunas realizaciones, el adaptador o conector comprende un conector Luer. En algunas realizaciones, el adaptador o conector comprende un adaptador extraíble que comprende una válvula deformable.

En algunas realizaciones, las aberturas del sistema pueden comprender, o estar conectadas a, un conjunto configurado para más de una trayectoria del flujo, por ejemplo, un conector en Y o similar. En algunas realizaciones, el conector en Y está configurado para permitir la obstrucción de una o ambas trayectorias del flujo tal como se desee, por ejemplo, mediante el pinzado de los lúmenes individuales o las trayectorias del flujo del conector en Y. En algunas realizaciones, el conector en Y comprende un conmutador situado en la unión de los recorridos del flujo común e individual del conector en Y de tal modo que pueden ser ajustados para permitir un flujo simultáneo a través de cada trayectoria del flujo, de una trayectoria individual del flujo, o para obstruir ambas trayectorias del flujo según se desee.

En algunas realizaciones, las aberturas del sistema pueden ser conectadas a conductos o tubos que permiten la comunicación fluida con uno o varios sistemas o subsistemas, al tiempo que mantienen un recorrido cerrado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el sistema -300- puede comprender opcionalmente una bolsa de residuos (no mostrada), un receptáculo de residuos (no mostrado), un conducto de residuos (no mostrado) y/o un recipiente de residuos (no mostrado). En ciertas de estas realizaciones, todos los subsistemas están en comunicación fluida entre sí. En otras realizaciones, ninguno de los subsistemas está en comunicación fluida con los otros. En una realización concreta, un subsistema está cerrado con respecto a los otros dos subsistemas, en la que los dos subsistemas están en comunicación fluida entre sí. Preferentemente, la totalidad del sistema, incluyendo los subsistemas, es flexible permitiendo que el sistema sea de cualquier tamaño o forma y que aloje una amplia gama de volúmenes. Alternativamente, la totalidad del sistema, los subsistemas y los componentes asociados pueden ser rígidos. O bien, algunos subsistemas y los componentes asociados pueden ser flexibles mientras que otros subsistemas y componentes asociados pueden ser rígidos.

La figura 13 muestra una realización a modo de ejemplo de un sistema -800- que comprende un sistema -300-1- en conexión fluida con otros sistemas y subsistemas. Tal como se muestra en la figura 13, las aberturas -400-1- y -500-1- pueden conectarse a una fuente de solución de lavado -810-1- y a una bolsa de residuos -820-1-, respectivamente. El sistema -300-1- puede ser conectado a un sistema similar -300-2- al tiempo que mantiene un recorrido cerrado. Se introduce tejido adiposo en las primeras y segundas cámaras de los sistemas -300-1- y -300-2-, tal como se ha descrito anteriormente en esta memoria, por ejemplo, a través de las aberturas de entrada/extracción de tejido -600-1- y -600-2- respectivamente. El tejido adiposo en el sistema -300-2- se utiliza para producir un injerto secado tal como se ha descrito anteriormente. El tejido adiposo en el sistema -300-1- es procesado para producir lipo-digestato o una población concentrada de células derivadas de las adiposas que comprende células regenerativas. La abertura -500-1- o una abertura alternativa (no mostrada) puede ser conectada a una fuente de solución, por ejemplo -810-1- configurada para la introducción aséptica de solución de lavado y/o de enzimas en la segunda cámara del sistema -300-1- para el aclarado y la digestión del tejido. La abertura -400-1- puede ser conectada a una bolsa de residuos -820-1-. El lipo-digestato de la primera cámara de -300-1- puede ser transferido asépticamente al tejido adiposo secado del interior de la primera cámara del sistema -300-2- a través de un conducto (no mostrado) que conecta las aberturas -600-1- y -600-12- al tiempo que mantiene el sistema cerrado.

Los sistemas dados a conocer en esta memoria pueden producir injertos e implantes de tejido adiposo que tienen cantidades de material no deseado, tal como glóbulos rojos, leucocitos y lípido significativamente menores que unas cantidades equivalentes de tejido adiposo del mismo sujeto en el mismo sitio en que han sido procesados mediante procedimientos tales como centrifugado y/o separación convencional por gravedad. En algunas realizaciones, los injertos de tejido adiposo producidos utilizando los sistemas dados a conocer en esta memoria tienen, por lo menos aproximadamente, menos de 1X, 2X, 3X, 4X, 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X (o cualquier número dentro de este margen) de leucocitos que los presentes en una unidad equivalente de tejido adiposo que ha sido escindido del mismo sujeto y en el mismo sitio y preparado utilizando un procedimiento de centrifugado, por ejemplo, en el que el tejido escindido es centrifugado en una centrífuga de ángulo fijo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los injertos de tejido adiposo producidos en los sistemas dados a conocer en esta memoria contienen menos del 75%, menos del 80%, menos del 85%, menos del 90%, menos del 95%, o menos, o cualquier porcentaje comprendido entre ellos, del número de leucocitos en una unidad equivalente de tejido adiposo del mismo individuo.

En algunas realizaciones, los injertos de tejido adiposo producidos utilizando los sistemas dados a conocer en esta memoria tienen por lo menos, aproximadamente menos de 1X, 2X, 3X, 4X, 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X (o cualquier número dentro de este margen) de glóbulos rojos que en una unidad equivalente de tejido adiposo que ha sido escindido del mismo sujeto en el mismo sitio y preparado utilizando un procedimiento de centrifugado, por ejemplo, en el que el tejido escindido es centrifugado en una centrífuga de ángulo fijo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los injertos de tejido adiposo producidos en los sistemas dados a conocer en esta memoria contienen menos del 75%, menos del 80%, menos del 85%, menos del 90%, menos del 95%, o menos, o cualquier porcentaje comprendido entre ellos, del número de glóbulos rojos en una unidad equivalente de tejido adiposo.

En algunas realizaciones, los injertos de tejido adiposo producidos utilizando los sistemas dados a conocer en esta memoria tienen, por lo menos, aproximadamente menos de 1X, 2X, 3X, 4X, 5X, 6X, 7X, 8X, 9X, 10X (o cualquier número dentro de este margen) de lípido que en una unidad equivalente de tejido adiposo que ha sido escindido del mismo sujeto y preparado utilizando un procedimiento de centrifugado, por ejemplo, en el que el tejido escindido es centrifugado en una centrífuga de ángulo fijo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los injertos de tejido adiposo producidos en los sistemas dados a conocer en esta memoria contienen menos del 75%, menos del 80%, menos del 85%, menos del 90%, menos del 95%, o menos, o cualquier porcentaje comprendido entre ellos, del porcentaje de contenido en lípido que en una unidad equivalente de tejido adiposo.

En adición a la capacidad de producir injertos de tejido adiposo con menos componentes no deseados, los injertos producidos mediante los sistemas dados a conocer en esta memoria pueden presentar asimismo características de hidratación que facilitan el suplementado con células regenerativas derivadas de las adiposas y/o la conservación del implante. Concretamente, el estado de hidratación de un injerto de tejido adiposo preparado tal como se ha descrito en esta memoria es de menos hidratación que un injerto de una unidad equivalente de tejido adiposo aislado del mismo sujeto en el mismo sitio y preparado utilizando solamente la separación por gravedad.

Un experto en la materia comprenderá, sin embargo que, en algunas realizaciones, los sistemas pueden ser diseñados con una bolsa flexible que no está compuesta de dos envolturas exteriores diferentes selladas entre sí, sino que es, más bien, una bolsa sin costuras. Un filtro puede estar sellado, unido o fijado en el interior de la bolsa sin costuras para definir un primer y un segundo subsistemas o cámaras en el interior de la bolsa.

En la figura 14 se muestra un dispositivo -100- a modo de ejemplo para producir los injertos grasos suplementados, reforzados o mejorados o los implantes de tejido adiposo dados a conocer en esta memoria. La figura 14A muestra una vista, en perspectiva, de un receptáculo -10- que incluye, por lo menos, dos cámaras -20-, -30-. Una cámara -20- puede ser utilizada para producir lipo-digestato a partir de tejido sin procesar. La segunda cámara -30- puede ser utilizada para recibir y almacenar tejido adiposo sin procesar para ser utilizado como el injerto graso en la generación del injerto de tejido adiposo suplementado.

En la realización mostrada en la figura 14, cada cámara -20-, -30- tiene una abertura de entrada -40-, -50- de tejido, configurada para recibir tejido adiposo sin procesar. Sin embargo, se comprenderá que, en algunas realizaciones, el receptáculo -10- tiene solamente una abertura de entrada de tejido. En algunas realizaciones, las aberturas de entrada de tejido -40-, -50- están configuradas para ser conectadas operativamente a una cánula (no mostrada) de tal modo que el lipoaspirado entra directamente en la cámara o cámaras -20-, -30- durante la liposucción. Por ejemplo, la abertura -40-, -50- de entrada del tejido puede estar acoplada a una cánula (no mostrada) mediante tubos para definir una línea de extracción de tejido. En algunas realizaciones, la cánula puede ser una cánula de liposucción integrada de un solo uso y los tubos pueden ser tubos flexibles. La cánula puede estar dimensionada para ser introducida en un sujeto con el fin de extraer tejido adiposo del sujeto. Los tubos utilizados en el sistema deben poder resistir la presión negativa asociada a la lipoplastia asistida por aspiración para reducir la posibilidad de un aplastamiento. Un dispositivo de aspiración (no mostrado) tal como una jeringa o un aspirador eléctrico, entre otras cosas, puede estar acoplado al receptáculo -10- y configurado para proporcionar una presión negativa suficiente para aspirar tejido de un sujeto.

Las cámaras -20-, -30- del receptáculo -10- pueden estar separadas físicamente una de otra, de tal modo que el flujo de contenidos de una cámara -20- (por ejemplo, la cámara que contiene lipo-digestato) hacia la otra cámara -30- (por ejemplo, la cámara que contiene el injerto graso) está controlado. En algunas realizaciones, las cámaras están en conexión fluida, por ejemplo, a través de una abertura que puede ser sellada, para asegurar la circulación de los contenidos de una cámara a la otra solamente cuando se desee. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el flujo de los contenidos de una cámara -20- a otra cámara -30- se produce a través de un conducto. El conducto opcional puede incluir una o varias pinzas (no mostradas) para controlar el flujo de material entre los diversos componentes del sistema. Las pinzas pueden ser utilizadas para mantener la esterilidad del sistema mediante el sellado efectivo de diferentes zonas del sistema. Alternativamente, los conductos opcionales pueden incluir una o varias válvulas que controlan el flujo de material a través del sistema. Las válvulas pueden ser válvulas electromecánicas de presión, válvulas neumáticas, válvulas hidráulicas o válvulas mecánicas. En algunas realizaciones, las válvulas pueden ser activadas o accionadas mediante un sistema de control que puede estar acoplado a palancas. Las palancas pueden ser manipuladas manualmente y/o automáticamente, por ejemplo mediante un dispositivo de procesamiento que puede activar las válvulas en condiciones de activación predeterminadas. En ciertas realizaciones automatizadas, la

activación de las válvulas puede ser parcialmente automatizada y estar parcialmente sometida a las preferencias del usuario, de tal modo que el proceso puede ser optimizado. En otras realizaciones más, ciertas válvulas pueden ser activadas manualmente y otras automáticamente a través de un dispositivo de procesamiento. Las válvulas pueden ser utilizadas asimismo conjuntamente con una o varias bombas, por ejemplo, bombas peristálticas o bombas volumétricas (no mostradas). Los conductos y/o las válvulas pueden incluir asimismo sensores, tales como sensores ópticos, sensores ultrasónicos, sensores de presión o similares, que son capaces de distinguir entre los diversos componentes del fluido y los niveles del fluido que fluyen por el sistema.

En algunas realizaciones, una o ambas cámaras pueden incluir una o varias aberturas -60- para la extracción de residuos, por ejemplo, solución fisiológica, adipocitos maduros, glóbulos rojos y similares, para la adición de componentes, por ejemplo solución de lavado, enzimas, células y similares o para una entrada de aire o una salida de ventilación. En algunas realizaciones, la cámara -30- puede incluir una abertura o salida -70- configurada para la extracción aséptica del injerto graso suplementado. La salida -70- puede estar estructurada para hacer pasar la composición (por ejemplo, injerto graso suplementado) desde la cámara -30- a un sujeto en condiciones apropiadas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se puede utilizar una jeringa para retirar la composición, y la salida -70- puede alojar la aguja de la jeringa sin poner en riesgo la esterilidad del sistema o de la composición. En realizaciones adicionales, la salida puede estar acoplada a un dispositivo que está configurado para administrar la composición, pero no para retirar la composición, tal como una cánula que administra la composición mediante la aplicación de una presión positiva para desplazar la composición a través de la cánula. En consecuencia, la salida -70- puede estar configurada para permitir que la composición contenida en la cámara -30- pase a la cánula (no mostrada). En otras realizaciones, la salida -70- puede comprender, o estar acoplada en un modo de un sistema cerrado al dispositivo para administrar la composición tal como una jeringa o una cánula para administrar la composición mediante la aplicación de una presión positiva.

En algunas realizaciones, una o ambas cámaras -20-, -30- del receptáculo -10- pueden estar configuradas para recibir asépticamente soluciones y agentes, tales como soluciones de lavado (solución fisiológica, y similares), agentes de desagregación, u otros agentes o aditivos. El dispositivo puede incluir recipientes configurados para mantener su contenido en condiciones de esterilidad, por ejemplo, una bolsa plegable, tal como una bolsa IV utilizada en instalaciones clínicas. Estos recipientes pueden tener conductos acoplados a una o a ambas cámaras -20-, -30-. Por ejemplo, el dispositivo puede estar configurado de tal modo que un recipiente que contenga un agente de aclarado o de lavado (por ejemplo, PBS, PLASMALYTE®, NORMOSO®, o solución de lactato de Ringer) pueda ser suministrado asépticamente a la cámara -20- y a la cámara -30-. En algunas realizaciones, el dispositivo -100- puede estar configurado de tal modo que un recipiente que contenga el agente de desagregación acoplado al receptáculo -10- suministre el agente o agentes de desagregación al interior de la cámara -20-. Las soluciones y los agentes pueden ser suministrados al interior de las cámaras -20-, -30- del receptáculo mediante cualquier modo reconocido por la técnica, incluyendo la presión de la gravedad aplicada al exterior de los recipientes, o mediante la colocación de una bomba volumétrica en los conductos. En realizaciones automatizadas, un dispositivo de procesamiento calcula varios parámetros, por ejemplo, el volumen de solución fisiológica y el tiempo y el número de ciclos requeridos para el lavado, así como la concentración o la cantidad de agente de desagregación y el tiempo requerido para la desagregación en base a la información introducida inicialmente por el usuario (por ejemplo, el volumen de tejido a procesar). Alternativamente, las cantidades, tiempos, etc. pueden ser manipulados manualmente por el usuario. En algunas realizaciones, el dispositivo está configurado para agitar o sacudir una o ambas cámaras del receptáculo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el dispositivo comprende una plataforma -80- de movimiento orbital configurada para agitar el contenido de la cámara -20- durante el proceso de desagregación.

Los componentes del receptáculo -10- pueden estar fabricados de materiales que no reaccionan con los tejidos o fluidos biológicos y no reaccionan con los agentes utilizados en el procesamiento de tejidos y fluidos biológicos. Además, los materiales de los que están fabricados los diversos componentes deben poder resistir la esterilización, tal como la realizada mediante autoclave e irradiación, incluyendo pero no limitada a la radiación beta o gamma. En algunas realizaciones, el receptáculo está fabricado de materiales desechables. En algunas realizaciones, el receptáculo puede estar fabricado de material no desechable, que puede ser utilizado más de una vez. A modo de ejemplo, la tubería y la empuñadura de la cánula pueden estar fabricadas de cualquier material adecuado tal como polietileno. La cánula puede estar fabricada de acero inoxidable. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el receptáculo está fabricado de policarbonato acrílico, ABS, acetato de etileno vinilo, o copolímeros de estireno butadieno (SBC). El recorrido del fluido del dispositivo está preferentemente libre de pirógenos, es decir, adecuado para su utilización en sangre sin riesgo de transmisión de enfermedades. En algunas realizaciones, el receptáculo -10- está fabricado de un material que permite que el usuario determine visualmente el volumen aproximado de tejido presente en la cámara.

En algunas realizaciones, el dispositivo incluye uno o varios dispositivos de control de la temperatura (no mostrados) que están posicionados para ajustar la temperatura del material contenido en el interior de una o varias cámaras -20-, -30- del sistema. El dispositivo de control de la temperatura puede ser un calentador, un refrigerador o ambas cosas, es decir, puede ser capaz de cambiar entre calentar y enfriar. El dispositivo de la temperatura puede ajustar la temperatura de cualquiera de los materiales que pasan a través del dispositivo -100-, incluyendo los agentes de desagregación, los agentes de re-suspensión, los agentes de aclarado, los agentes de lavado o los aditivos. Por ejemplo, el calentamiento del tejido adiposo facilita su desagregación mientras que el enfriamiento de la salida de

células regenerativas es deseable para mantener su viabilidad. Asimismo, si son necesarios agentes calentados previamente para un óptimo procesamiento del tejido, el papel del dispositivo de la temperatura sería el de mantener la temperatura predeterminada más que aumentar o disminuir la temperatura.

5 En algunas realizaciones, el dispositivo -100- puede ser automatizado. En algunas realizaciones, el dispositivo -100- puede incluir un dispositivo de procesamiento (por ejemplo, un microprocesador o un ordenador personal) y programas de software asociados para proporcionar el control lógico del sistema para operar y para automatizar una o varias etapas del proceso en base a entradas del usuario. En ciertas realizaciones, uno o varios aspectos del sistema pueden ser programables por el usuario a través del software residente en el dispositivo de procesamiento.

10 El dispositivo de procesamiento puede tener uno o varios programas de software preprogramados en la memoria de solo lectura (ROM). Por ejemplo, el dispositivo de procesamiento puede tener software preprogramado a medida para el procesamiento de la sangre, otro programa para procesar tejido adiposo para obtener pequeños volúmenes de células regenerativas y otro programa para procesar tejido adiposo para obtener grandes volúmenes de células regenerativas. El dispositivo de procesamiento puede tener asimismo un software preprogramado que proporcione al usuario los parámetros apropiados para optimizar el proceso en base a la entrada por el usuario de información pertinente tal como la cantidad de células regenerativas requeridas y diversas manipulaciones post-proceso, etc.

20 En algunas realizaciones, el software puede automatizar etapas tales como el control de la entrada y la salida de fluidos y tejidos a lo largo de ciertas trayectorias de los tubos mediante el control de las bombas y las válvulas del sistema; el control de la secuencia adecuada y/o la dirección de activación; la detección de bloqueos con sensores de presión; mecanismos de mezclado, la medición de la cantidad de tejido y/o de fluido a desplazar a lo largo de un recorrido concreto utilizando mecanismos volumétricos, el mantenimiento de las temperaturas de los diversos componentes utilizando dispositivos de control del calor; y la integración del proceso de desagregación con mecanismos de temporización y software.

Los siguientes ejemplos se facilitan para demostrar situaciones particulares y ajustes en los que esta tecnología puede ser aplicada y no están previstos para limitar el alcance de la invención y de las reivindicaciones incluidas en esta descripción. Un cierto número de publicaciones y de patentes han sido citadas anteriormente en esta memoria.

30 El siguiente ejemplo compara la pureza y la hidratación de los injertos de tejido adiposo obtenidos utilizando el sistema dado a conocer en esta memoria con unidades equivalentes de tejido adiposo sin procesar, y con unidades equivalentes de injertos de tejido adiposo producido mediante separación por gravedad y centrifugado.

35 EJEMPLO 1

El tejido adiposo aspirado fue recogido en instalaciones clínicas o bien mediante procedimientos de liposucción (N = 5), láser (N = 3) o la recogida en el cuerpo mediante chorro de agua (N = 2) en 10 sujetos humanos (N = 10). Las muestras de tejido aspirado fueron divididas aleatoriamente en cuatro grupos: (1) control; (2) separación por gravedad; (3) centrifugado; y (4) preparación de injertos de tejido con PUREGRAFT™. Las muestras de control fueron analizadas directamente sin manipulación adicional. Las muestras del grupo de separación por gravedad fueron dejadas aparte en una jeringa de 60 ml durante diez minutos. La porción fluida de las muestras fue desechada y el tejido adiposo restante fue analizado. En el caso del grupo de la centrifugación, las muestras fueron cargadas en una jeringa con tapa de 10 ml colocada en una centrífuga IEC de ángulo de rotor fijo y centrifugadas a 3.000 rpm (\approx 1.200 g) durante 3 minutos. El lípido libre en la parte superior del tejido adiposo fue extraído por aspiración y el que flotaba debajo fue vaciado después del centrifugado y se analizó el tejido restante del injerto. Las muestras del grupo PUREGRAFT™ fueron lavadas en un sistema -300- descrito anteriormente en esta memoria (PureGraft™). En resumen, el tejido fue introducido en la primera cámara del sistema -300- tal como se ha descrito anteriormente. El tejido fue lavado con 2X 150 ml de solución de lactato de Ringer. Se dejó que escurriera el exceso de fluido y el lípido de la segunda cámara del sistema. El tejido seco fue extraído a través de la abertura de entrada del tejido y fue utilizado para el análisis resultante.

Los tejidos del injerto de cada uno de los cuatro grupos fueron centrifugados a continuación a 400 g durante cinco minutos en tubos cónicos de 15 ml por triplicado con el objeto de separar los injertos en cuatro componentes; lípido libre, tejido adiposo, líquido y un nódulo de células que comprende glóbulos rojos y leucocitos. Los volúmenes de la capa de lípido y de la capa líquida fueron anotados y calculados como porcentaje total del injerto de tejido. Se midió el volumen de la capa de lípido y de la capa de líquido de cada muestra, y fue utilizado para calcular el contenido de líquido y el contenido de lípido de las diferentes preparaciones. Tal como se muestra en la figura 15, el tejido adiposo preparado utilizando los procedimientos y sistemas descritos en esta memoria (PureGraft) tenía un contenido de agua significativamente menor si se compara con el tejido adiposo sin procesar (Control), o el tejido adiposo procesado mediante un procedimiento convencional por gravedad (Gravedad). Concretamente, el contenido medio de líquido del tejido preparado utilizando el sistema de la presente invención fue de $9,3 \pm 0,9\%$. Esto era significativamente más bajo ($p < 0,001$) que el tejido preparado mediante separación por gravedad ($25,1 \pm 1,8\%$). Tal como se muestra en la figura 16, el tejido adiposo preparado utilizando los procedimientos y sistemas descritos en esta memoria (PureGraft) tenía un contenido significativamente más bajo en % (v/v) de lípido comparado con el tejido adiposo sin procesar (Control), el tejido adiposo preparado mediante un procedimiento convencional por

- 5 gravedad (Gravedad) y el tejido adiposo preparado mediante un procedimiento convencional por centrifugado (Centrifugado). Concretamente, el nivel residual de lípido libre en las muestras preparadas utilizando el sistema de la presente invención tenía una media de $0,8 \pm 0,3\%$ de lípido libre comparado con el tejido de control (sin manipular) ($11,5 \pm 1,5\%$, $p < 0,001$), la separación por gravedad ($8,9 \pm 1,3\%$, $p < 0,001$), y el centrifugado ($9,6 \pm 1,8\%$, $p < 0,001$). Se debe observar que el contenido en lípido libre observado en los injertos preparados por centrifugación (promedio de $9,6\%$ en volumen del injerto) fue medido *después* de la extracción del lípido libre observado durante la preparación inicial del tejido. Es decir, el lípido libre evidente después de la separación del injerto en sus partes componentes es liberado de nuevo. Esto indica que el material del injerto preparado por centrifugado contenía adipocitos dañados que liberaron su lípido durante el segundo centrifugado aplicado para separar el injerto en sus
- 10 cuatro partes componentes. El hecho de que la aplicación de la etapa del mismo segundo centrifugado a los injertos preparados con el del sistema de la presente invención revelara un porcentaje marcadamente menor de lípido libre ($0,8\%$ en volumen comparado con $9,6\%$) demuestra que los injertos preparados con el sistema de la presente invención contenían menos adipocitos dañados.
- 15 Para evaluar la pureza del injerto, se extrajeron muestras de los tubos de cada tejido del injerto y se analizó el contenido en sangre, contando los glóbulos rojos y los leucocitos por gramo de tejido con un contador Coulter. Los datos fueron normalizados a grupos de control y expresados como un porcentaje relativo del contenido tanto de RBC (glóbulos rojos) como de WBC (leucocitos) por gramo de tejido del injerto sin procesar. Todos los datos fueron expresados como promedio \pm SEM. Se utilizó el ensayo de la t de Student para comparar las diferencias entre cada
- 20 procedimiento de preparación del injerto. Los datos mostrados en la figura 17 muestran que el tejido adiposo preparado utilizando los procedimientos y sistemas dados a conocer en esta memoria (PureGraft) tenían significativamente menos glóbulos rojos (RBC) por gramo de tejido, comparado con el tejido adiposo sin procesar (Control), el tejido adiposo preparado mediante un procedimiento convencional por gravedad (Gravedad) y el tejido adiposo preparado mediante un procedimiento convencional de centrifugado (Centrifugado). De este modo, mientras que la separación por gravedad y el centrifugado eliminó $47,8 \pm 7,0\%$ y $53,2 \pm 5,4\%$ de glóbulos rojos respectivamente, la preparación utilizando el sistema de la presente invención eliminó el $98,1 \pm 0,01\%$ de glóbulos rojos del injerto. De manera similar, el contenido en leucocitos se redujo en un $58,7 \pm 13,7\%$ por gravedad, el $69,7 \pm 5,2\%$ por centrifugado y un $96,8 \pm 0,01\%$ utilizando el sistema de la presente invención.
- 25 La presencia de agua, lípido, adipocitos maduros y células sanguíneas puede conducir a la pérdida de volumen del injerto a lo largo del tiempo. Los datos mostrados en las figuras 15 a 17 demuestran que los sistemas descritos en esta memoria son útiles para la preparación de injertos o implantes de tejido adiposo secado o deshidratado.
- 30 Los siguientes ejemplos describen la fabricación de un implante o un injerto de tejido adiposo suplementado con células regenerativas derivadas de las adiposas mediante los procedimientos descritos en esta memoria.
- 35

EJEMPLO 2

- 40 Se identifica un paciente que necesita o desea un implante de pecho. Se extrae una unidad de tejido adiposo del paciente y se la dispone en una unidad de procesamiento de células madre derivadas de células adiposas que, preferentemente, mantiene un recorrido cerrado del fluido estéril y del tejido. Por ejemplo, una cánula está conectada a un recipiente o cámara (por ejemplo, una bolsa flexible) de recogida del tejido de la unidad de procesamiento de células madre derivadas de las adiposas, al tiempo que mantiene estéril el recorrido del fluido y del tejido. La liposucción se lleva a cabo mediante técnicas establecidas para la extracción de tejido adiposo del
- 45 sujeto, y el tejido adiposo sin procesar extraído es arrastrado al recipiente/cámara de recogida de tejido. Una primera porción del tejido es aclarada con PBS hasta que sustancialmente toda la solución fisiológica, los glóbulos rojos, los adipocitos maduros son extraídos (por ejemplo, con lavados sucesivos hasta que el tejido no es visiblemente de color rojo), y el efluente del lavado, por ejemplo, la solución fisiológica, los glóbulos rojos, los adipocitos maduros, son extraídos asépticamente a través de una abertura que está unida al recipiente o cámara de recogida de tejido, al
- 50 tiempo que mantiene estéril el recorrido cerrado del fluido y del tejido. En algunas realizaciones, la abertura de los residuos está conectada a un recipiente de recogida de residuos mediante un conducto y el recipiente de recogida de residuos puede estar configurado para estar sujeto a una fuente de vacío y el conducto y/o el recipiente de recogida de residuos puede tener una o varias válvulas. La primera porción de tejido adiposo lavado puede ser almacenada a continuación en el recipiente/cámara de recogida de tejido o transferida a un recipiente de
- 55 almacenamiento o una cámara para un procesamiento posterior.
- Una segunda porción de la unidad de tejido adiposo es aclarada en una segunda cámara con PBS hasta que sustancialmente el tejido ya no es visiblemente de color rojo tal como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, el tejido adiposo obtenido por liposucción es aclarado y lavado, tal como se ha descrito
- 60 anteriormente, y posteriormente es dividido en una primera y una segunda porción. La primera porción es conservada para ser utilizada como el sustrato para la adición de células regenerativas derivadas de las adiposas y la segunda porción es utilizada para crear una suspensión de células regenerativas derivadas de las adiposas de la forma siguiente. Una solución enzimática que comprende colagenasa es añadida asépticamente a la segunda porción del tejido, al tiempo que mantiene estéril el recorrido cerrado del fluido/tejido. El tejido es incubado mientras
- 65 es agitado a 37°C durante aproximadamente 1 hora. Se deja que la mezcla se pose, de tal modo que la solución de lipo-digestato y células regenerativas derivadas de las adiposas se separa físicamente del tejido adiposo sin digerir y

del lípido. El lipo-digestato creado a partir de la segunda porción de tejido adiposo es extraído a través de un conducto a la vez que mantiene estéril el recorrido del fluido/tejido.

5 El lipo-digestato separado es bombeado a continuación a través de un conducto que está conectado con la primera cámara mediante un recorrido cerrado. El lipo-digestato es bombeado sobre y a través de la primera porción de tejido adiposo sin procesar en la primera cámara. El componente no celular del lipo-digestato circula a través de la primera porción de tejido adiposo sin procesar hacia un recipiente de residuos a la vez que mantiene estéril el recorrido cerrado del fluido/tejido. El lipo-digestato puede ser filtrado a través de la primera porción del tejido adiposo sin procesar utilizando la gravedad o una fuente de aspiración. En algunas realizaciones, el lipo-digestato puede ser depositado en
10 capas en la parte superior de la primera porción del tejido adiposo sin procesar y las células regenerativas derivadas de las adiposas presentes en el lipo-digestato pueden ser obligadas a pasar a la matriz de la primera porción de tejido adiposo sin procesar utilizando centrifugado (por ejemplo, una cesta de centrifugación a 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 o 800 g). Las células regenerativas derivadas de las adiposas del lipo-digestato son unidas mediante los fragmentos de tejido conectivo, produciendo un injerto graso suplementado con células regenerativas derivadas de las adiposas.
15 El injerto graso suplementado o reforzado puede ser a continuación proporcionado al sujeto con o sin una cubierta absorbible o un material capsular que tenga la forma de un pecho humano.

EJEMPLO 3

20 Se prepara un injerto graso suplementado con células regenerativas derivadas de las adiposas, tal como se describe en el Ejemplo 1. El injerto graso suplementado con células regenerativas derivadas de las adiposas es aplicado al rostro, glúteos, pecho o pantorrillas de un sujeto o para corregir cualquier defecto del tejido blando.

EJEMPLO 4

25 Se identifica un paciente que necesita o desea un implante graso. Se extrae una unidad de tejido adiposo del paciente tal como se ha descrito en esta memoria o como es conocido en la técnica. Para optimizar el injerto, el sistema -300- está orientado y una bolsa de residuos (no mostrada) conectada al sistema, ha sido dejada en el suelo. El tejido adiposo es introducido en el sistema -300- a través de la abertura -600- de acceso al tejido que
30 proporciona la comunicación entre el entorno exterior y el interior del primer subsistema. Una jeringa Toomey u otra jeringa conocida en la técnica puede ser utilizada para inyectar el lipo-aspirado a través de la abertura. Esto se puede repetir hasta que se haya añadido la cantidad deseada de tejido, teniendo cuidado de no sobrepasar el volumen máximo del primer subsistema. Una vez añadido el lipo-aspirado, se cierra la pinza de presión del tubo de vaciado (no mostrado). Se introduce en el sistema -300- una solución de lavado y/o de aclarado tal como la solución de lactato de Ringer o una solución fisiológica abriendo la mordaza (no mostrada) a través de una abertura o por
35 medio de una tubería IV estéril. La cantidad de la solución de lavado o de aclarado a añadir puede variar. En general, se introduce suficiente solución de lavado en el sistema, de tal modo que la mayor parte del lipo-aspirado u otro tejido en el primer subsistema quede sumergido. Se añaden 150 ml de una solución de lavado tal como de la solución de lactato de Ringer. A continuación se cierra la mordaza y se agita manualmente el sistema durante un
40 breve periodo de tiempo, por ejemplo 15 segundos. La agitación puede ser en forma de inversión, rotación, oscilación, etc. El sistema se agita mediante medios externos tales como una plataforma agitadora un agitador orbital, etc. Una vez el tejido ha sido lavado a fondo (tal como se determina mediante observación o después de un intervalo de tiempo preestablecido), se abre una válvula de presión para el vaciado (no mostrada) o una abertura y bajo la fuerza gravitatoria el efluente pasa a través del material filtrante -320- y de la pantalla de separación -330-.
45 Se deja que el efluente se vacíe durante un periodo de tiempo, por ejemplo de 3 minutos. Este ciclo puede ser repetido un cierto número de veces. El ciclo se puede repetir hasta un total de cuatro lavados. Después del último ciclo de lavado, se debe dejar que el residuo escurra de cinco a diez minutos. En general, el vaciado máximo de los fluidos residuales se produce después de unos 10 minutos de escurrido. En consecuencia, se crea un injerto graso lavado y secado que está sustancialmente libre de sangre, de fluido tumesciente y de lípido libre sin necesidad de
50 equipos mecánicos y en un sistema cerrado estéril que es fácil de manipular. Asimismo, este proceso puede ser completado en un tiempo tan corto como 20 minutos y el cirujano puede controlar el nivel de hidratación deseado mediante la modificación del tiempo que se deja que escurra el sistema durante la etapa final.

55 Si se desea enriquecer el injerto graso obtenido utilizando el sistema -300- con células regenerativas derivadas de las adiposas (ADRCs), la ADRC obtenida por cualquiera de los procedimientos descritos en esta memoria o conocidos en la técnica (tales como mediante la utilización del sistema CELUTION®), puede ser añadida a través de una abertura cerca de la bolsa de solución de lactato de Ringer y acelerada con solución de lactato de Ringer u otra solución adecuada durante 5 segundos o más. El sistema puede ser agitado a continuación tal como se ha descrito en esta memoria durante, por ejemplo, 15 segundos y el injerto graso mejorado de ADRC puede ser inyectado a
60 continuación o colocado de nuevo en el paciente según se precise.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo (300) para la preparación de tejido para un injerto de tejido adiposo, que comprende:

5 una bolsa flexible, plegable (200) que tiene una primera cámara (280) y una segunda cámara (290) que están definidas por medio de un filtro (210) que tiene poros;

10 un separador situado en el interior de la segunda cámara (290), en que dicho separador (330) tiene una pantalla de separación (330) que tiene poros que son mayores que los poros del filtro; y en el que dicho separador define una tercera cámara en el interior de la segunda cámara (290), y en el que los poros de dicho separador tienen aproximadamente de 300 a 30.000 micras, y en el que el separador tiene uno o varios nervios, tirantes y otras características que crean un espacio entre la envoltura exterior (340) y el filtro;

15 una abertura de entrada (220) conectada a la bolsa flexible, plegable (200) en el que dicha abertura de entrada está configurada para permitir la introducción aséptica de tejido adiposo en la primera cámara (280); y una abertura de salida (240) conectada a la bolsa flexible plegable, en el que la abertura de salida (240) está configurada para extraer asépticamente líquido y células de la segunda cámara (290).

20 2. Dispositivo, según la reivindicación 1, en el que el separador es una estructura porosa que flota libremente en el interior de dicha segunda cámara (290).

3. Dispositivo (300), según la reivindicación 2, en el que la bolsa comprende una primera envoltura exterior (310) y una segunda envoltura exterior (340) unidas por medio de un doble sellado por calor (311).

25 4. Dispositivo (300), según la reivindicación 3, en el que el filtro (210) está unido a la primera envoltura exterior (340) y a la segunda envoltura exterior (340) por medio de un doble sellado por calor.

30 5. Dispositivo (300), según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que el separador (330) comprende un material de absorción de lípido.

6. Dispositivo (300), según la reivindicación 5, en el que dicho material de absorción de lípido es una pantalla de malla de poliéster.

35 7. Dispositivo (300), según la reivindicación 1, en el que el tamaño del poro del separador (330) es mayor o igual aproximadamente a 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces el tamaño del poro de dicho filtro.

8. Dispositivo (300), según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la abertura de entrada (220) está configurada para ser fijada a una cánula, al tiempo que mantiene estéril el recorrido del fluido/tejido.

40 9. Dispositivo (300), según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un segundo dispositivo, en el que dicho segundo dispositivo está fijado al primer dispositivo (300) y en el que el segundo dispositivo comprende un dispositivo que tiene la misma estructura del dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

45 10. Dispositivo (300), según la reivindicación 9, en el que el segundo dispositivo está conectado al dispositivo (300) de las reivindicaciones 1 a 8 mediante un conducto que está configurado para transferir células regenerativas aisladas derivadas de las adiposas desde dicho segundo dispositivo a la primera cámara (280) del dispositivo de las reivindicaciones 1 a 8.

50 11. Procedimiento para producir un injerto de tejido adiposo, que comprende:

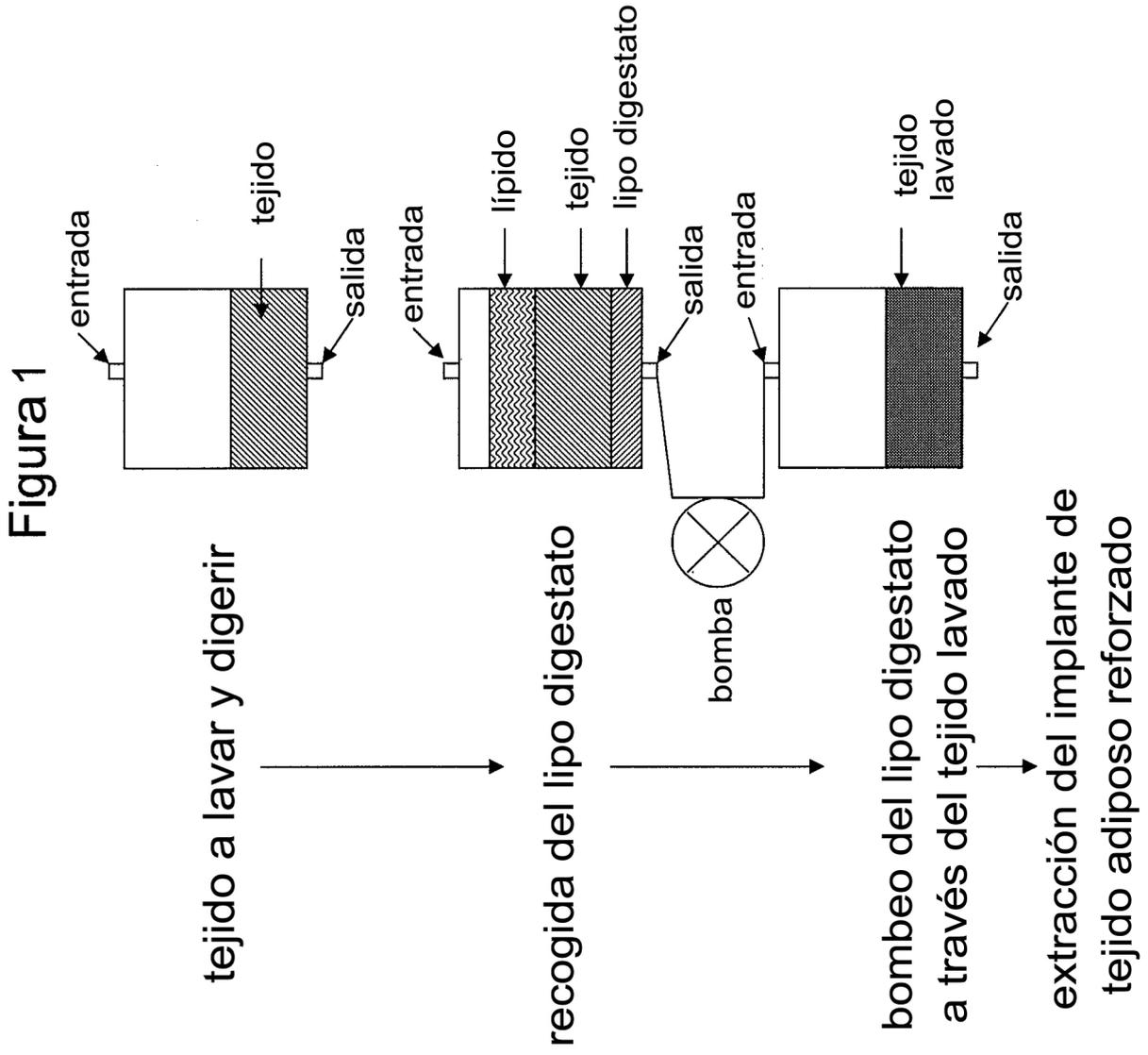
(a) introducir una primera porción de un tejido adiposo sin procesar en la primera cámara (280) de un primer dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8;

55 (b) aclarar la primera porción de tejido adiposo sin procesar mediante la adición de una solución fisiológica de lavado a la primera cámara (280); y

60 (c) extraer fluido de la segunda cámara (290) del primer dispositivo, en el que el fluido es seleccionado de entre el grupo compuesto de agua, solución fisiológica de lavado, sangre y lípido libre, o cualquier combinación de los mismos, secando de este modo el tejido adiposo.

12. Procedimiento, según la reivindicación 11, que comprende además aislar una población de células regenerativas derivadas de las adiposas de una segunda porción de tejido adiposo y poner en contacto el tejido adiposo deshidratado de (c) con la población aislada de células regenerativas derivadas de las adiposas en unas condiciones que permiten que la población aislada de células regenerativas derivadas de las adiposas atraviese por permeación el tejido adiposo secado de (c).

- 5 13. Procedimiento, según la reivindicación 12, en el que dicha población aislada de células regenerativas derivadas de las adiposas es preparada en un segundo dispositivo, teniendo dicho segundo dispositivo la misma estructura que el dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, mediante el contacto del tejido adiposo presente en dicha primera cámara (290) de dicho segundo dispositivo con colagenasa, en unas condiciones que liberan dichas células.
- 10 14. Procedimiento, según la reivindicación 13, en el que la etapa de puesta en contacto es realizada en el segundo dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, fijado al primer dispositivo (300).
15. Utilización del dispositivo (300) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para la preparación de una población aislada de células regenerativas derivadas de las adiposas.



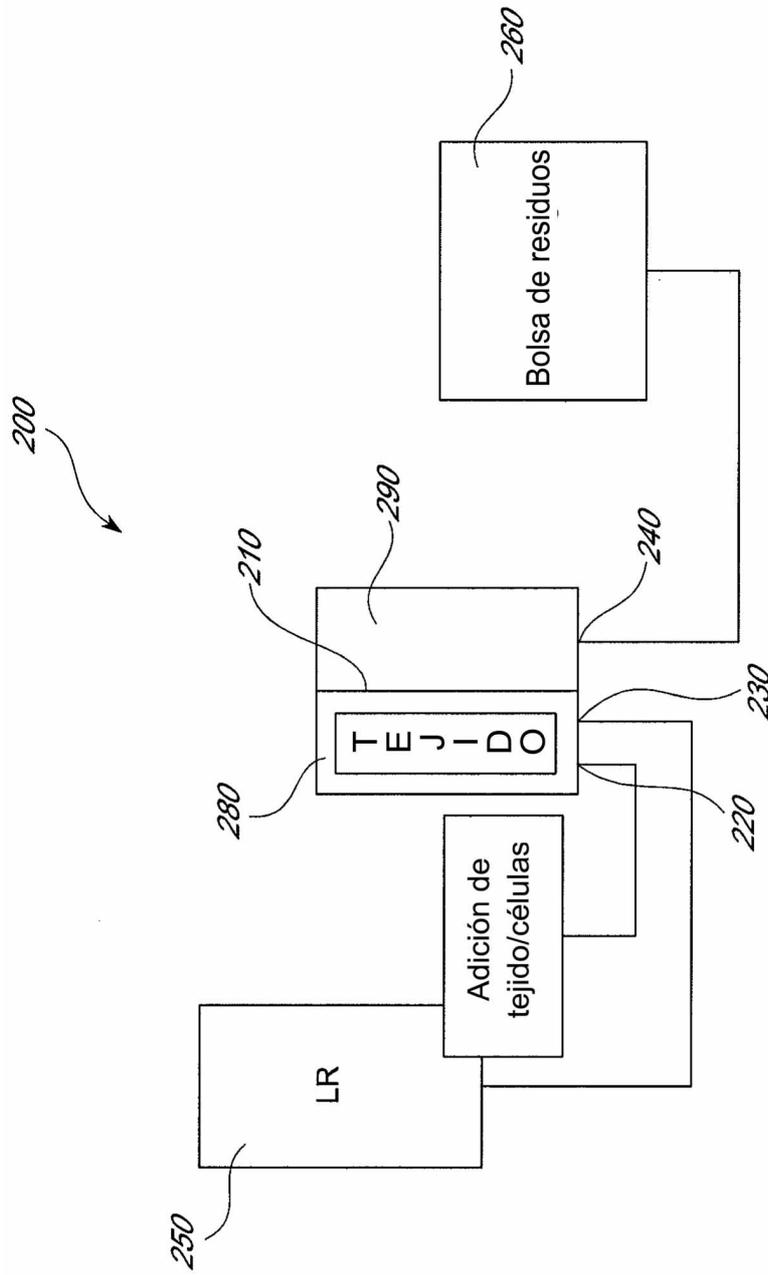


FIG. 2

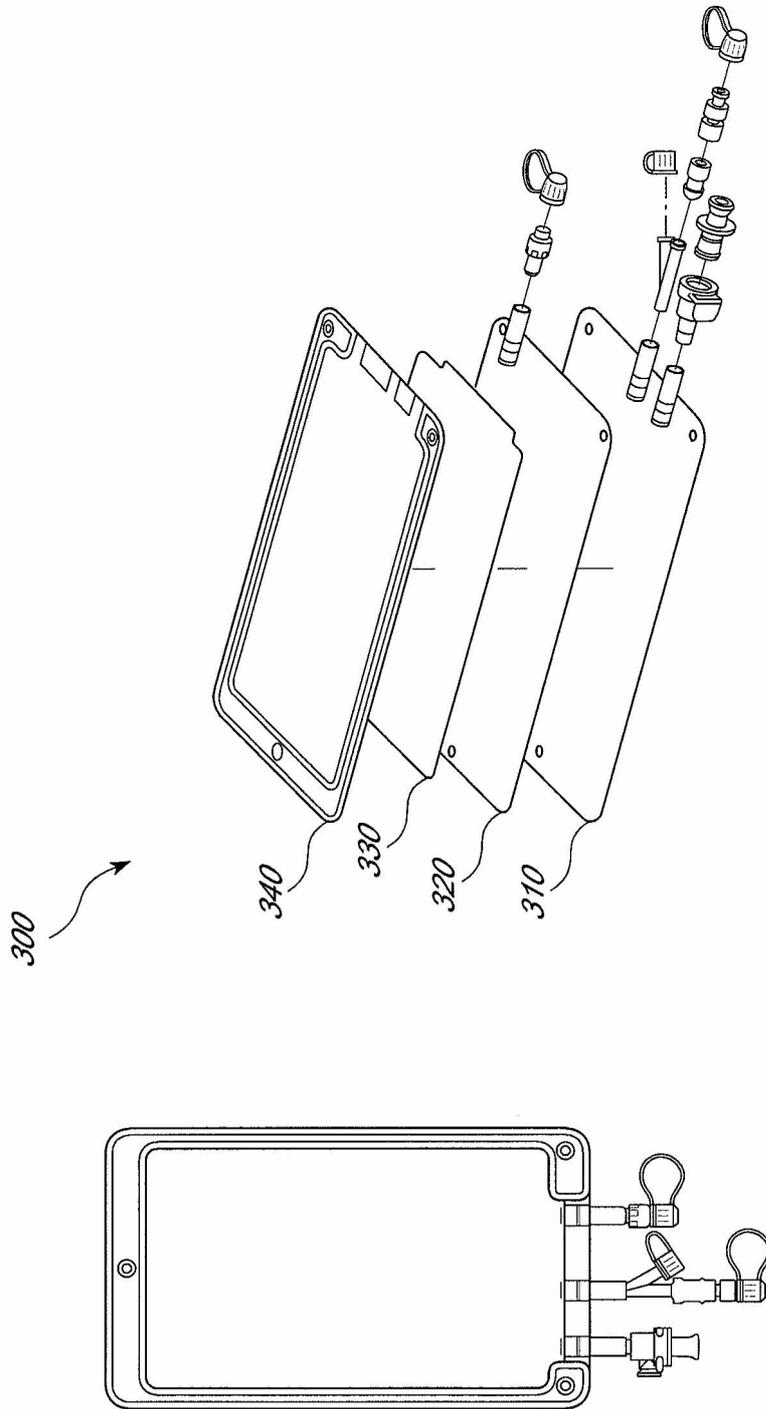


FIG. 3

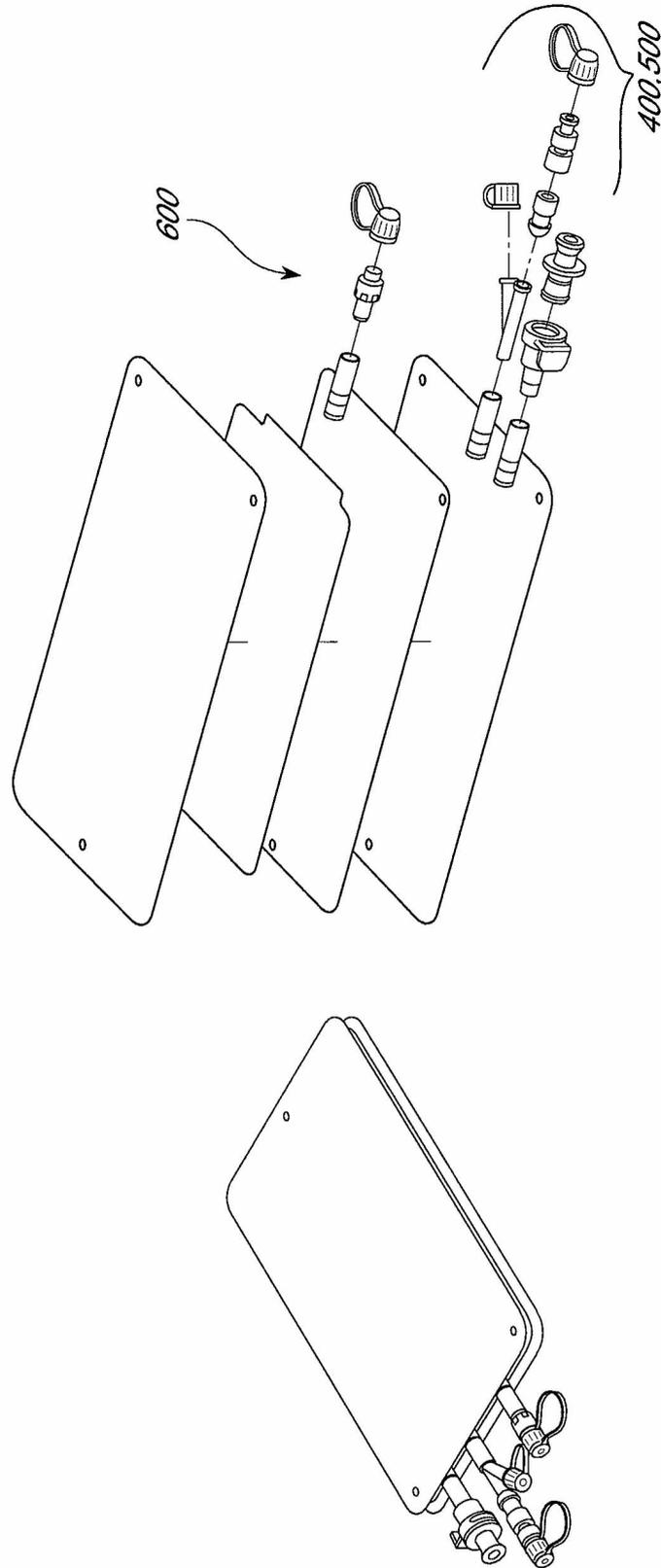


FIG. 4

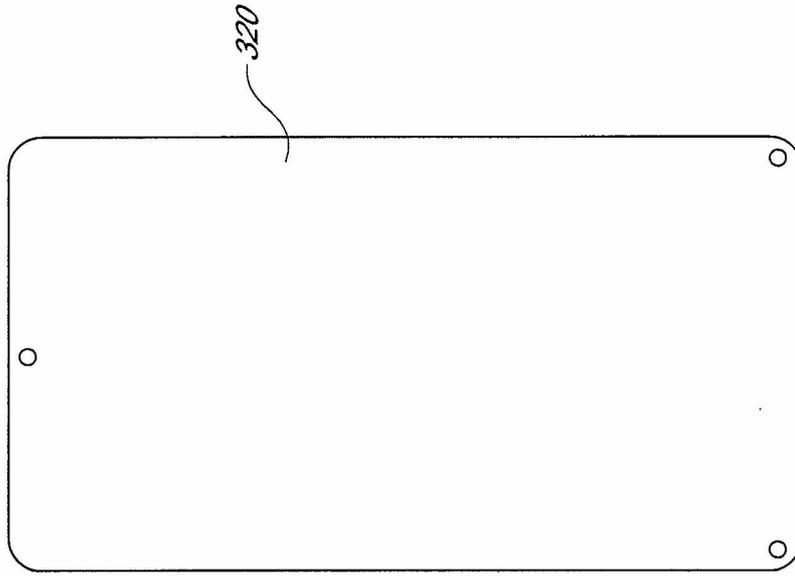


FIG. 6

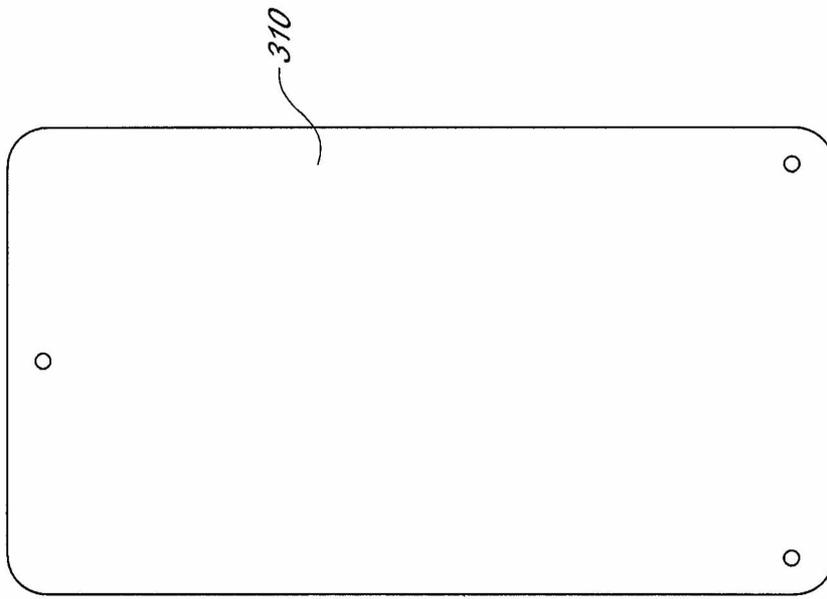


FIG. 5

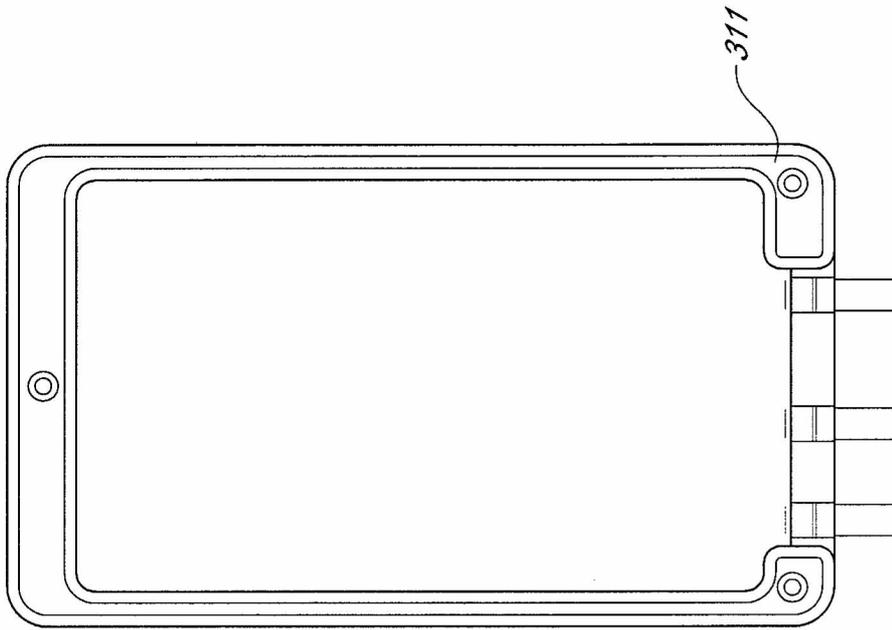


FIG. 8

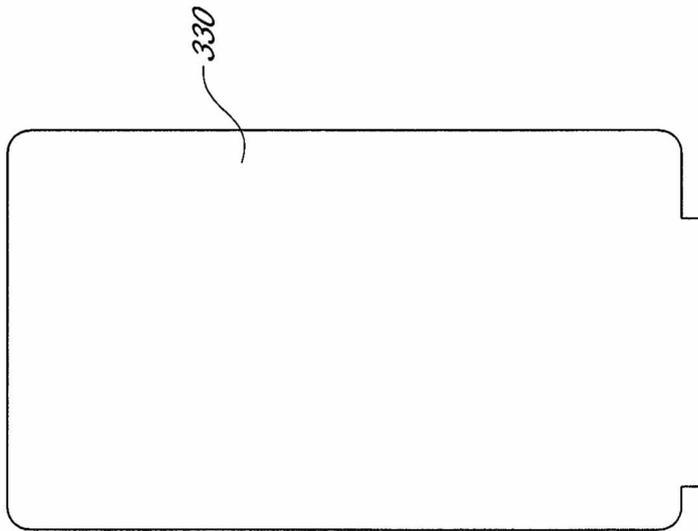
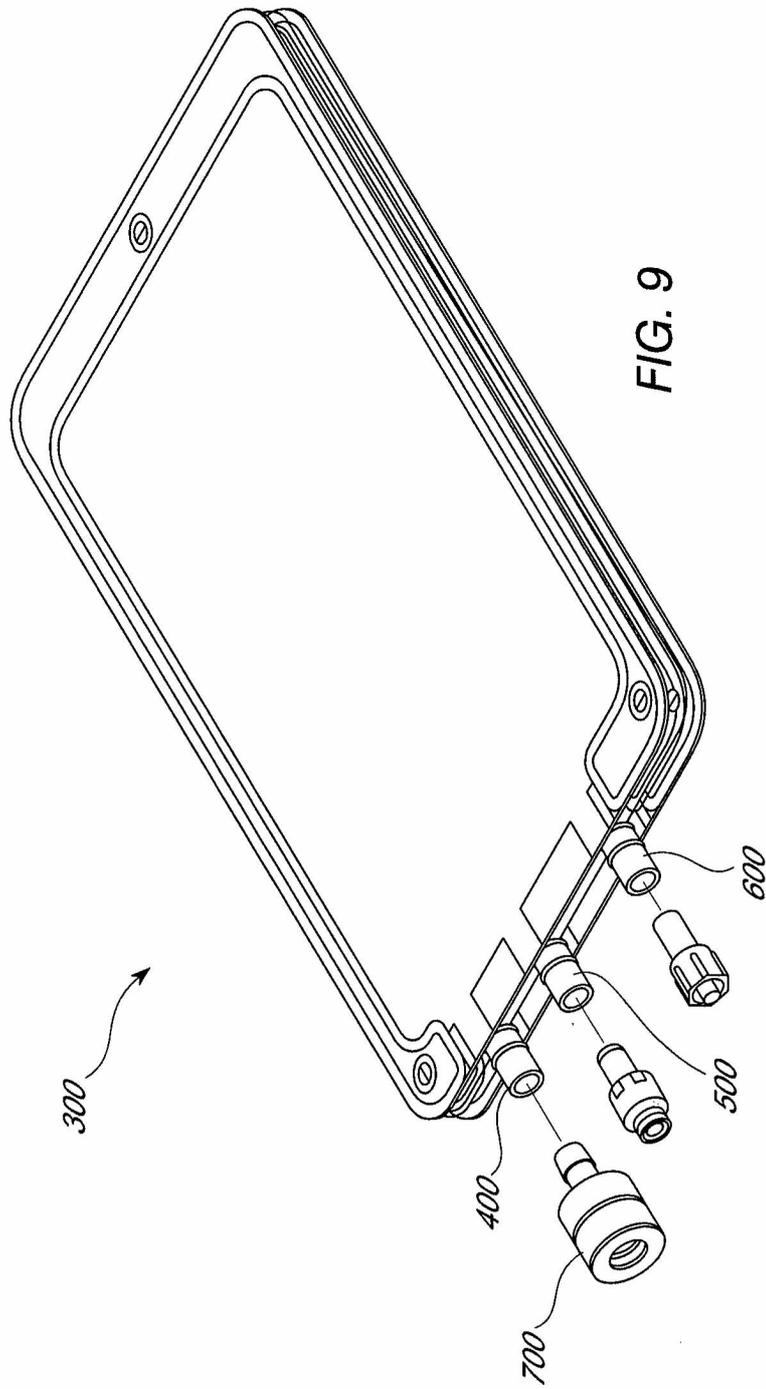


FIG. 7



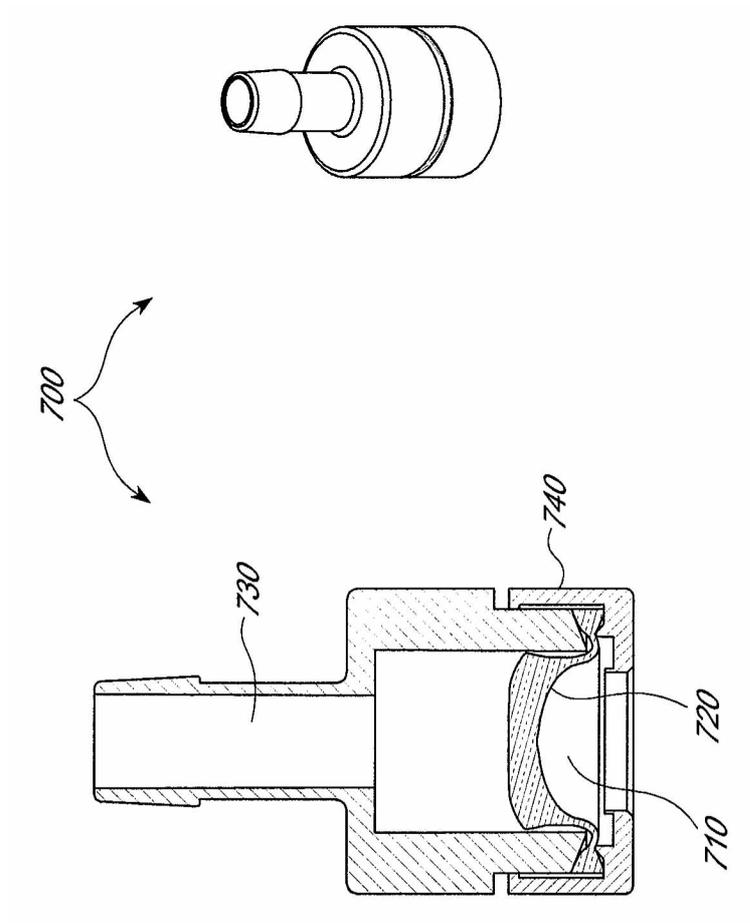


FIG. 10

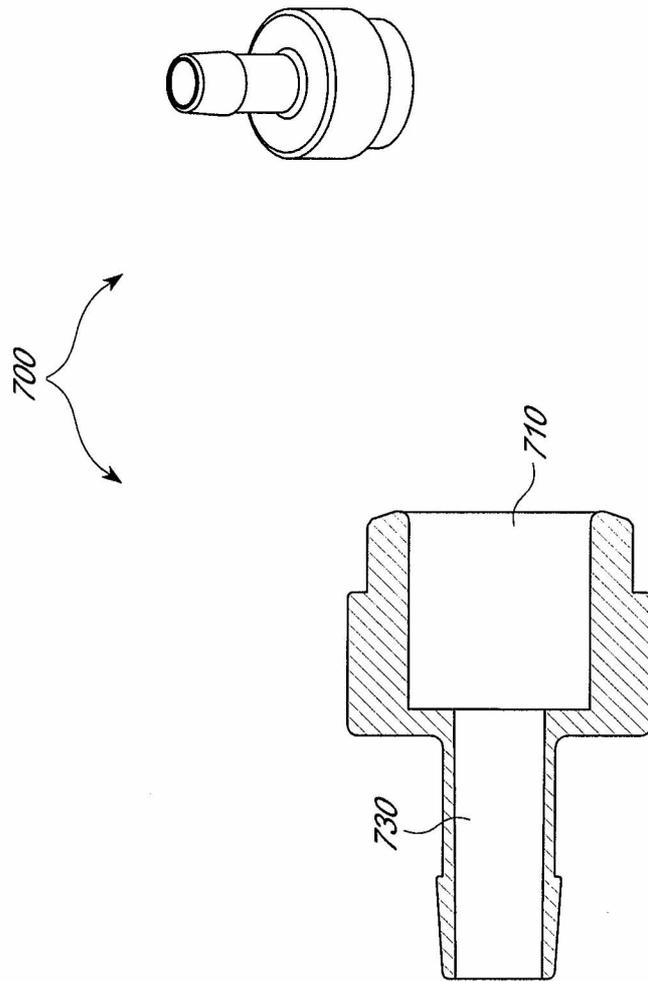


FIG. 11

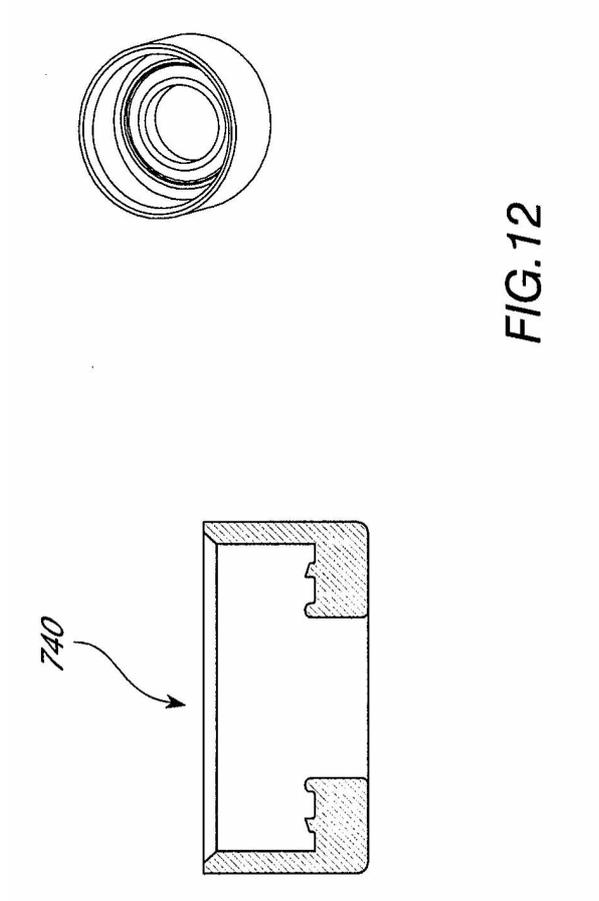


FIG.12

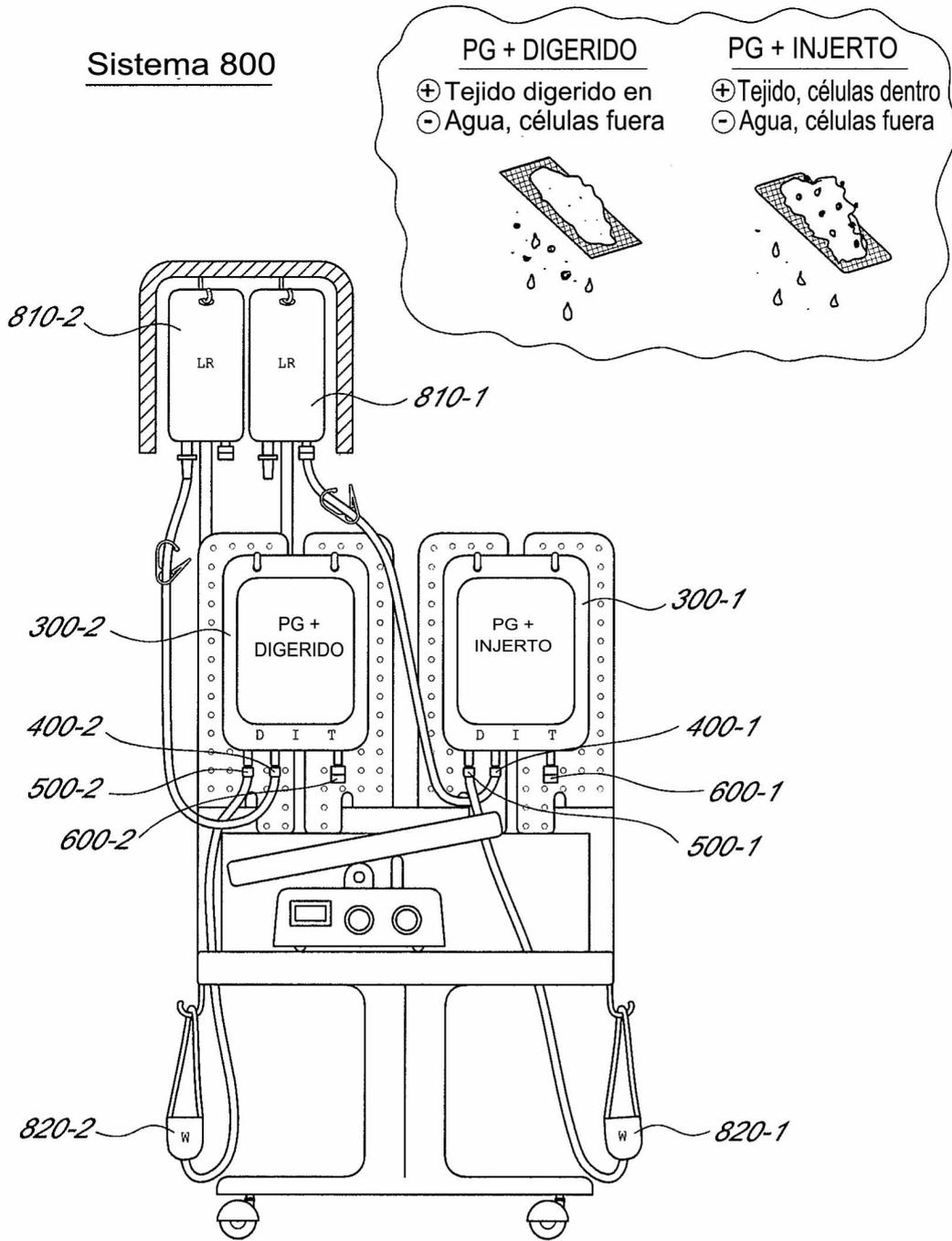


FIG. 13

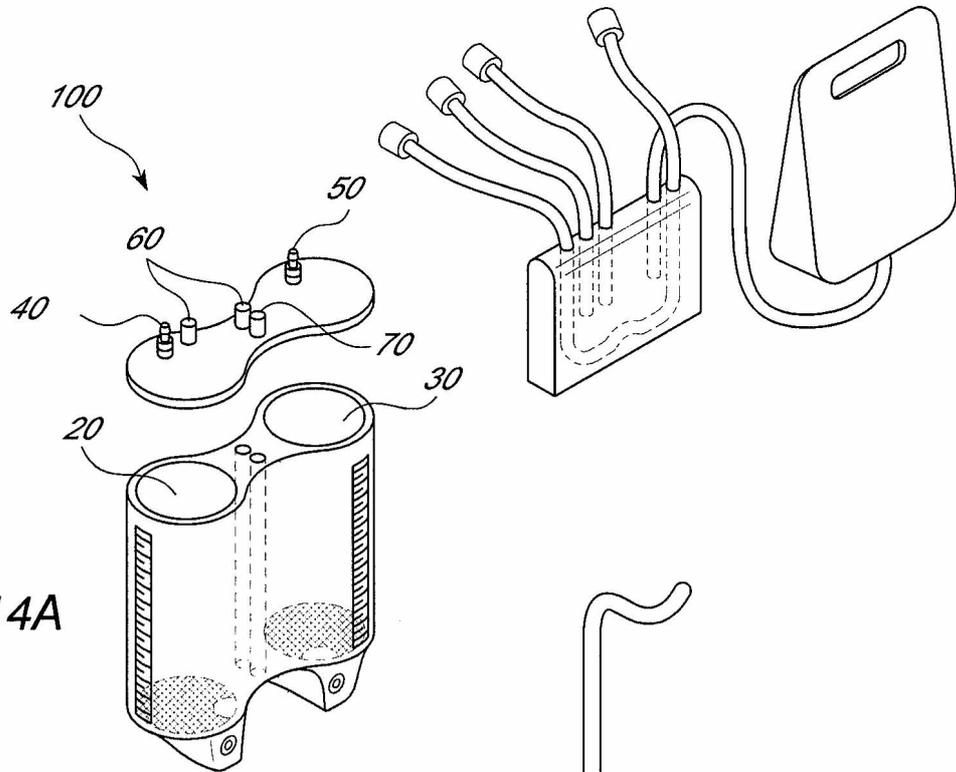


FIG. 14A

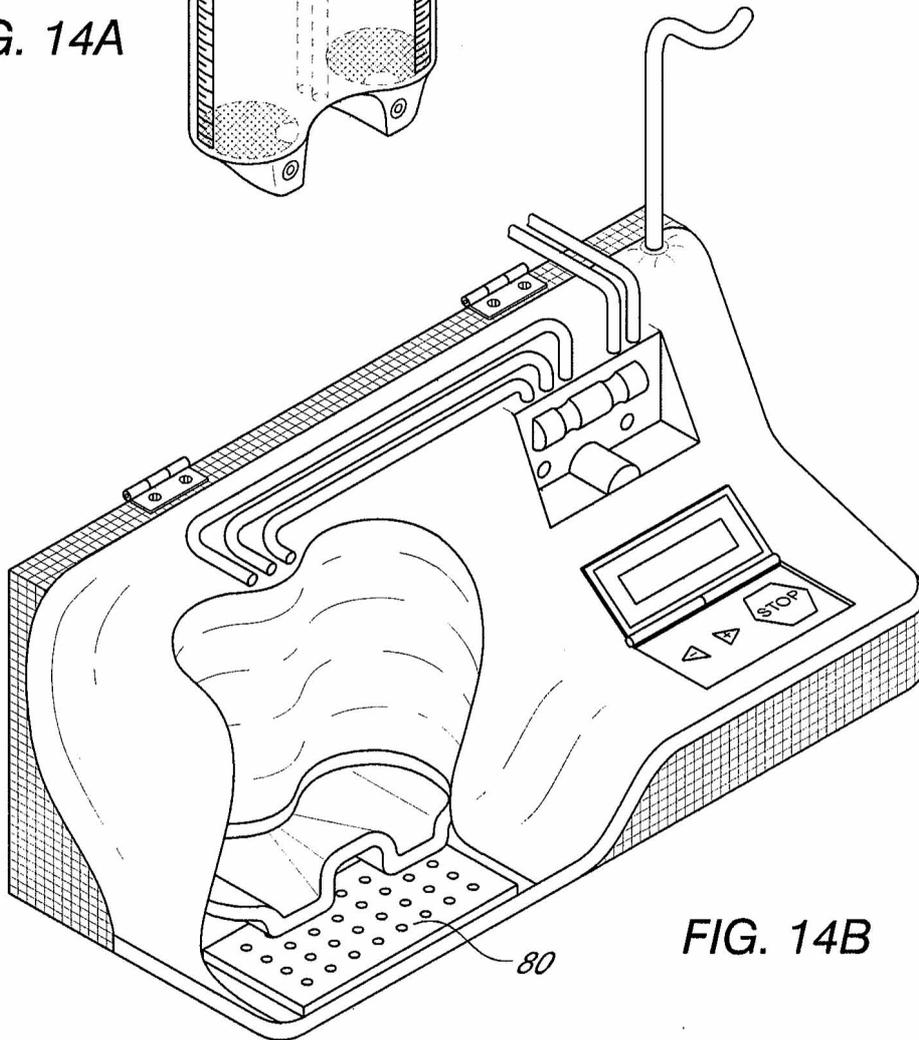
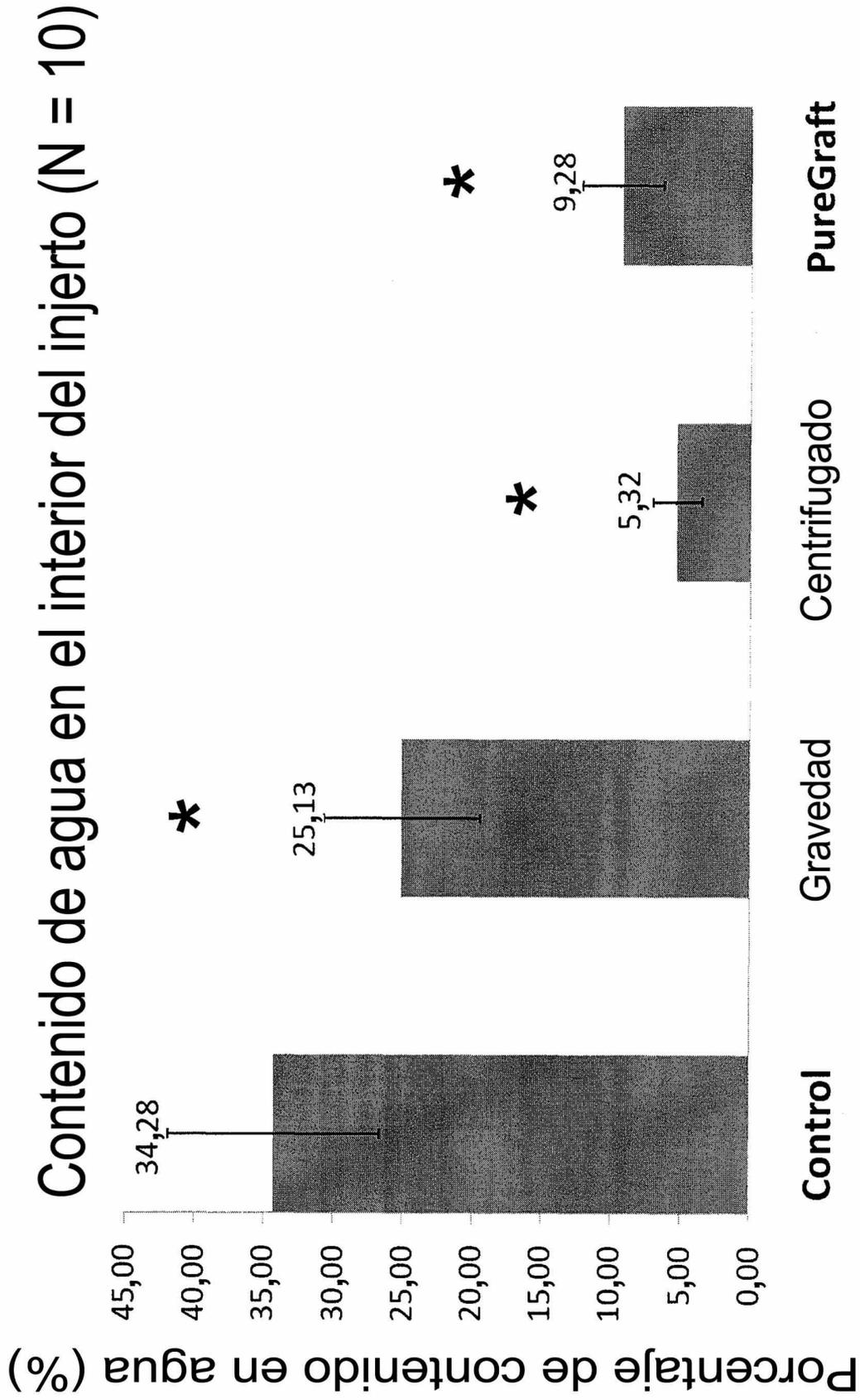


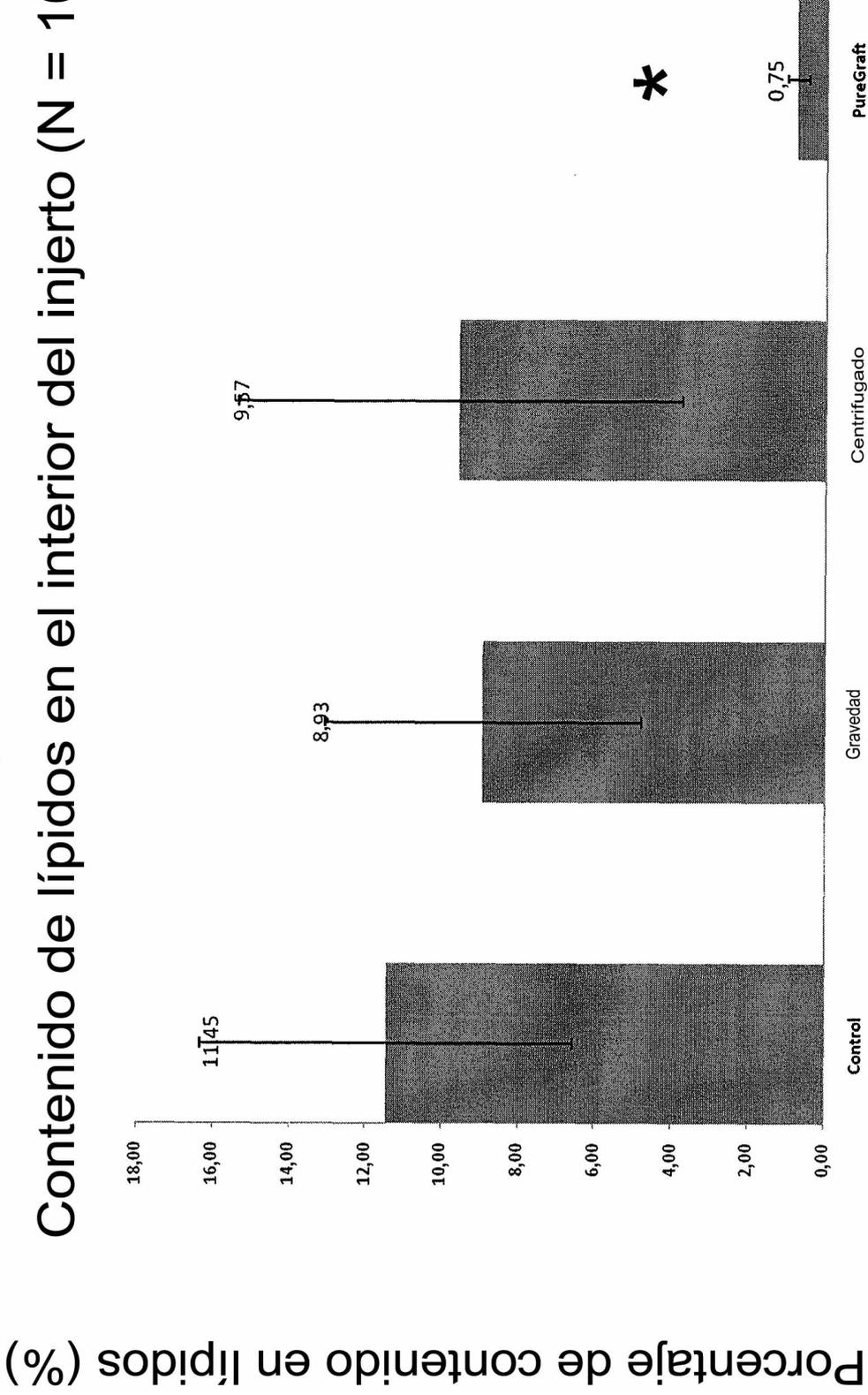
FIG. 14B

Figura 15



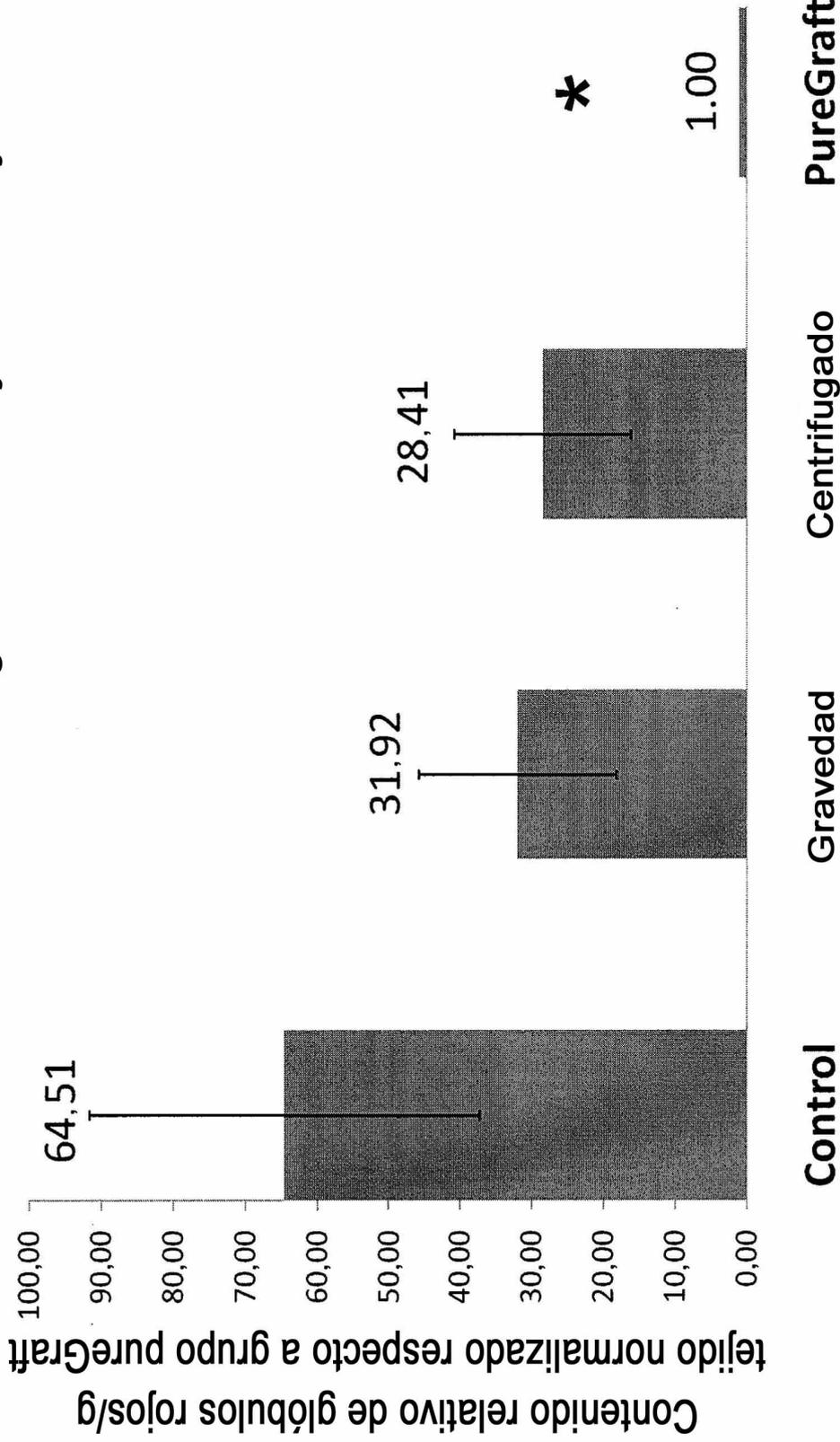
Diferentes procedimientos de preparación de injertos

Figura 16
Contenido de lípidos en el interior del injerto (N = 10)



Diferentes procedimientos de preparación de injertos

Figura 17
Contenido relativo de glóbulos rojos en injertos



Diferentes procedimientos de preparación de injertos