

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 604**

51 Int. Cl.:

**C12N 5/071** (2010.01)

**C12N 5/0775** (2010.01)

**A61K 35/12** (2015.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2004 PCT/US2004/021480**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2005 WO05034843**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2004 E 04756641 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 1670315**

54 Título: **Métodos para usar células regenerativas derivadas de adiposo en el tratamiento de una enfermedad vascular periférica**

30 Prioridad:

**17.09.2003 US 503589 P**

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

**22.09.2017**

73 Titular/es:

**CYTORI THERAPEUTICS, INC. (100.0%)  
3020 CALLAN ROAD  
SAN DIEGO, CALIFORNIA 92121, US**

72 Inventor/es:

**FRASER, JOHN, K.;  
HEDRICK, MARC, H. y  
DANIELS, ERIC**

74 Agente/Representante:

**CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes**

ES 2 633 604 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos para usar células regenerativas derivadas de adiposo en el tratamiento de una enfermedad vascular periférica

5

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. Campo de la invención

10 Esta invención se refiere en general a células derivadas de tejido adiposo, y más particularmente, a células regenerativas derivadas de adiposo (por ejemplo, células madre y/o progenitoras), composiciones que contienen células regenerativas derivadas de adiposo, y sistemas para preparar células regenerativas derivadas de adiposo que se usan para tratar una enfermedad vascular periférica y afecciones, enfermedades o trastornos relacionados.

15 2. Descripción de la técnica relacionada

La enfermedad vascular periférica (PVD) y trastornos relacionados se definen como enfermedades de los vasos sanguíneos fuera del corazón y del sistema nervioso central que a menudo se encuentran como un estrechamiento de los vasos de los miembros. Existen dos tipos principales de estos trastornos, la enfermedad *funcional* que no implica defectos en los vasos sanguíneos, sino que más bien surge de estímulos como el frío, el estrés o el tabaquismo, y la enfermedad *orgánica* que surge de los defectos estructurales en la vasculatura, tales como lesiones ateroscleróticas, inflamación local o lesión traumática. Esto puede conducir a la oclusión del vaso, al flujo sanguíneo aberrante, y por último a la isquemia tisular.

25 Una de las formas clínicamente más importantes de PVD es la enfermedad arterial periférica (PAD) que tiene elementos en común con la arteriopatía coronaria (CAD). Al igual que CAD, PVD se trata a menudo mediante angioplastia e implantación de una endoprótesis vascular o mediante cirugía de derivación arterial. La presentación clínica depende de la localización del vaso ocluido. Por ejemplo, el estrechamiento de la arteria que suministra sangre al intestino (es decir, la arteria mesentérica superior) puede dar lugar a dolor postprandial grave en el abdomen inferior resultante de la incapacidad del vaso ocluido para satisfacer la mayor demanda de oxígeno derivada de los procesos de digestión y absorción. Las varias formas de isquemia pueden conducir a la necrosis intestinal. De forma similar, PAD en la pierna puede conducir a dolor intermitente, normalmente en la pantorrilla, que aparece y desaparece con la actividad. Este trastorno se conoce como claudicación intermitente (IC) y puede progresar a dolor persistente durante el reposo, la úlcera isquémica e incluso la amputación. Las intervenciones terapéuticas actualmente disponibles para PVD incluyen fármacos trombolíticos y fármacos antitrombóticos (heparina, aspirina, coumadina), ejercicio (para IC), fármacos antiaterogénicos (por ejemplo, estatinas) y revascularización quirúrgica. Sin embargo, muchos pacientes tienen una forma de enfermedad que no es anatómicamente adecuada para la intervención quirúrgica.

40 La enfermedad vascular periférica también se manifiesta en la estenosis aterosclerótica de la arteria renal, que puede conducir a isquemia renal y disfunción renal. La revascularización biológica proporciona una alternativa potencial a los enfoques quirúrgicos. Implica los procesos de angiogénesis y arteriogénesis que se combinan para impulsar el desarrollo de nuevas técnicas colaterales de flujo sanguíneo para derivar el flujo sanguíneo alrededor de la oclusión. La revascularización biológica puede conseguirse mediante fármacos y terapia génica, proporcionando factores angiogénicos, o por terapia celular que suministra células que contribuyen a la angiogénesis mediante la liberación paracrina de factores angiogénicos y/o proporcionando una fuente de células que pueden formar el endotelio.

Los estudios de terapia celular se han basado en la detección de la presencia de células madre no hematopoyéticas y células precursoras endoteliales en la médula ósea (Prockop, Azizi et al., 2000) (Pittenger, Mackay et al. 1999) (Shi, Rafii et al. 1998; Carmeliet y Lutun 2001). Estos estudios utilizaron animales receptores de trasplante de médula ósea en los que las células donantes y huésped podían distinguirse por marcadores genéticos para demostrar que alguna fracción del nuevo desarrollo de vasos sanguíneos en los receptores se derivó de las células de médula del donante (Carmeliet y Lutun 2001) (Takahashi, Kalka et al. 1999; Murayama, Tepper et al. 2002).

55 Aunque este trabajo demuestra definitivamente que la médula contiene dichas células, la frecuencia de las células madre mesenquimatosas en la médula ósea se estima entre 1 en 100.000 y 1 en 1.000.000 de células nucleadas (D'Ippolito et al., 1999; Banfi et al., 2001; Falla et al., 1993). De forma similar, la extracción de estas células de la piel y otros tejidos implica una serie complicada de etapas de cultivo celular durante varias semanas (Toma et al., 2001) y la aplicación clínica de células madre derivadas de músculo esquelético requiere una fase de cultivo de dos a tres

semanas (Hagege Et al., 2003). Por lo tanto, cualquier aplicación clínica propuesta de células madre de dichos tejidos requiere aumentar el número de células, la pureza y la madurez mediante procesos de purificación celular y cultivo celular.

- 5 Aunque las etapas de cultivo celular pueden proporcionar un aumento del número de células, la pureza y la madurez, lo hacen a un coste. Este coste puede incluir una o más de las siguientes dificultades técnicas: pérdida de la función celular debido al envejecimiento celular, pérdida de poblaciones potencialmente útiles de células no estaminales, retrasos en la aplicación potencial de células a pacientes, aumento del coste monetario, y mayor riesgo de contaminación de las células con microorganismos ambientales durante el cultivo. Los estudios recientes que
- 10 examinan los efectos terapéuticos de las ASC derivadas de médula ósea han usado esencialmente médula entera para eludir los problemas asociados con el cultivo celular (Horwitz et al., 2001; Orlic et al, 2001; Stamm et al., 2003; Strauer et al., 2002). Sin embargo, los beneficios clínicos han sido subóptimos, un resultado casi seguramente relacionado con la dosis limitada de ASC y la pureza inherentemente disponible en la médula ósea.
- 15 Recientemente, se ha demostrado que el tejido adiposo es una fuente de células madre (Zuk et al., 2001, Zuk et al., 2002). El tejido adiposo (a diferencia de la médula ósea, la piel, el músculo, el hígado y el cerebro) es comparablemente fácil de cosechar en cantidades relativamente grandes con baja morbilidad (Commons et al., 2001; Katz et al., 2001b). Sin embargo, la técnica carece de métodos adecuados para recolectar células madre derivadas de tejido adiposo. Los métodos existentes tienen una serie de deficiencias. Por ejemplo, los métodos
- 20 existentes pueden carecer de automatización parcial o total, un sistema parcial o completamente cerrado, la disposición de los componentes, etc.

Dado el potencial terapéutico de las células madre derivadas de adiposo para tratar PVD, existe la necesidad en la técnica de un método para recoger células del tejido adiposo que produce una población de células madre adultas

25 con un aumento del rendimiento, consistencia y/o pureza y lo hace de forma rápida y fiable con una necesidad disminuida o inexistente de manipulación posterior a la extracción.

### RESUMEN DE LA INVENCION

- 30 Las realizaciones de la invención comprenden composiciones que comprenden una población concentrada de células derivadas del tejido adiposo para su uso en el tratamiento de, y el uso de dichas composiciones para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad vascular periférica (PVD) fuera del corazón y del sistema nervioso central en un sujeto que lo necesite, en la que dicha población concentrada de células derivadas de adiposo se administrará a un paciente que lo necesite sin cultivar las células derivadas del tejido
- 35 adiposo antes de administrarlas al sujeto, en la que las células derivadas de adiposo se obtienen mediante el procesamiento de tejido adiposo para separar las células derivadas de adiposo de adipocitos maduros y tejido conectivo, y lavando, separando y concentrando dichas células derivadas de adiposo, en la que dicha población concentrada de células derivadas del tejido adiposo comprende una concentración celular mínima de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/ml, y en la que al menos el 0,1 % del componente
- 40 celular de la población concentrada de células derivadas de adiposo son células madre.

La presente invención se refiere a células regenerativas, por ejemplo, células madre y progenitoras adultas, que pueden usarse para tratar PVD y enfermedades o trastornos relacionados. La presente invención también se refiere a sistemas y métodos para separar y concentrar células regenerativas de tejido, por ejemplo, tejido adiposo. La

45 presente invención se refiere además a composiciones de células regenerativas para tratar PVD y enfermedades o trastornos relacionados. Por consiguiente, en una realización general, la presente invención se refiere a composiciones, métodos y sistemas para usar células regenerativas derivadas de tejido que se colocan directamente en un receptor junto con dichos aditivos necesarios para promover, engendrar o apoyar un beneficio terapéutico.

- 50 En realizaciones específicas, la presente invención está dirigida a composiciones para tratar PVD y enfermedades y trastornos relacionados, defectos o trastornos de los vasos sanguíneos, trastornos de tejidos extracoronarios, enfermedad arterial periférica, arteriosclerosis, y arteritis inflamatoria, administrando, preferiblemente mediante inyección, una concentración de células regenerativas. Las células regenerativas comprenden células madre; opcionalmente en combinación con células progenitoras. Puede ser necesaria la administración de múltiples dosis
- 55 de células regenerativas para obtener un beneficio terapéutico. Además, se pueden administrar aditivos tales como uno o más factores de crecimiento con las células regenerativas. En una realización preferida, las células regenerativas se administran con factores de crecimiento angiogénicos en solitario o en combinación con otros aditivos. Las células regenerativas también pueden administrarse con uno o más fármacos inmunosupresores.

Las vías de administración de las células regenerativas son conocidas en la técnica e incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular y subcutánea. Las células se pueden administrar a, por ejemplo, la vasculatura del paciente. Las células también pueden administrarse a través de una estructura, por ejemplo, una estructura reabsorbible conocida en la técnica.

5

También se desvelan sistemas y métodos altamente versátiles capaces de separar y concentrar células regenerativas, por ejemplo, células madre y progenitoras, de un tejido dado, que son adecuadas para su reinfusión en un sujeto. En una realización preferida, el sistema está automatizado. El sistema de la presente invención incluye generalmente una o más de una cámara de recogida, una cámara de procesamiento, una cámara de desecho, una cámara de salida y una cámara de muestra. Las diversas cámaras están acopladas entre sí a través de uno o más conductos de tal forma que los fluidos que contienen material biológico pueden pasar de una cámara a otra en una trayectoria de fluido/tejido estéril cerrada. En ciertas versiones, la cámara de desecho, la cámara de salida y la cámara de muestra son opcionales. En una realización, todo el procedimiento desde la extracción de tejido hasta el procesamiento y la colocación del dispositivo en el receptor se realizarán en la misma instalación, de hecho, incluso dentro de la misma habitación del paciente sometido al procedimiento.

10

15

Por consiguiente, un método de tratamiento de un paciente con PVD o una enfermedad o trastorno relacionado incluye las etapas de: a) proporcionar un sistema de eliminación de tejido; B) eliminar el tejido adiposo de un paciente utilizando el sistema de eliminación de tejido, teniendo el tejido adiposo una concentración de células madre; c) procesar al menos una parte del tejido adiposo para obtener una concentración de células regenerativas distintas de la concentración de células regenerativas del tejido adiposo antes del procesamiento; y d) administrar, preferiblemente mediante inyección, las células regenerativas a un paciente sin eliminar las células regenerativas del sistema de eliminación de tejido antes de administrarse al paciente.

20

25

Cualquier característica o combinación de características descritas en el presente documento se incluyen dentro del alcance de la presente invención con la condición de que las características incluidas en cualquiera de tales combinaciones no sean mutuamente inconsistentes como será evidente a partir del contexto, esta memoria descriptiva y el conocimiento de un experto en la técnica. Son evidentes ventajas y aspectos adicionales de la presente invención en la siguiente descripción detallada.

30

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

35

La figura 2 es una ilustración de un sistema similar a la figura 1 que tiene una pluralidad de conjuntos de filtro en una configuración en serie.

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

40

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

La figura 5 es una vista en sección de una cámara de recogida que incluye un filtro prefijado utilizado en un sistema para separar células regenerativas del tejido.

La figura 6 es una vista en sección de una cámara de procesamiento de un sistema para separar células regenerativas del tejido utilizando un sistema de filtración percolante.

45

La figura 7 es una vista en sección de una cámara de procesamiento de un sistema para separar células regenerativas que utiliza un dispositivo de centrifuga para concentrar las células regenerativas.

La figura 8 es otra vista en sección de la cámara de procesamiento de la figura 7.

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

50

La figura 10 es una ilustración de un sistema para separar células regenerativas de tejido utilizando presión de vacío para mover fluidos a través del sistema. Se puede construir un sistema de vacío aplicando una bomba de vacío o una fuente de vacío a la salida del sistema, controlado a una velocidad predeterminada para extraer el tejido y el fluido a través, utilizando un sistema de llaves de cierre, salidas de aire y abrazaderas para controlar la dirección y el tiempo del flujo.

55

La figura 11 es una ilustración de un sistema para separar células regenerativas de tejido utilizando presión positiva para mover fluidos a través del sistema. Un sistema de presión positiva utiliza un medio mecánico tal como una bomba peristáltica para empujar o propulsar el fluido y el tejido a través del sistema a una velocidad determinada, usando válvulas, válvulas de cierre, salidas de aire y abrazaderas para controlar la dirección y el tiempo del flujo.

La figura 12A ilustra un proceso de filtración en el que la corriente de alimentación de fluido fluye tangencialmente a los poros del filtro. La figura 12B ilustra un proceso de filtración en el que la corriente de alimentación de fluido fluye perpendicular a los poros del filtro.

La figura 13 es una ilustración de un conjunto desechable ejemplar para un sistema de la invención.

La figura 14 es una ilustración de un componente reutilizable ejemplar para un sistema de la invención.

La figura 15A es una ilustración de un dispositivo ejemplar de la invención montado usando el conjunto desechable de la figura 13 y un componente reutilizable de la figura 14.

La figura 15B es un diagrama de flujo que representa etapas preprogramadas ejemplares, implementadas a través de un programa de software, que controlan realizaciones automatizadas de un sistema de la presente invención. Se muestran dos parámetros de procesamiento alternativos que indican la versatilidad del sistema.

Las figuras 16A y 16B representan la expresión de la proteína VEGF (5A) y PIGF (5B) por células madre derivadas de adiposo cultivadas.

La figura 17 representa la detección de células progenitoras endoteliales dentro de poblaciones de células madre derivadas de tejido adiposo.

Las figuras 18A y 18B representan el desarrollo *in vitro* de estructuras vasculares en ratones normales (7A) y tratadas con estreptozotocina (7B).

La figura 19 representa el aumento de la restauración media del flujo sanguíneo en ratones con isquemia de extremidad posterior tratados con células madre derivadas de adiposo en comparación con un control negativo.

Las figuras 20A y 20B muestran que el aumento de la dosis de células madre derivadas de adiposo mejora la supervivencia del injerto y la angiogénesis (20A) y representa la retención de la arquitectura del tejido adiposo en la muestra histológica (20B).

## 25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona métodos para PVD que usan células regenerativas derivadas de adiposo ("ADC"). PVD generalmente surge de una progresión aterotrombótica en la cual el estrechamiento aterosclerótico del vaso conduce, en sí mismo a un grado de isquemia tisular, mientras que simultáneamente aumenta la probabilidad de un déficit de perfusión clínicamente significativo que surge del alojamiento de un coágulo u otra embolia en el punto de estrechamiento. La isquemia conduce a una disfunción metabólica (suministro insuficiente de oxígeno para satisfacer la demanda) dentro de los tejidos normalmente perfundidos por el vaso ahora ocluido que, en formas graves o progresivas, puede conducir a procesos necróticos. La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que las células regenerativas de la invención (1) expresan factores de crecimiento angiogénicos y citocinas, incluyendo PIGF, VEGF, bFGF, IGF-II, Eotaxina, G-CSF, GM-CSF, IL-12 p40/p70, IL-12 p70, IL-13, IL-6, IL-9, Leptina, MCP-I, M-CSF, MIG, PF-4, TIMP-I, TIMP-2, TNF- $\alpha$ , y Trombopoyetina, (2) comprenden células progenitoras endoteliales (EPC) que tienen una función bien establecida en la formación de vasos sanguíneos, (3) se desarrollan en vasos sanguíneos *in vitro*, y (4) soportan la supervivencia de tejido isquémico *in vivo*. Por consiguiente, las células regenerativas de la presente invención son útiles para el tratamiento de PVD, por ejemplo, promoviendo la angiogénesis.

La presente invención también se refiere a sistemas y a métodos rápidos y fiables para separar y concentrar células regenerativas, por ejemplo, células madre y/o células progenitoras, de una amplia diversidad de tejidos, incluyendo pero sin limitación, adiposo, médula ósea, sangre, piel, músculo, hígado, tejido conectivo, fascia, tejido cerebral y otros tejidos del sistema nervioso, vasos sanguíneos, y otros tejidos blandos o líquidos o componentes tisulares, o mezclas de tejidos (por ejemplo, una mezcla de tejidos incluyendo piel, adiposo y tejido conectivo). En una realización preferida, el sistema separa y concentra las células regenerativas del tejido adiposo. En otra realización preferida, el sistema está automatizado de tal manera que todo el procedimiento puede realizarse con una intervención o experiencia mínima del usuario. En una realización particularmente preferida, las células regenerativas obtenidas que usan los sistemas y los métodos de la presente invención son adecuadas para la colocación directa en un receptor que padece PVD o una enfermedad o trastorno relacionado del que se extrajo el tejido.

Preferiblemente, todo el procedimiento desde la extracción de tejido hasta la separación, la concentración y la colocación (por ejemplo, inyección) de las células regenerativas en el receptor se realizarán en la misma instalación, de hecho, incluso dentro de la misma habitación del paciente sometido al procedimiento. Las células regenerativas se pueden usar en un periodo de tiempo relativamente corto después de la extracción y concentración. Por ejemplo, las células regenerativas pueden estar listas para su uso en aproximadamente una hora desde la recogida de tejido de un paciente y, en ciertas situaciones, pueden estar listas para su uso en aproximadamente 10 a 40 minutos

desde la recolección del tejido. En una realización preferida, las células regenerativas pueden estar listas para usarse en aproximadamente 20 minutos desde la recolección de tejido. La duración total del procedimiento desde la extracción hasta la separación y la concentración puede variar dependiendo de varios factores, incluyendo el perfil del paciente, el tipo de tejido que se está cosechando y la cantidad de células regenerativas requeridas para una aplicación terapéutica dada. Las células también pueden colocarse en el receptor en combinación con otras células, tejido, fragmentos de tejido, estructuras u otros estimuladores del crecimiento y/o diferenciación celular en el contexto de un procedimiento operativo único con la intención de obtener un beneficio terapéutico, estructural o cosmético para el receptor. Se entiende que cualquier manipulación adicional de las células regenerativas más allá de la fase de separación y concentración del sistema requerirá tiempo adicional proporcional a la manera de tal manipulación.

Con el fin de que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, se definen en primer lugar ciertos términos. Las definiciones adicionales se exponen a lo largo de la descripción detallada.

Como se usa en el presente documento, "células regenerativas" se refiere a cualquier célula heterogénea u homóloga obtenida usando los sistemas y métodos de la presente invención que causan o contribuyen a la regeneración, restauración o sustitución completa o parcial de la estructura o 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: ASC, células endoteliales, células precursoras endoteliales, células progenitoras endoteliales, macrófagos, fibroblastos, pericitos, células de músculo liso, preadipocitos, adipocitos diferenciados desdiferenciados, queratinocitos, células progenitoras y precursoras unipotentes y multipotentes (y su progenie), y linfocitos.

Un mecanismo mediante el cual las células regenerativas pueden proporcionar un beneficio terapéutico, estructural o cosmético es incorporándose a sí mismas o su progenie en tejidos o componentes tisulares recién generados, existentes o reparados. Por ejemplo, las ASC y/o su progenie pueden incorporarse en hueso, músculo u otro tejido estructural o funcional recién generado y, de ese modo, causar o contribuir a una mejora terapéutica, estructural o cosmética. De forma similar, las células endoteliales o las células precursoras o progenitoras endoteliales y su progenie pueden incorporarse a vasos sanguíneos existentes, recién generados, reparados o expandidos para causar o contribuir de este modo a un beneficio terapéutico, estructural o cosmético.

Otro mecanismo mediante el cual las células regenerativas pueden proporcionar un beneficio terapéutico, estructural o cosmético es expresando y/o segregando moléculas, por ejemplo, factores de crecimiento, que promueven la creación, retención, restauración y/o regeneración de la estructura o función de un determinado tejido o componente tisular. Por ejemplo, las células regenerativas pueden expresar y/o segregar moléculas que dan como resultado un crecimiento mejorado de tejidos o células que luego participan directa o indirectamente en una estructura o función mejorada. Las células regenerativas pueden expresar y/o segregar factores de crecimiento, incluyendo, por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento placentario (PIGF), bFGF, IGF-II, Eotaxina, G-CSF, GM-CSF, IL-12 p40/p70, IL-12 p70, IL13, IL-6, IL-9, Leptina, MCP-I, M-CSF, MIG, PF-4, TIMP-I, TIMP-2, TNF- $\alpha$ , trombopoyetina y sus isoformas, que pueden realizar una o más de las siguientes funciones: estimular el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, es decir, promover la angiogénesis; mejorar el suministro de oxígeno de pequeños vasos sanguíneos preexistentes (colaterales) expandiendo su capacidad de transporte sanguíneo; inducir la movilización de células regenerativas de sitios distantes del sitio de la lesión para aumentar de este modo el alojamiento y la migración de tales células al sitio de la lesión; estimular el crecimiento y/o promover la supervivencia de las células dentro de un sitio de lesión, promoviendo así la retención de la función o estructura; suministrar moléculas con propiedades antiapoptóticas, reduciendo así la tasa o probabilidad de muerte celular y pérdida permanente de función; e interactuar con células regenerativas endógenas y/u otros mecanismos fisiológicos.

Las células regenerativas pueden usarse en su forma "nativa" como presente en o separadas y concentradas del tejido usando los sistemas y métodos de la presente invención, o se pueden modificar por estimulación o cebado con factores de crecimiento u otros modificadores de la respuesta, por transferencia génica (transferencia transitoria o estable), mediante subfraccionamiento adicional de la población resultante sobre las propiedades básicas o físicas (por ejemplo, tamaño o densidad), adherencia diferencial a un material en fase sólida, expresión de moléculas de la superficie celular o intracelulares, u otra manipulación, modificación o fraccionamiento *ex vivo* o *in vivo* como se describe adicionalmente en el presente documento. Las células regenerativas también pueden usarse en combinación con otras células o dispositivos tales como estructuras sintéticas o biológicas, materiales o dispositivos que administran factores, fármacos, productos químicos u otros agentes que modifican o mejoran las características relevantes de las células como se describe adicionalmente en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "composición de células regenerativas" se refiere a la composición de células típicamente presentes en un volumen de líquido después de lavar y, al menos parcialmente, desagregar un tejido, por ejemplo, tejido adiposo. Por ejemplo, una composición celular regenerativa de la invención comprende 5 múltiples tipos diferentes de células regenerativas, incluyendo ASC, células endoteliales, células precursoras endoteliales, células progenitoras endoteliales, macrófagos, fibroblastos, pericitos, células de músculo liso, preadipocitos, adipocitos diferenciados y no diferenciados, queratinocitos, células progenitoras y precursoras unipotentes y multipotentes (y su progenie), y linfocitos. La composición de células regenerativas también puede 10 contener uno o más contaminantes, tales como colágeno, que pueden estar presentes en los fragmentos de tejido, o colagenasa residual u otra enzima o agente empleado en o resultante del proceso de desagregación tisular descrito en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "medicina regenerativa" se refiere a cualquier beneficio terapéutico, estructural o cosmético que se derive de poner, directa o indirecta, células regenerativas en un sujeto. Como se usa 15 en el presente documento, "enfermedad vascular periférica (PVD)" se refiere a enfermedades y trastornos de la circulación de los vasos sanguíneos fuera del corazón y del cerebro e incluye, pero no se limita a, PVD funcional, PVD orgánico, enfermedad arterial periférica (PAD), enfermedad artrosclerótica oclusiva, arteriosclerosis, lesión traumática de vasos y arteritis inflamatorias. Específicamente, la PVD está caracterizada a menudo por un estrechamiento de los vasos que llevan la sangre a la pierna y los músculos del brazo. Por ejemplo, en la PAD, que 20 es una afección similar a la arteriopatía coronaria y la arteriopatía carotídea, los depósitos grasos se acumulan a lo largo de las paredes arteriales y afectan la circulación sanguínea, principalmente en las arterias que conducen a las piernas y los pies. Las personas con PAD tienen un mayor riesgo de muerte por accidente cerebrovascular y ataque al corazón, debido al riesgo de coágulos sanguíneos.

Como se usa en el presente documento, 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). La expresión "reparación o remodelación" se refiere a la reforma de la vasculatura existente. El alivio de la isquemia tisular es críticamente dependiente de la angiogénesis. El crecimiento espontáneo de nuevos vasos sanguíneos proporciona circulación 25 colateral en y alrededor de un área isquémica, mejora el flujo sanguíneo y alivia los síntomas causados por la isquemia. Las enfermedades y trastornos mediados por la angiogénesis incluyen infarto agudo de miocardio, cardiomiopatía isquémica, enfermedad vascular periférica, accidente cerebrovascular isquémico, necrosis tubular aguda, heridas isquémicas, incluyendo AFT, sepsis, enfermedad isquémica intestinal, retinopatía diabética, neuropatía y nefropatía, vasculitis, encefalopatía isquémica, disfunción eréctil, lesiones fisiológicas, isquémicas o 30 traumáticas de la médula espinal, insuficiencia multiorgánica, enfermedad isquémica de las encías e isquemia relacionada con el trasplante.

Como se usa en el presente documento, "célula madre" se refiere a una célula regenerativa multipotente con el potencial de diferenciarse en una diversidad de otros tipos celulares, que realizan una o más funciones específicas y 40 tienen la capacidad de auto-renovarse. Algunas de las células madre desveladas en el presente documento pueden ser multipotentes.

Como se usa en el presente documento, "célula progenitora" se refiere a una célula regenerativa multipotente con el potencial de diferenciarse en más de un tipo de célula y tiene limitada o ninguna capacidad de auto-renovación. "Célula progenitora", como se usa en el presente documento, también se refiere a una célula unipotente con el 45 potencial de diferenciarse en un único tipo de célula, que realiza una o más funciones específicas y tiene limitada o ninguna capacidad de auto-renovación. En particular, como se usa en el presente documento, "célula progenitora endotelial" se refiere a una célula multipotente o unipotente con el potencial de diferenciarse en células endoteliales vasculares.

Como se usa en el presente documento, "célula precursora" se refiere a una célula regenerativa unipotente con el potencial de diferenciarse en un tipo de célula. Las células precursoras y su progenie pueden conservar una amplia 50 capacidad proliferativa, por ejemplo, linfocitos y células endoteliales, que pueden proliferar en las condiciones apropiadas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "factor angiogénico" o "proteína angiogénica" se refiere a cualquier proteína, péptido u otro agente conocido capaz de promover el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura existente (angiogénesis). Los factores angiogénicos adecuados para uso en la invención 55 incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento placentario (Luttun et al., 2002), factor estimulante de colonias de macrófagos (Aharinejad et al., 1995), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (Buschmann et

al. 2003), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)-A, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (Mints et al., 2002), neuropilina (Wang et al., 2003), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)-1, FGF-2(bFGF), FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6 (Botta et al., 2000), Angiopoietina 1, Angiopoietina 2 (Sundberg et al., 2002), eritropoietina (Ribatti et al., 2003), BMP-2, BMP-4, BMP-7 (Carano y Filvaroff, 2003), TGF-beta (Xiong et al.,

5 2002), IGF-1 (Shigematsu et al., 1999), Osteopontina (Asou et al., 2001), Pleiotropina (Beecken et al., 2000), Activina (Lamouille et al., 2002), Endotelina-1 (Bagnato and Spinella, 2003) y combinaciones de los mismos. Los factores angiogénicos pueden actuar independientemente, o en combinación entre sí. Cuando están en combinación, los factores angiogénicos también pueden actuar sinérgicamente, por lo que el efecto combinado de los factores es mayor que la suma de los efectos de los factores individuales tomados por separado. La expresión  
10 "factor angiogénico" o "proteína angiogénica" también incluye análogos funcionales de tales factores. Los análogos funcionales incluyen, por ejemplo, porciones funcionales de los factores. Los análogos funcionales también incluyen anticuerpos anti-idiotípicos que se unen a los receptores de los factores y, por lo tanto, imitan la actividad de los factores en la promoción de la angiogénesis y/o la remodelación tisular. Los métodos para generar tales anticuerpos anti-idiotípicos se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en el documento WO 97/23510.

15

Los factores angiogénicos utilizados en la presente invención se pueden producir u obtener a partir de cualquier fuente adecuada. Por ejemplo, los factores pueden purificarse a partir de sus fuentes nativas, o producirse sintéticamente o por expresión recombinante. Los factores pueden administrarse a los pacientes como una composición de proteína. Como alternativa, los factores se pueden administrar en forma de un plásmido de expresión que codifica los factores. La construcción de plásmidos de expresión adecuados se conoce bien en la técnica. Los vectores adecuados para construir plásmidos de expresión incluyen, por ejemplo, vectores adenovirales, vectores retrovirales, vectores virales adeno-asociados, vectores de ARN, liposomas, lípidos catiónicos, vectores lentivirales y transposones.

25 Como se usa en el presente documento, el término "arteriogénesis" se refiere al proceso de aumento del crecimiento de arterias colaterales y/u otras arterias a partir de conexiones arteriolas preexistentes (Carmeliet, 2000; Scholz et al., 2001; Scholz et al., 2002). Más particularmente, la arteriogénesis es el reclutamiento y expansión *in situ* de arterias por proliferación de células endoteliales y de músculo liso a partir de conexiones arteriolas preexistentes que suministran sangre a tejido isquémico, tumor o sitio de inflamación. Estos vasos crecen ampliamente fuera del  
30 tejido afectado y son importantes para el suministro de nutrientes al territorio isquémico, al tumor o al sitio de inflamación. La arteriogénesis es parte de la respuesta normal a la isquemia miocárdica (Mills et al., 2000, Monteiro et al., 2003). Además, la técnica quirúrgica común de un injerto de derivación de arteria coronaria (CABG) es, en efecto, no más que la creación de un vaso colateral artificial (Sergeant et al., 1997). Por lo tanto, los procesos que mejoran la arteriogénesis después de un infarto mejorarán el flujo sanguíneo al tejido isquémico dando como resultado una disminución de la muerte celular y una disminución del tamaño del infarto. Estas mejoras darán como  
35 resultado una función cardíaca mejorada y un beneficio terapéutico.

Como se usa en el presente documento, el "número de células madre" o "frecuencia de células madre" se refiere al número de colonias observadas en un ensayo clonogénico en el que las células derivadas de adiposo (ADC) se  
40 ponen en placas a baja densidad celular <10.000 células/pocillo) y se cultivan en medio de crecimiento que soporta el crecimiento de MSC (por ejemplo, medio DMEM/F12 complementado con de suero fetal de ternero al 10 %, suero de caballo al 5 % y agentes antibióticos/antimicóticos). Las células se cultivan durante dos semanas después de las cuales los cultivos se tiñen con hematoxilina y las colonias de más de 50 células se cuentan como CFU-F. La frecuencia de las células madre se calcula como el número de CFU-F observadas por 100 células nucleadas en  
45 placas (por ejemplo, 15 colonias contadas en una placa iniciada con 1.000 células nucleadas regenerativas da una frecuencia de células madre del 1,5 %). El número de células madre se calcula como la frecuencia de células madre multiplicada por el número total de células ADC nucleadas obtenidas. Un alto porcentaje (~100 %) de CFU-F cultivado a partir de células regenerativas expresan la molécula de superficie celular CD105 que también se expresa por células madre derivadas de la médula (Barry et al., 1999). El CD105 también se expresa mediante células madre  
50 derivadas de tejido adiposo (Zuk et al., 2002).

Como se usa en el presente documento, la expresión "tejido adiposo" se refiere a la grasa que incluye el tejido conectivo que almacena grasa. El tejido adiposo contiene múltiples tipos de células regenerativas, incluyendo ASC y células progenitoras y precursoras endoteliales.

55

Como se usa en el presente documento, la expresión "unidad de tejido adiposo" se refiere a una cantidad discreta o medible de tejido adiposo. Se puede medir una unidad de tejido adiposo determinando el peso y/o el volumen de la unidad. Basándose en los datos identificados anteriormente, una unidad de lipoaspirado procesado, según se elimina de un paciente, tiene un componente celular en el que al menos el 0,1 % del componente celular son células

madre; es decir, tiene una frecuencia de células madre, determinada como se ha descrito anteriormente, de al menos el 0,1 %. En referencia a la divulgación en el presente documento, una unidad de tejido adiposo puede referirse a toda la cantidad de tejido adiposo extraída de un paciente, o una cantidad que es menor que la cantidad total de tejido adiposo extraída de un paciente. Por lo tanto, una unidad de tejido adiposo puede combinarse con otra  
5 unidad de tejido adiposo para formar una unidad de tejido adiposo que tiene un peso o volumen que es la suma de las unidades individuales.

Como se usa en el presente documento, el término "porción" se refiere a una cantidad de un material que es menor que un conjunto. Una porción menor se refiere a una cantidad que es menor del 50 %, y una porción mayor se  
10 refiere a una cantidad mayor del 50 %. Por lo tanto, una unidad de tejido adiposo que es menor que la cantidad total de tejido adiposo extraída de un paciente es una porción del tejido adiposo extraído.

Como se usa en el presente documento, la expresión "lipoaspirado procesado" se refiere a tejido adiposo que se ha procesado para separar el componente celular activo (por ejemplo, el componente que contiene regeneración) de los  
15 adipocitos maduros y el tejido conectivo. Esta fracción se denomina en el presente documento como "células derivadas de adiposo" o "ADC". Típicamente, ADC se refiere al sedimento de células regenerativas obtenido lavando y separando y concentrando las células del tejido adiposo. El sedimento se obtiene típicamente por centrifugación de una suspensión de células de manera que las células se agregan en el fondo de una cámara de centrifuga o concentrador de células.

20 Como se usa en el presente documento, los términos "administración", "introducción", "entrega", "colocación" y "transplante" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a la colocación, tal como, por ejemplo, en cada caso, mediante inyección, de las células regenerativas de la invención en un sujeto por un método o ruta que da como resultado una localización al menos parcial de las células regenerativas en un sitio deseado. Las  
25 células regenerativas se pueden administrar por cualquier ruta apropiada que da como resultado el suministro a una ubicación deseada en el sujeto donde al menos una porción de las células o componentes de las células permanecen viables. El período de viabilidad de las células después de la administración a un sujeto puede ser tan corto como unas pocas horas, por ejemplo, veinticuatro horas, hasta unos pocos días, hasta varios años.

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

Como se usa en el presente documento, "dosis terapéuticamente eficaz de células regenerativas" se refiere a una cantidad de células regenerativas que son suficientes para producir un efecto clínico beneficioso o deseado. Dicha  
35 dosis podría administrarse en una o más administraciones. Sin embargo, la determinación precisa de lo que se consideraría una dosis eficaz puede basarse en factores individuales para cada paciente, incluyendo, pero sin limitación, la edad del paciente, el tamaño, el tipo o la extensión de la enfermedad, la fase de la enfermedad, la vía de administración de las células regenerativas, el tipo o extensión de la terapia suplementaria utilizada, el proceso de enfermedad en curso y el tipo de tratamiento deseado (por ejemplo, tratamiento agresivo frente a tratamiento  
40 convencional).

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" incluye animales de sangre caliente, preferiblemente mamíferos, incluyendo seres humanos. En una realización preferida, el sujeto es un primate. En una realización aún  
45 más preferida, el sujeto es un ser humano.

Como se ha expuesto anteriormente en el presente documento, las células regenerativas, por ejemplo, las células madre y progenitoras, se pueden recoger de una amplia diversidad de tejidos. El sistema de la presente invención puede usarse para todos estos tejidos. Sin embargo, el tejido adiposo es una fuente especialmente rica de células  
50 regenerativas. Por consiguiente, el sistema de la presente invención se ilustra en el presente documento utilizando tejido adiposo como una fuente de células regenerativas a modo de ejemplo solamente y no de limitación.

El tejido adiposo se puede obtener por cualquier método conocido por un experto en la técnica. Por ejemplo, el tejido adiposo puede extraerse de un paciente por liposucción (jeringa o asistida por energía) o por lipectomía, por  
ejemplo, lipoplastia asistida por succión, lipoplastia asistida por ultrasonidos, y lipectomía excisional, o  
55 combinaciones de las mismas. El tejido adiposo se elimina y se recoge y puede procesarse de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de un sistema de la invención descrito en el presente documento. La cantidad de tejido recogido depende de numerosos factores, incluyendo el índice de masa corporal y la edad del donante, el tiempo disponible para la recolección, la disponibilidad de sitios de recolección de tejido adiposo accesibles, los medicamentos y condiciones concomitantes y preexistentes (tal como terapia anticoagulante), y el fin clínico para el

cual se extrae el tejido. Por ejemplo, el porcentaje de células regenerativas de 100 ml de tejido adiposo extraído de un individuo delgado es mayor que el extraído de un donante obeso (Tabla 1). Esto probablemente refleja un efecto dilutivo del aumento del contenido de grasa en el individuo obeso. Por lo tanto, puede ser deseable, de acuerdo con un aspecto de la invención, obtener cantidades mayores de tejido de los donantes con sobrepeso en comparación con las cantidades que se extraerán de los pacientes más delgados. Esta observación también indica que la utilidad de esta invención no se limita a individuos con grandes cantidades de tejido adiposo.

Tabla 1: Efecto del índice de masa corporal sobre el tejido y el rendimiento celular

Estado del índice de masa corporal	Cantidad de tejido obtenido (g)	Rendimiento total de células regenerativas (x 10 <sup>7</sup> )
Normal	641 ± 142	2,1 ± 0,4
Obeso	1.225 ± 173	2,4 ± 0,5
valor de p	0,03	0,6

10 Después de que el tejido adiposo se procesa, las células regenerativas resultantes están sustancialmente libres de adipocitos maduros y tejido conectivo. Por consiguiente, el sistema de la presente invención genera una pluralidad heterogénea de células regenerativas derivadas de adiposo que pueden usarse con fines de investigación y/o terapéuticos. En una realización preferida, las células son adecuadas para su colocación o re-infusión dentro del cuerpo de un receptor. En otras realizaciones, las células pueden usarse para investigación, por ejemplo, las células  
 15 pueden usarse para establecer líneas de células madre o progenitoras que pueden sobrevivir durante largos períodos de tiempo y usarse para un estudio adicional.

A continuación se hará referencia en detalle a las realizaciones actualmente preferidas de la invención, cuyos ejemplos se ilustran en los dibujos adjuntos. Siempre que sea posible, se utilizan los mismos números de referencia  
 20 o similares en los dibujos y la descripción para referirse a las mismas o partes similares. Debe observarse que los dibujos están en forma simplificada y no son de escala precisa. En referencia a la divulgación del presente documento, sólo para fines de conveniencia y claridad, los términos direccionales, tales como, parte superior, fondo, izquierda, derecha, arriba, abajo, sobre, por encima, por debajo, abajo, posterior, frontal, distal y proximal se usan con respecto a los dibujos adjuntos. Dichos términos direccionales no deben interpretarse para limitar el alcance de  
 25 la invención de ninguna manera.

Haciendo referencia ahora a las figuras, un sistema 10 de la presente invención está compuesto generalmente por una o más de una cámara de recogida de tejido 20, una cámara de procesamiento 30, una cámara de desecho 40, una cámara de salida 50 y una cámara de muestra 60. Las diversas cámaras están acopladas entre sí a través de  
 30 uno o más conductos 12 de tal forma que los fluidos que contienen material biológico pueden pasar de una cámara a otra mientras se mantiene una trayectoria de fluido/tejido estéril cerrada. Los conductos pueden comprender cuerpos rígidos o flexibles denominados en el presente documento de manera intercambiable como lúmenes y tubos, respectivamente. En ciertas versiones, los conductos están en forma de tubos flexibles, tales como tubos de polietileno usados convencionalmente en entornos clínicos, silicona o cualquier otro material conocido en la técnica.  
 35 Los conductos 12 pueden variar en tamaño dependiendo de si se desea el paso de fluido o tejido. Los conductos 12 también pueden variar en tamaño dependiendo de la cantidad de tejido o fluido que se hace circular a través del sistema. Por ejemplo, para el paso de fluido, los conductos pueden tener un diámetro que varía de aproximadamente 0,060 a aproximadamente 0,750 pulgadas y para el paso de tejido, los conductos pueden tener un diámetro que varía de 0,312 a 0,750 pulgadas. Generalmente, el tamaño de los conductos se selecciona para equilibrar el  
 40 volumen que los conductos pueden alojar y el tiempo requerido para transportar el tejido o fluidos a través de dichos conductos. En versiones automatizadas del sistema, los parámetros anteriores, es decir, el volumen y el tiempo de transporte, deben identificarse de tal manera que las señales apropiadas puedan ser transmitidas al dispositivo de procesamiento del sistema. Esto permite que el dispositivo mueva volúmenes precisos de líquido y tejido de una cámara a otra. El tubo flexible utilizado debe ser capaz de soportar la presión negativa para reducir la probabilidad  
 45 de colapso. El tubo flexible utilizado debe ser también capaz de soportar una presión positiva que se genera, por ejemplo; una bomba de desplazamiento positivo, que puede utilizarse en el sistema.

Todas las cámaras del sistema pueden estar compuestas por uno o más puertos, por ejemplo, puertos de salida 22 o de entrada 21, que aceptan conexiones de tubos de jeringa estándar IV y succión. Los puertos pueden ser un  
 50 puerto sellado, tal como un puerto de acceso de aguja de jeringa cerrada por un tapón de caucho 51. Los puertos de entrada pueden acoplarse a una o más cánulas (no mostradas) a través de conductos. Por ejemplo, un puerto de entrada de tejido 21 puede acoplarse a una cánula integrada de liposucción de uso único y el conducto puede ser un tubo flexible. Los conductos están colocados generalmente para proporcionar pasos de fluido desde una cámara del sistema a otra. Con este fin, los conductos y puertos pueden acoplarse, por ejemplo, a un dispositivo de succión (no

mostrado) que puede accionarse manual o automáticamente. El dispositivo de succión puede ser, por ejemplo, una jeringa o una bomba eléctrica. El dispositivo de succión debe ser capaz de proporcionar una presión negativa suficiente para aspirar el tejido de un paciente. Generalmente, puede usarse cualquier dispositivo de succión adecuado conocido por un experto en la técnica, por ejemplo, un cirujano.

5

Los conductos 12 pueden comprender además una o más abrazaderas (no mostradas) para controlar el flujo de material entre diversos componentes del sistema. Las abrazaderas son útiles para mantener la esterilidad del sistema sellando eficazmente diferentes regiones del sistema. Como alternativa, los conductos 12 pueden comprender una o más válvulas 14 que controlan el flujo de material a través del sistema. Las válvulas 14 se identifican como círculos de color blanco en las figuras. En versiones preferidas, las válvulas pueden ser válvulas de pinza electromecánicas. En otra versión, las válvulas pueden ser válvulas neumáticas. En otras versiones, las válvulas pueden ser válvulas hidráulicas o válvulas mecánicas. Dichas válvulas se activan preferentemente mediante un sistema de control que se puede acoplar a palancas. Las palancas se pueden manipular manualmente de tal manera que las palancas se activan. En las versiones automatizadas, el sistema de control puede acoplarse a las palancas, así como a un dispositivo de procesamiento que puede activar las válvulas en condiciones de activación predeterminadas. En ciertas versiones automatizadas, la activación de las válvulas puede ser parcialmente automatizada y estar parcialmente sujeta a la preferencia del usuario de tal manera que el proceso pueda ser optimizado. En otras versiones, ciertas válvulas pueden ser activadas manualmente y otras automáticamente a través del dispositivo de procesamiento. Las válvulas 14 también pueden usarse conjuntamente con una o más bombas, por ejemplo, bombas peristálticas 34 o bombas de desplazamiento positivo (no mostradas). Los conductos 12 y/o las válvulas 14 también pueden comprender sensores 29, por ejemplo, sensores ópticos, sensores ultrasónicos, sensores de presión u otras formas de monitores conocidos en la técnica capaces de distinguir entre los diversos componentes fluidos y niveles de fluido que fluyen a través del sistema. En una versión preferida, los sensores 29 pueden ser sensores ópticos.

25

El sistema puede incluir también una pluralidad de filtros 36. En ciertas versiones, los filtros pueden estar dentro de una cámara del sistema 28. Diferentes cámaras dentro del sistema pueden estar compuestas por diferentes filtros. Los filtros son eficaces para separar las células regenerativas, por ejemplo, células madre y/o células progenitoras, de células indeseables y agentes de desagregación que pueden usarse de acuerdo con el sistema. En una versión, un conjunto de filtro 36 incluye un dispositivo de filtración de fibras huecas. En otra versión, un conjunto de filtro 36 incluye un dispositivo de filtración por percolación, que puede usarse o no con un proceso de sedimentación. En una versión adicional, el conjunto de filtro 36 comprende un dispositivo de centrifugación, que puede usarse o no con un dispositivo y proceso de elutriación. En otra versión más, el sistema comprende una combinación de estos dispositivos de filtrado. Las funciones de filtración de la presente invención pueden ser dobles, eliminando algunos filtros las cosas de la concentración final tales como colágeno, lípido libre, adipocitos libres y colagenasa residual, y siendo otros filtros utilizados para concentrar el producto final. Los filtros del sistema pueden estar compuestos por una pluralidad de poros que varían en diámetros y/o longitudes de 20 a 800  $\mu\text{m}$ . En una versión preferida, la cámara de recogida 20 tiene un filtro prefijado 28 con una pluralidad de poros que varían de 80 a 400  $\mu\text{m}$ . En otra versión preferida, la cámara de recogida 20 tiene un filtro prefijado 28 con una pluralidad de poros de 265  $\mu\text{m}$ . En otras versiones, los filtros pueden ser extraíbles y/o desechables.

El sistema también puede estar compuesto por uno o más dispositivos de control de temperatura (no mostrados) que se sitúan para ajustar la temperatura del material contenido dentro de una o más cámaras del sistema. El dispositivo de control de temperatura puede ser un calentador, un enfriador o ambos, es decir, puede ser capaz de conmutar entre un calentador y un enfriador. El dispositivo de temperatura puede ajustar la temperatura de cualquiera de los materiales que pasan a través del sistema, incluyendo el tejido, los agentes de desagregación, los agentes de resuspensión, los agentes de aclarado, los agentes de lavado o los aditivos. Por ejemplo, el calentamiento del tejido adiposo facilita la desagregación, mientras que el enfriamiento de la producción de células regenerativas es deseable para mantener la viabilidad. Además, si se necesitan reactivos precalentados para un procesamiento óptimo del tejido, el papel del dispositivo de temperatura será mantener la temperatura predeterminada en lugar de aumentar o disminuir la temperatura.

Para mantener una trayectoria de fluido/tejido estéril cerrada, todos los puertos y válvulas pueden comprender un cierre que mantiene la configuración sellada del sistema. El cierre puede ser una membrana que sea impermeable a fluidos, aire y otros contaminantes, o puede ser cualquier otro cierre adecuado conocido en la técnica. Además, todos los puertos del sistema pueden diseñarse de tal manera que puedan alojar jeringas, agujas u otros dispositivos para retirar los materiales en las cámaras sin comprometer la esterilidad del sistema.

Como se expone en el presente documento, el tejido puede extraerse de un paciente a través de cualquier método

reconocido en la técnica. El tejido aspirado puede extraerse antes de ponerse en el sistema para su procesamiento. El tejido aspirado se transfiere típicamente a la cámara de recogida 20 a través de los conductos 12 por un puerto de entrada sellado, tal como un puerto de acceso de aguja de jeringa cerrado con un tampón de caucho (no mostrado en la cámara de recogida). Como alternativa, la etapa de extracción de tejido puede ser parte del sistema. Por ejemplo, la cámara de recogida 20 puede estar compuesta por una línea de vacío 11 que facilita la eliminación de tejido usando una cánula estándar insertada en el paciente. Por lo tanto, en esta versión, todo el sistema está unido al paciente. El tejido puede introducirse en la cámara de recogida 20 a través de un puerto de entrada 21 a través de un conducto tal como 12a que son parte de una trayectoria estéril cerrada. La cámara de recogida 20 puede estar compuesta por una pluralidad de recipientes o cilindros flexibles o rígidos o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la cámara de recogida 20 puede estar compuesta por uno o más recipientes rígidos de tamaños variables. La cámara de recogida 20 también puede comprender una o más bolsas flexibles. En tales sistemas, la bolsa está preferiblemente dotada de un soporte, tal como en un bastidor interno o externo, que ayuda a reducir la probabilidad de que la bolsa se colapse tras la aplicación de succión a la bolsa. La cámara de recogida 20 está dimensionada para contener la cantidad requerida de solución salina para lavar adecuadamente y desagregar el tejido antes de la fase de lavado y concentrado del proceso realizado en la cámara de procesamiento 30. Preferiblemente, el volumen de tejido o fluido presente en la cámara de recogida 20 es fácilmente determinable a simple vista. Por ejemplo, para obtener células regenerativas a partir del tejido adiposo, una cámara de recogida adecuada tiene la capacidad de contener 800 ml de lipoaspirado y 1200 ml de solución salina. Por consiguiente, en una versión, la cámara de recogida 20 tiene una capacidad de al menos 2 litros. En otra versión, para separar y concentrar los glóbulos rojos de la sangre, la cámara de recogida 20 tiene una capacidad de al menos 1,5 litros. Generalmente, el tamaño de la cámara de recogida 20 variará dependiendo del tipo y cantidad de tejido recogido del paciente. La cámara de recogida 20 puede estar dimensionada para contener tan poco como aproximadamente 5 ml hasta aproximadamente 2 litros de tejido. Para volúmenes de tejido más pequeños, por ejemplo, de 5 ml a 100 ml, el tejido puede recogerse en una jeringa antes de transferirse a la cámara de recogida 20.

La cámara de recogida 20 puede construirse utilizando cualquier material biocompatible adecuado que pueda ser esterilizado. En una versión preferida, la cámara de recogida 20 está construida de material desechable que cumple los requisitos de biocompatibilidad para el contacto intravascular tal como se describe en la norma ISO 10993. Por ejemplo, pueden usarse policarbonato acrílico o ABS. El trayecto del fluido de la cámara de recogida 20 está preferiblemente exento de pirógeno, es decir, adecuado para el uso de sangre sin peligro de transmisión de la enfermedad. En una versión, la cámara de recogida 20 está construida por un material que permite al usuario determinar visualmente el volumen aproximado de tejido presente en la cámara. En otras versiones, el volumen de tejido y/o fluido en la cámara de recogida 20 está determinado por los sensores automatizados 29. La cámara de recogida 20 está preferiblemente diseñada de tal forma que en una versión automatizada, el sistema pueda determinar el volumen de tejido y/o fluido dentro de la cámara con un grado de precisión razonable. En una versión preferida, el sistema detecta el volumen dentro de la cámara de recogida con una precisión de más o menos el quince por ciento.

En una versión particular proporcionada sólo a título de ejemplo, la cámara de recogida 20 tiene forma de una cámara rígida, por ejemplo, una cámara construida de un policarbonato de calidad médica que contiene un filtro prefijado aproximadamente cónico 28 de poliéster de calidad médica con un tamaño de malla de 265  $\mu\text{m}$  (véase la figura 5). El recipiente de recogida de tejido rígido puede tener un tamaño de aproximadamente ocho pulgadas de alto y aproximadamente cinco pulgadas de diámetro; el espesor de pared puede ser de aproximadamente 0,125 pulgadas. Se puede acceder al interior del cilindro a través de, por ejemplo, uno o más puertos para tubería de succión, uno o más puertos con tubos para conexión a través de una tecnología de acoplamiento estéril, y/o uno o más puertos para el acceso de punción por aguja a través del tapón de caucho. El filtro prefijado 28 en el interior de la cámara de recogida 20 está preferiblemente estructurado para retener el tejido adiposo y dejar pasar el tejido no adiposo a medida que, por ejemplo, los tejidos se extraen del paciente. Más específicamente, el filtro 28 puede permitir el paso de lípido libre, sangre y solución salina, al tiempo que retiene fragmentos de tejido adiposo durante, o en otra versión después de la recogida inicial del tejido adiposo. A este respecto, el filtro 28 incluye una pluralidad de poros, de tamaños iguales o diferentes, pero que varían en tamaño de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$  a 5 mm. En una versión preferida, el filtro 28 incluye una pluralidad de poros de 400  $\mu\text{m}$ . En una versión preferida, el filtro 28 es una malla de poliéster de calidad médica de aproximadamente 200  $\mu\text{m}$  de espesor con un tamaño de poro de aproximadamente 265  $\mu\text{m}$  y aproximadamente el 47 % de área abierta. Este material contiene el tejido durante el aclarado, pero permite que las células pasen a través de la malla después de la desagregación tisular. Por lo tanto, cuando los tejidos son aspirados del paciente, el tejido no adiposo puede separarse del tejido adiposo. La misma funcionalidad podría lograrse con diferentes materiales, tamaño de malla, y el número y tipo de puertos. Por ejemplo, los tamaños de poro de malla menores de 100  $\mu\text{m}$  o tan grandes como varios miles de micrómetros lograrán el mismo fin de permitir el paso de la solución salina y las células sanguíneas mientras que se retienen los agregados y

fragmentos de tejido adiposo. De forma similar el mismo propósito podría lograrse mediante el uso de un material plástico rígido alternativo, o por muchas otras modificaciones que serán conocidas por los expertos en la técnica.

El sistema 10 puede comprender también una o más fuentes de solución 22. La fuente de solución puede comprender una fuente de solución de lavado 23, y una fuente de agente de desagregación tisular 24, tal como colagenasa. La cámara de recogida 20 está compuesta por trayectorias de fluido cerradas que permiten que las soluciones o agentes de lavado y desagregación se añadan al tejido de una manera aséptica.

Los recipientes para la solución de lavado 23 y los agentes de desagregación 24 pueden ser cualquier recipiente adecuado que pueda contener su contenido de una manera estéril, por ejemplo, una bolsa plegable, tal como una bolsa IV usada en entornos clínicos. Estos recipientes pueden tener conductos 12, tales como el conducto 12e, acoplados a la cámara de recogida 20 de manera que la solución de lavado y el agente de desagregación puedan entregarse al interior de la cámara de recogida 20. La solución de lavado y el agente de desagregación pueden suministrarse al interior de la cámara de recogida 20 a través de cualquier forma reconocida en la técnica, incluyendo una presión de gravedad simple aplicada al exterior de los recipientes para la solución salina 23 y/o los agentes de desagregación 24 o mediante la colocación de una bomba de desplazamiento positivo en los conductos, por ejemplo, el conducto 12d en la figura 4. En las versiones automatizadas, el dispositivo de procesamiento del sistema calcula diversos parámetros, por ejemplo, el volumen de solución salina y el tiempo o número de ciclos requeridos para el lavado, así como la concentración o cantidad de agente de desagregación y el tiempo requerido para la desagregación en base a la información inicialmente ingresada por el usuario (por ejemplo, volumen de tejido que se está procesando). Como alternativa, las cantidades, tiempos, etc., pueden manipularse manualmente por el usuario.

El tejido y/o fluido dentro de la cámara de recogida debe mantenerse a una temperatura que varía de 30 grados Celsius a 40 grados Celsius. En una versión preferida, la temperatura de la suspensión dentro de la cámara de recogida se mantiene a 37 grados Celsius. En ciertas versiones, si el procedimiento quirúrgico o la aplicación terapéutica necesitan retrasarse, el tejido seleccionado puede almacenarse en la cámara de recogida para su uso posterior. El tejido se puede almacenar a temperatura ambiente o aproximadamente a aproximadamente 4 grados Celsius durante un máximo de 96 horas.

La solución de lavado puede ser cualquier solución conocida por un experto en la técnica, incluyendo una solución salina o cualquier otra solución electrolítica tamponada o no tamponada. Los tipos de tejido que se procesan dictarán los tipos o combinaciones de soluciones de lavado utilizadas. Típicamente, la solución de lavado, tal como una solución salina, entra en la cámara de recogida 20 después de que el tejido adiposo se ha extraído del paciente y se ha colocado en la cámara de recogida. Sin embargo, la solución de lavado puede suministrarse a la cámara de recogida 20 antes de extraer el tejido adiposo, o puede suministrarse a la cámara de recogida 20 simultáneamente con el tejido adiposo. En la cámara de recogida 20, la solución de lavado y el tejido adiposo extraído pueden mezclarse por cualquier medio incluyendo los métodos descritos a continuación.

Por ejemplo, el tejido puede lavarse por agitación (lo que maximiza la viabilidad celular y minimiza la cantidad de lípido libre liberado). En una versión, el tejido se agita girando toda la cámara de recogida 20 a través de un arco de grados variables (por ejemplo, a través de un arco de aproximadamente 45 grados a aproximadamente 90 grados) a velocidades variables, por ejemplo, aproximadamente 30 revoluciones por minuto. En otras versiones, el tejido se agita girando toda la cámara de recogida 20, donde la cámara de recogida 20 está compuesta por una o más paletas o salientes fijados rígidamente a una superficie interior de la cámara de recogida, a través de un arco de grados variables (por ejemplo, a través de un arco de aproximadamente 45 grados a aproximadamente 90 grados) a velocidades variables, por ejemplo, aproximadamente 30 revoluciones por minuto. La rotación de la cámara de recogida 20 descrita anteriormente puede conseguirse mediante un mecanismo de accionamiento unido a, o en proximidad, con la cámara de recogida 20. El mecanismo de accionamiento puede ser una simple correa o engranaje, u otro mecanismo de accionamiento conocido en la técnica. La velocidad de la rotación puede ser, por ejemplo, 30 revoluciones por minuto. Generalmente, se han encontrado velocidades más altas para generar mayores volúmenes de lípidos libres y pueden no ser óptimas.

En otras versiones, el tejido se agita colocando un eje giratorio 25 dentro de la cámara de recogida 20, en la que el eje giratorio está compuesto por una o más paletas 25a o salientes fijados rígidamente al eje giratorio 25 que pasan a través de la mezcla a medida que el eje se gira. En ciertas versiones, el eje giratorio 25 con paletas fijadas de forma rígida 25a puede descansar sobre el fondo de la cámara de recogida 20. Esto puede lograrse, por ejemplo, colocando el dispositivo tipo paleta en un campo magnético giratorio (por ejemplo, agitador magnético). Como alternativa, la agitación del tejido puede llevarse a cabo utilizando un simple agitador conocido en la técnica, es

decir, un dispositivo que implementa la agitación arriba y abajo sin rotación. El tejido también puede lavarse usando cualquier otro medio reconocido en la técnica, incluyendo el balanceo, la agitación, la inversión, etc.

Después de una cantidad deseada de ciclos de lavado, se puede suministrar un agente de desagregación de tejidos a la cámara de recogida 20 para separar las células regenerativas de los restantes componentes de tejido adiposo. El agente de desagregación puede ser cualquier agente de desagregación conocido por un experto en la técnica. Los agentes de desagregación que se pueden usar incluyen proteasas neutras, colagenasa, tripsina, lipasa, hialuronidasa, desoxirribonucleasa, miembros de la familia de mezclas de enzimas Blendzyme, por ejemplo Liberasa H1, pepsina, energía ultrasónica u otra energía física, láseres, microondas, otros dispositivos mecánicos y/o combinaciones de los mismos. Un agente de desagregación preferido de la invención es la colagenasa. Los agentes de desagregación se pueden añadir con otras soluciones. Por ejemplo, la solución salina, tal como solución salina suministrada desde una fuente salina 23 como se ha descrito anteriormente, se puede añadir al tejido adiposo junto con o inmediatamente seguido de la adición de colagenasa. En una versión, el tejido adiposo lavado se mezcla con una solución enzimática que contiene colagenasa a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 20-60 minutos. En otras versiones, se puede añadir una concentración más alta de colagenasa o agente similar para disminuir el tiempo de digestión. El tejido adiposo lavado y el agente de desagregación tisular se pueden agitar entonces de manera similar a los métodos de agitación descritos anteriormente, hasta que se desagrega el tejido adiposo lavado. Por ejemplo, el tejido adiposo lavado y el agente de desagregación tisular pueden agitarse haciendo girar la cámara de recogida entera a través de un arco de aproximadamente 90 grados, teniendo un eje que contiene una o más paletas que pasan a través de la solución a medida que el eje gira, y/o girando toda la cámara de recogida que contiene paletas o salientes sobre la superficie interior de la cámara de recogida.

Dependiendo del propósito para el cual se usarán las células derivadas de tejido adiposo, el tejido adiposo puede estar desagregado parcialmente, o completamente desagregado. Por ejemplo, en versiones en las que las células derivadas del adiposo deben combinarse con una unidad de tejido adiposo, puede ser deseable desagregar parcialmente el tejido adiposo cosechado, eliminar una porción del tejido adiposo parcialmente desagregado, y luego continuar desagregando la porción restante de tejido adiposo que queda en la cámara de recogida. Como alternativa, una parte del tejido adiposo lavado puede retirarse y dejarse apartado en un recipiente de muestras antes de cualquier digestión. En otra versión, el tejido adiposo cosechado se desagrega parcialmente para concentrar las células antes de reintroducirse de nuevo en el paciente. En una versión, el tejido adiposo se mezcla con un agente de desagregación de tejidos durante un periodo de tiempo generalmente inferior a aproximadamente 20 minutos. Una porción del tejido parcialmente desagregado puede entonces retirarse de la cámara de recogida, y el tejido restante parcialmente desagregado puede desagregarse adicionalmente mezclando el tejido adiposo con un agente de desagregación de tejidos durante 40 minutos más. Cuando las células derivadas del adiposo se van a utilizar como una población esencialmente pura de células regenerativas, el tejido adiposo puede desagregarse totalmente.

Después de la digestión, se deja reposar el tejido y la solución del agente de desagregación durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que los componentes flotantes y no flotantes de la solución se diferencien dentro de la cámara de recogida. Típicamente, el tiempo varía de aproximadamente 15 segundos a varios minutos, pero otras veces puede implementarse en versiones modificadas. La capa flotante está compuesta por las células regenerativas que requieren un mayor lavado y concentración. La capa no flotante comprende sangre, colágeno, lípidos y otros componentes celulares no regenerativos del tejido. La capa no flotante debe extraerse a la cámara de desecho.

Por consiguiente, la cámara de recogida 20 está compuesta preferiblemente por un puerto de salida 22 en el punto más bajo de la cámara de tal manera que la sangre y otros componentes no flotantes del tejido pueden drenarse a uno o más recipientes de desecho 40 a través de uno o más conductos 12. La cámara de recogida 20 está generalmente en (o puede colocarse en) una posición vertical de tal forma que los puertos de salida 22 están situados en el fondo de la cámara de recogida. El drenaje puede ser pasivo o activo. Por ejemplo, los componentes no flotantes descritos anteriormente podrían drenarse usando la gravedad, aplicando presión positiva o negativa, mediante el uso de bombas 34 o mediante el uso de salidas de aire 32. En las versiones automatizadas, el dispositivo de procesamiento puede indicar ciertas válvulas y/o bombas para drenar la capa no flotante de la cámara de recogida 20. Las versiones automatizadas también pueden estar compuestas por sensores 29 que pueden detectar cuando se ha alcanzado la interfaz entre los líquidos flotantes y no flotantes. Las versiones automatizadas también pueden estar compuestas por un sensor 29, por ejemplo, un sensor óptico, que puede ser capaz de detectar un cambio en la refracción de la luz del efluente que fluye en el conducto que sale de la cámara de recogida. El cambio apropiado en la refracción de la luz puede indicar la presencia de la capa flotante en los conductos salientes que indica que la capa no flotante se ha drenado. El sensor 29 puede entonces señalar el dispositivo de

procesamiento para proceder con la siguiente etapa.

Sin embargo, en ciertas versiones, el tejido puede procesarse para recuperar el componente celular no regenerativo del tejido. Por ejemplo, en ciertas aplicaciones terapéuticas o de investigación, pueden ser deseados colágeno, 5 proteínas, componentes de matriz o estromales, lípidos, adipocitos u otros componentes del tejido. En tales versiones, es la capa flotante que comprende las células regenerativas que se deben retirar como se ha descrito anteriormente a la cámara de desecho. La capa no flotante es entonces retenida en el sistema para su procesamiento adicional según sea necesario.

10 Una vez que se ha eliminado la capa no flotante, la capa boyante que comprende las células regenerativas puede lavarse una o más veces para eliminar contaminantes residuales. Por consiguiente, la cámara de recogida 20 incluye típicamente uno o más puertos 21 para permitir que la solución de lavado sea suministrada al interior de la cámara, y uno o más puertos 22 para permitir que los residuos y otros materiales sean dirigidos hacia fuera desde la cámara de recogida 20. Por ejemplo, la cámara de recogida puede incluir uno o más puertos de entrada sellados como se describe en el presente documento. La cámara de recogida 20 puede incluir también una o más tapas (no 15 mostradas), tales como una tapa superior y una tapa inferior para asegurar además que el sistema permanezca estéril mientras la solución de lavado es suministrada dentro de la cámara de recogida y/o los residuos son transportados. Los puertos 21 pueden proporcionarse en las tapas de la cámara de recogida o en una pared lateral de la cámara de recogida.

20 El proceso de lavado con solución de lavado recién preparada puede repetirse hasta que el contenido residual de contaminantes no flotantes en la solución alcance un nivel predeterminado. En otras palabras, el material restante en la cámara de recogida 20, que comprende el material flotante de la mezcla descrita anteriormente, incluyendo fragmentos de tejido adiposo, puede lavarse una o más veces adicionales hasta que la cantidad de material no deseado se reduce a un nivel predeterminado deseado. Un método para determinar el punto final del lavado es 25 medir la cantidad de glóbulos rojos en la solución de tejido. Esto puede lograrse midiendo la luz absorbida en la longitud de onda de 540 nm. En una versión preferida, se considera aceptable un intervalo entre aproximadamente 0,546 y aproximadamente 0,842.

30 Durante el lavado y/o la desagregación, se pueden añadir uno o más aditivos a los diversos recipientes según sea necesario para mejorar los resultados. Algunos ejemplos de aditivos incluyen agentes que optimizan el lavado y la desagregación, aditivos que aumentan la viabilidad de la población celular activa durante el procesamiento, agentes antimicrobianos (por ejemplo, antibióticos), aditivos que lisan los adipocitos y/o glóbulos rojos, o aditivos que 35 enriquecen las poblaciones celulares de interés (por adherencia diferencial a restos de fase sólida o para promover de otro modo la reducción sustancial o el enriquecimiento de las poblaciones celulares). Otros posibles aditivos incluyen aquellos que promueven la recuperación y la viabilidad de células regenerativas (por ejemplo, inhibidores de caspasa) o que reducen la probabilidad de reacción adversa en la infusión o emplazamiento (por ejemplo, inhibidores de la reagregación de células o tejido conectivo).

40 Después de que haya transcurrido un tiempo de sedimentación suficiente, la fracción no flotante de la mezcla resultante de fragmentos de tejido adiposo lavados y agentes de desagregación tisular contendrá células regenerativas, por ejemplo, células madre y otras células progenitoras derivadas de adiposo. Como se analiza en el presente documento, la fracción no flotante que contiene las células regenerativas se transferirá a la cámara de procesamiento 30 en la que las células regenerativas de interés, tales como las células madre derivadas de tejido 45 adiposo, se separarán de otras células y materiales presentes en la fracción no flotante de la mezcla. Esta fracción no flotante se denomina en el presente documento como la composición de células regenerativas y comprende múltiples tipos diferentes de células, incluyendo células madre, células progenitoras, células precursoras endoteliales, adipocitos y otras células regenerativas descritas en el presente documento. La composición de células regenerativas puede contener también uno o más contaminantes, tales como colágeno y otras proteínas de tejido 50 conectivo y fragmentos de las mismas, que estaban presentes en los fragmentos de tejido adiposo, o colagenasa residual del proceso de desagregación tisular.

La cámara de procesamiento 30 de la invención se sitúa preferiblemente dentro del sistema de tal manera que la composición de células regenerativa se mueve de la cámara de recogida 20 a la cámara de procesamiento 30 por medio del tubo 12, las válvulas 14 y la bomba 34 de una manera estéril. La cámara de procesamiento está 55 dimensionada para acomodar mezclas de tejido/fluido que varían de 10 ml a 1,2 l. En una versión preferida, la cámara de procesamiento está dimensionada para acomodar 800 ml. En ciertas versiones, toda la composición de células regenerativas procedente de la cámara de recogida 20 se dirige a la cámara de procesamiento 30. Sin embargo, en otras versiones, una parte de la composición de células regenerativas se dirige a la cámara de

procesamiento 30, y otra parte se dirige a una región diferente del sistema, por ejemplo, la cámara de muestras 60, para recombinarse con células procesadas en la cámara de procesamiento 30 en un momento posterior.

- La cámara de procesamiento 30 puede construirse utilizando cualquier material biocompatible adecuado que pueda ser esterilizado. En una versión preferida, la cámara de procesamiento 30 está construida de material desechable que cumple los requisitos de biocompatibilidad para el contacto intravascular tal como se describe en la norma ISO 10993. Por ejemplo, se pueden usar policarbonato, acrílico, ABS, copolímeros de etileno y acetato de vinilo o estireno-butadieno (SBC). En otra versión, la trayectoria de fluido de la cámara de procesamiento desechable está libre de pirógenos. La cámara de procesamiento puede estar en forma de una bolsa de plástico, tal como las utilizadas convencionalmente en el procesamiento de sangre en bancos de sangre; o en otras versiones, puede ser estructuralmente rígida (figura 6). En una versión, la cámara de procesamiento 30 puede ser similar a la cámara de procesamiento desvelada en la Solicitud de Estados Unidos de propiedad común n.º 10/316.127, presentada el 7 de diciembre de 2001, y la solicitud de Estados Unidos n.º 10/325.728, presentada el 20 de diciembre de 2002.
- La cámara de procesamiento 30 puede estar construida de cualquier manera adecuada para separar y concentrar las células, incluyendo la filtración y centrifugación y/o combinaciones de las mismas. En ciertas versiones, la composición de células regenerativas de la cámara de recogida 20 se introduce en la cámara de procesamiento 30, donde la composición puede filtrarse para separar y/o concentrar una población de células regenerativas particular. La filtración celular es un método para separar componentes y células particulares de otros componentes o tipos de células diferentes. Por ejemplo, la composición de células regenerativas de la invención comprende múltiples tipos diferentes de células, incluyendo células madre, células progenitoras y adipocitos, así como uno o más contaminantes, tales como colágeno, que estaban presentes en los fragmentos de tejido adiposo o colagenasa residual del proceso de desagregación tisular. Los filtros 36 presentes en la cámara de procesamiento 30 pueden permitir la separación y concentración de una subpoblación particular de células regenerativas, por ejemplo, células madre o células progenitoras endoteliales, etc.

Algunas variables que están asociadas con la filtración de células a partir de un líquido incluyen, pero no se limitan a, tamaño de poro del medio filtrante, geometría (forma) del poro, área superficial del filtro, dirección del flujo de la solución que se filtra, presión transmembrana, dilución de la población celular particular, tamaño y forma de las partículas, así como el tamaño celular y la viabilidad celular. De acuerdo con la divulgación en el presente documento, las células particulares que se desea separar o filtrar son típicamente células madre derivadas de tejido adiposo. Sin embargo, en ciertas versiones, las células particulares pueden incluir células progenitoras derivadas de tejido adiposo, tales como células precursoras endoteliales, en solitario o en combinación con las células madre.

- La composición de células regenerativas puede dirigirse a través de un conjunto de filtro, tal como el conjunto de filtro 36. En ciertas realizaciones, el conjunto de filtro 36 comprende una pluralidad de filtros que están estructurados para realizar diferentes funciones y separar la composición de células regenerativas en distintas partes o componentes. Por ejemplo, uno de los filtros puede configurarse para separar el colágeno de la composición de células regenerativa, uno de los filtros puede configurarse para separar los adipocitos y/o componentes lipídicos de la composición de células regenerativas, y uno de los filtros puede configurarse para separar las enzimas residuales, tales como el agente de desagregación tisular, de la composición de células regenerativas. En ciertas versiones, uno de los filtros es capaz de realizar dos funciones, tales como separar el colágeno y el agente de desagregación tisular de la composición. La pluralidad de filtros se disponen típicamente en serie; sin embargo, al menos una porción de los filtros también puede disponerse en paralelo. Una disposición en serie de los filtros del conjunto de filtro 36 se muestra en la figura 2. Una disposición en paralelo de los filtros del conjunto de filtro 36 se muestra en la figura 3.

En una versión, el conjunto de filtro 36 comprende un primer filtro, un segundo filtro y un tercer filtro. El primer filtro está configurado para eliminar partículas de colágeno presentes en la composición de células regenerativas. Estas partículas de colágeno son típicamente de aproximadamente 0,1 micrómetros de diámetro y pueden tener hasta 20 micrómetros de longitud. Las partículas de colágeno pueden ser de tamaños variables dependiendo de la digestión. También pueden ser fibrillas, lo que significa que tienen giros y vueltas. Cualquiera de los filtros descritos en el presente documento puede estar hecho de polietersulfona, poliéster, PTFE, polipropileno, PVDF, o posiblemente celulosa. Hay dos posibilidades para filtrar el colágeno. Una es tratar de eliminar primero las partículas más grandes, dejando pasar las células, lo que requeriría, por ejemplo, un filtro probablemente en el intervalo de 10 micrómetros. El segundo método consiste en utilizar un filtro de menor tamaño, tal como 4,5 micrómetros, con la intención de que el colágeno sea bien digerido, con el fin de atrapar las células, y dejar pasar el colágeno. Esto requeriría un medio para flotar las células de nuevo fuera del filtro. También puede haber una posibilidad de implementar un filtro que atraiga y retenga las fibras de colágeno.

El segundo filtro está configurado para eliminar los adipocitos inmaduros libres que no son flotantes en la composición de células regenerativas. En una versión, el segundo filtro puede estar construido de poliéster y tener un tamaño de poro entre aproximadamente 30 y aproximadamente 50 micrómetros con un tamaño de poro preferido de aproximadamente 40 micrómetros. Aunque se hace referencia como un segundo filtro, la colocación de dicho dispositivo puede estar en una primera posición, en lugar de una segunda, para facilitar una retirada inicial de células y partículas más grandes. El tercer filtro está configurado para eliminar la colagenasa no utilizada o residual u otro agente de desagregación de tejidos presente en la composición. En una implementación preferida, la colagenasa puede degenerar con el tiempo. En una versión, el tercer filtro comprende una pluralidad de poros que tienen un diámetro, o longitud inferior a 1  $\mu\text{m}$ . En ciertas versiones, los poros pueden tener diámetros que son menores de 1  $\mu\text{m}$ . En otras versiones, los poros tienen diámetros entre 10  $\mu\text{m}$  y 5 micrómetros. En ciertas versiones, el tercer filtro puede configurarse para concentrar la población de células regenerativas en un pequeño volumen de solución salina u otra solución de lavado, como se analiza en el presente documento. Como se prefiere actualmente, sólo el filtro final es la unidad de fibra hueca. No es necesario que ninguno de los filtros sea del tipo de fibra hueca. La unidad de fibra hueca se usa para el filtro final en una implementación preferida porque es la más eficiente en la eliminación de la colagenasa con el menor efecto perjudicial para las células regenerativas. En una versión en la que el dispositivo es una colección de artículos de libre adquisición, los tres filtros están en alojamientos separados. Es posible tener el primer y el segundo filtros combinados en un alojamiento si se utiliza una unidad de fibra hueca para el tercer filtro. Si el filtro final no es un conjunto de fibras huecas, entonces los tres filtros pueden estar contenidos en un alojamiento.

Los filtros del conjunto de filtro 36 pueden estar situados en la cámara de procesamiento 30 o pueden proporcionarse como componentes separados de la cámara de procesamiento 30. Además, los filtros del conjunto de filtro 36 pueden proporcionarse en múltiples cámaras de procesamiento o en una forma en línea. En ciertas versiones, los conductos o tubos pueden actuar como una cámara o cámaras de procesamiento. La cámara de procesamiento puede reducirse de tamaño de tal forma que se convierta en el volumen interior de los conductos que conectan los filtros. Este tipo de sistema funcionará correctamente si el volumen de la solución de tejido se dimensiona apropiadamente. Por lo tanto, los conductos pueden actuar como la cámara de procesamiento conteniendo el fluido con las células a medida que pasa a través de los filtros. Ha de tenerse cuidado para minimizar el volumen de los conductos de manera que las células/tejido no se pierdan innecesariamente en el proceso de cebado y funcionamiento del sistema.

Con referencia a la versión descrita anteriormente, la composición de células regenerativas, que contiene las células lavadas y el colágeno residual, adipocitos y/o agente de desagregación de tejido no digerido, se puede dirigir a través del primer filtro para eliminar al menos una porción de y preferiblemente sustancialmente todas las partículas de colágeno de la composición de manera que menos, y preferiblemente ninguna, partículas de colágeno estén presentes en la solución filtrada. La composición de células regenerativas filtradas que contiene los adipocitos y/o el agente de desagregación de tejido no digerido puede dirigirse entonces a través del segundo filtro para eliminar al menos una porción de y preferiblemente sustancialmente todos los adipocitos libres de la composición de células regenerativas filtradas. Posteriormente, la composición de células regenerativas filtrada dos veces, que contiene el agente de desagregación de tejido no digerido, puede dirigirse a través del tercer filtro, tal como un dispositivo de filtración de fibras huecas, como se analiza en el presente documento, para eliminar o reducir el agente de desagregación de tejido no digerido de la composición de células regenerativas.

La composición de células regenerativas filtrada tres veces (es decir, la composición que queda después de pasar a través del primer, segundo y tercer filtros) puede entonces dirigirse a múltiples salidas, que pueden incluir una porción de la cámara de procesamiento 30 que comprende múltiples salidas. Estas salidas pueden servir para mantener la presión necesaria, así como para proporcionar conexiones a través de conductos a otros recipientes que pueden incluir la cámara de recogida 20, la cámara de salida 50 y/o el recipiente de residuos 40.

En una versión, un filtro del conjunto de filtro 36 comprende un elemento de filtración de fibra hueca. O, en otras palabras, el filtro comprende una colección de tubos huecos formados con los medios filtrantes. Los ejemplos de medios filtrantes que se pueden usar con el sistema desvelado 10 incluyen polisulfona, polietersulfona o un material de éster mixto, y similares. Estas fibras huecas o tubos huecos de medios filtrantes pueden estar contenidos en un cartucho cilíndrico del conjunto de filtro 36. Los tubos o fibras individuales de medios filtrantes tienen típicamente un diámetro interior que varía de aproximadamente 0,1 mm a aproximadamente 1 mm, siendo un valor preferido de aproximadamente 0,5 mm. El diámetro y la longitud de un cartucho cilíndrico adecuado determinarán el número de tubos individuales de medios filtrantes que se pueden colocar dentro del cartucho. Un ejemplo de un cartucho de filtro de fibra hueca adecuado es el filtro de flujo tangencial FiberFlo®, catálogo n.º M-C-050-K (Minntech, Minneapolis, Minnesota). Los tamaños de poro de los medios filtrantes pueden variar entre aproximadamente 10

kiloDaltons y aproximadamente 5 micrómetros con un tamaño de poro preferido de aproximadamente 0,5 micrómetros.

En el filtro de fibra hueca, cada tubo hueco tiene un cuerpo con un primer extremo, un segundo extremo y un lumen situado en el cuerpo y que se extiende entre el primer extremo y el segundo extremo. El cuerpo de cada tubo hueco incluye una pluralidad de poros. Los poros están generalmente orientados en el cuerpo de manera que se filtra una composición de células regenerativas fluyendo a través del lumen del cuerpo, y los productos a filtrar pasan tangencialmente a través de los poros, como se muestra en la figura 12A. En otras palabras, las partículas más pequeñas en el líquido pasan tangencialmente a través de los poros en relación con el flujo de fluido a través del lumen del cuerpo. La composición con las células regenerativas pasa a través del lumen de cada tubo hueco cuando la composición está siendo filtrada. Preferiblemente, el flujo de la composición es tangencial a los poros del cuerpo de cada tubo hueco.

Mediante el uso de un flujo tangencial de fluido, la eficiencia de filtración de las células madre puede aumentarse con respecto a otras técnicas de filtración. Por ejemplo, de acuerdo con algunas técnicas de filtración, los poros del medio filtrante se colocan de tal manera que el filtro está orientado perpendicularmente al flujo del fluido de manera que el medio filtrante bloquea la trayectoria del fluido que se está filtrando, tal como se ilustra en la figura 12B. En este tipo de filtración, las partículas que se filtran de la composición de células regenerativas, por ejemplo, las células madre, tienden a acumularse en un lado del filtro y bloquean el flujo del fluido a través de los poros. Este bloqueo puede reducir la eficiencia del filtro. Además, las células se comprimen constantemente por la presión del flujo de fluido, así como por el peso de las células que se acumulan en el lado aguas arriba del filtro. Esto puede conducir a una mayor lisis de las células madre. Por lo tanto, en tales técnicas de filtración en las que el flujo de fluido es paralelo a la orientación de los poros en el filtro, tanto las células grandes como las pequeñas pueden dirigirse indeseablemente contra el medio filtrante cuando el fluido pasa a través de los poros. En consecuencia, productos más grandes en el líquido tales como células pueden bloquear los poros, disminuyendo así el efecto de filtrado y aumentando la aparición de rotura o lesión celular.

Por el contrario, en la configuración de fibra hueca del presente sistema 10, el fluido que se está filtrando fluye dentro del lumen del tubo hueco. La parte del fluido que tiene la capacidad de pasar a través de los poros del cuerpo del filtro lo hace con la ayuda de la presión positiva del fluido en el interior del cuerpo, así como una presión negativa que se aplica en el exterior del cuerpo. En esta versión, las células típicamente no se someten a la presión del flujo de fluido ni al peso de otras células, y por lo tanto, se reducen las fuerzas de cizallamiento sobre las células madre. Por lo tanto, la eficiencia y la eficacia de la filtración se pueden mejorar mediante la reducción de las velocidades de obstrucción y la reducción en la lisis celular regenerativa. Debido al tamaño de la solución salina y las moléculas de proteína no deseadas, durante la filtración, estas moléculas y otros componentes pequeños pasan a través de los poros de los cuerpos de los tubos huecos al exterior de los tubos huecos y se dirigen al recipiente de residuos 40. En una versión, la filtración se mejora mediante la generación de un vacío en el exterior de los medios filtrantes de tubo hueco. Debido al tamaño de las células regenerativas, por ejemplo, células madre o células progenitoras, estas células típicamente no pueden pasar a través de los poros del cuerpo y, por lo tanto, permanecen en el interior del filtro de tubo hueco (por ejemplo, en los lúmenes de los tubos) y se dirigen de nuevo a la cámara de procesamiento 30 a través de un conducto entre el filtro y la cámara de procesamiento, o a la cámara de salida 50.

En una versión específica, el filtro de fibra hueca tiene un tamaño de poro de aproximadamente 0,05 micrómetros, y contiene aproximadamente 550 cm<sup>2</sup> de área superficial de los medios filtrantes. Un tubo de medio individual tiene típicamente un diámetro de aproximadamente 0,5 mm. En el procesamiento de 130 ml de la composición de células regenerativas, se pueden añadir aproximadamente 120 ml de solución salina adicional a la composición. El tiempo de procesamiento o filtro puede ser de aproximadamente 8 minutos. La diferencia de las presiones a cada lado del cuerpo del tubo de fibra hueca (por ejemplo, la presión dentro del lumen del cuerpo, y fuera del cuerpo) se considera la presión transmembrana. La presión transmembrana puede variar entre aproximadamente 1 mmHg y aproximadamente 500 mmHg, siendo la presión preferida aproximadamente 200 mmHg. La recuperación y viabilidad celular promedio de células nucleadas usando filtración de fibras huecas puede ser de aproximadamente el 80 % de células viables.

La cantidad de colagenasa que típicamente se elimina en tal sistema equivale a una reducción de tres log. Por ejemplo, si la concentración inicial de colagenasa en la composición de células regenerativas que se transfiere desde la cámara de recogida a la cámara de procesamiento es de 0,078 U/ml, la concentración de colagenasa de la composición celular regenerativa final será de 0,00078 U/ml. La colagenasa se elimina en el filtro de fibra hueca, y el filtro de fibra hueca corresponde al tercer filtro expuesto anteriormente.

Las cámaras de procesamiento que ilustran uno o más métodos de filtración celular descritos anteriormente se muestran en las figuras, particularmente, las figuras 1-3. Con referencia a las figuras 1-3, entre la cámara de procesamiento 30 y la cámara de filtrado del conjunto de filtro 36, se puede proporcionar una bomba, tal como una bomba 34. Además, los sensores de ventilación y de presión, tales como la salida de aire 32, y el sensor de presión 5 39, se pueden proporcionar en línea con la cámara de procesamiento 30 y el conjunto de filtro 36. También pueden proporcionarse acoples para la cámara de salida 50. Estos componentes opcionales (por ejemplo, la bomba 34, la salida de aire 32, el sensor de presión 39 y los acoples para la cámara de salida 50) pueden proporcionarse entre la cámara de procesamiento 30 y el conjunto de filtro 36 de manera que el líquido contenido en la cámara de procesamiento 30 puede fluir a uno o más de estos componentes opcionales antes de pasar a través del conjunto de 10 filtro 36. Por ejemplo, el líquido puede fluir a través de la bomba 34 antes de pasar al conjunto de filtro 36. O, el líquido puede pasar a través del sensor de presión 39 antes de pasar a través del conjunto de filtro para obtener una presión de líquido de prefiltro en el sistema. En ciertas situaciones, uno o más de estos componentes también pueden proporcionarse como un elemento de la cámara de procesamiento 30, tal como la salida de aire 32 como se ilustra en la figura 6. En la versión ilustrada, el sensor de presión 39 está en línea para determinar la presión de la 15 composición de células regenerativas que es generada por la bomba 34 cuando entra en la cámara de filtración del conjunto de filtro 36. Esta construcción puede facilitar el control de la presión transmembrana a través de la membrana filtrante. Se puede añadir una solución salina u otro tampón y solución de lavado adicionales a la composición celular regenerativa para facilitar la eliminación de proteínas no deseadas a medida que la composición se filtra a través del conjunto de filtro 36. Este lavado repetido puede realizarse varias veces para aumentar la 20 pureza de las células regenerativas. En ciertas versiones, la solución salina puede añadirse en cualquier etapa que se considere necesaria para mejorar la filtración.

En una versión específica, que se proporciona a modo de ejemplo y no de limitación, las proteínas no deseadas y la solución salina u otra solución de lavado se eliminan de la siguiente manera. La composición con las células 25 regenerativas, así como partículas o fragmentos de colágeno y tejido conectivo, adipocitos y collagenasa, se hace circular a través de una serie de filtros hasta que se alcanza un volumen mínimo. El volumen mínimo es una función del volumen de retención total del sistema y alguna constante predeterminada. El volumen de retención es el volumen de líquido que está contenido en el tubo y en los conductos si todas las cámaras de procesado están vacías. En una versión, el volumen mínimo es de 15 ml. Cuando se alcanza el volumen mínimo, se introduce un 30 volumen predeterminado de solución de lavado en el sistema para ser mezclado con la composición de células regenerativas. Esta mezcla de solución de lavado y la composición de células regenerativas se hace circular a continuación a través de los filtros hasta que se alcanza de nuevo el volumen mínimo. Este ciclo se puede repetir varias veces para aumentar la pureza de las células regenerativas, o en otras palabras, para aumentar la proporción de células regenerativas en la composición con respecto a los otros materiales en la composición. Véanse las figuras 35 10 y 11.

Después de que se ha determinado que la composición de células regenerativas se ha limpiado de proteínas no deseadas y se ha concentrado suficientemente (pueden utilizarse concentraciones mínimas dentro de un intervalo de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/ml y, en una realización preferida, puede ser de 40 aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/ml), una cámara de salida 50, tal como una bolsa de salida, puede estar conectada a un puerto de salida de la cámara de procesamiento 30 y/o el conjunto de filtro 36, dependiendo de la realización específica. Un respiradero, tal como el respiradero 32, puede entonces abrirse para facilitar la salida de las células regenerativas concentradas. En una implementación, esta determinación de cuándo se ha alcanzado una 45 concentración mínima se hace empíricamente después de que se han realizado experimentos y se han programado en los controles electrónicos del dispositivo. La determinación puede ser una entrada en el proceso de lo que se desea producir, es decir, cuántas células madre/progenitoras se desean, o el intervalo de concentración celular. Basándose en datos científicos, se necesita obtener una cantidad predefinida de tejido adiposo y colocarla en el sistema para conseguir el resultado deseado. Con la abertura 32 abierta, una bomba, tal como la bomba 34, puede 50 funcionar para transferir las células regenerativas concentradas a la bolsa de salida. En una versión, la bolsa de salida 50 es similar a una bolsa de sangre vacía que tiene un tubo con un acople en un extremo. De manera estéril, el acople sobre la bolsa de salida puede estar unido al puerto de salida, y las células regenerativas concentradas pueden transferirse a la bolsa de salida.

Como se ilustra en las figuras 1-3, se puede proporcionar una bomba de vacío 26 en el sistema 10 para cambiar la 55 presión en el sistema, entre otras cosas. Por ejemplo, la bomba de vacío 26 puede acoplarse a la cámara de recogida 20 a través de un conducto, tal como el conducto 12b, para provocar una disminución de presión dentro de la cámara de recogida 20. La bomba de vacío 26 también puede acoplarse a la cámara de procesamiento 30 por medio de un conducto, tal como el conducto 12g. Con respecto a la operación de la bomba de vacío 26 en relación con la bomba 34, se pueden implementar dos bombas o fuentes de vacío separadas, o se puede implementar una

sola mediante el uso de válvulas que dirigen la fuerza de vacío a los diferentes conductos que lo necesitan en puntos específicos en la proceso. Además, la bomba de vacío 26 puede estar acoplada al recipiente de residuos 40 a través de un conducto, tal como el conducto 12f.

5 Con referencia a las figuras 10 y 11, la presión generada por la bomba de vacío 26 puede utilizarse para dirigir el flujo de fluidos, incluyendo las células regenerativas, a través de los conductos 12. Esta presión puede suministrarse en múltiples direcciones, por ejemplo, controlando automática o manualmente la posición de una o más válvulas 14 en el sistema 10. El sistema 10 puede hacerse funcionar correctamente con el uso de presión positiva o mediante el uso de presión negativa, o combinaciones de las mismas. Por ejemplo, las células regenerativas pueden ser  
10 arrastradas a través del primer y segundo filtros descritos anteriormente en un recipiente de lados blandos que está conectado al tercer filtro. El recipiente de lados blandos puede estar en línea (serie) conectado antes del tercer filtro. La cámara de salida final puede ser un recipiente de lados blandos que está en el otro lado (por ejemplo, el lado de aguas abajo) del tercer filtro. En esta versión, se utiliza presión para mover las células regenerativas de un recipiente de lados blandos a un segundo recipiente de lados blandos a través del filtro.

15 En otra versión del sistema 10, la filtración de las células madre y/o células progenitoras derivadas de adiposo se puede llevar a cabo usando una combinación de filtración por percolación y sedimentación. Por ejemplo, dicho sistema usa una solución salina que se pasa a través de una composición de células regenerativas tisulares (por ejemplo, la composición que contiene las células madre y/o células progenitoras derivadas de adiposo) y a  
20 continuación a través de un filtro. Algunas de las variables que están asociadas con la filtración por percolación de células de una composición de células regenerativas incluyen, pero no se limitan a, tamaño de poro del medio filtrante, geometría o forma de poro, área superficial del filtro, dirección de flujo de la composición de células regenerativas que se están filtrando, velocidad de flujo de la solución salina infundida, presión transmembrana, dilución de la población celular, tamaño y viabilidad celular.

25 En una versión del sistema 10, la cámara de procesamiento 30 utiliza un conjunto de filtro 36 que implementa filtración percolativa y sedimentación para separar y concentrar las células regenerativas. A modo de ejemplo, y no a modo de limitación, la cámara de procesamiento 30 se define como un cuerpo generalmente cilíndrico que tiene una pared lateral 30a, una superficie superior 30b, y una superficie inferior 30c, como se muestra en la figura 6. Se  
30 proporciona un respiradero estéril 32 en la superficie superior 30b.

En la versión de la figura 6, se ilustra la cámara de procesamiento 30 que incluye un conjunto de filtro 36, que incluye dos filtros, tales como un filtro de poro grande 36a y un filtro de poro pequeño 36b. Los tamaños de poro de los filtros 36a y 36b típicamente están en un intervalo entre aproximadamente 0,05 micrómetros y aproximadamente  
35 10 micrómetros. El filtro de poro grande 36a puede comprender poros con un diámetro de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ , y el filtro de poro pequeño 36b puede comprender poros con un diámetro de aproximadamente 1-3  $\mu\text{m}$ . En una versión, los filtros tienen un área superficial de aproximadamente 785  $\text{mm}^2$ . Los filtros 36a y 36b dividen un interior de la cámara de procesamiento 30 para incluir una primera cámara 37a, una segunda cámara 37b y una tercera cámara 37c. Como se muestra en la figura 6, la primera cámara 37a está situada entre la segunda cámara 37b y la  
40 tercera cámara 37c. Además, la primera cámara 37a se muestra como la región de la cámara de procesamiento 30 que tiene un puerto de entrada 31a y un puerto de salida 31b. La cámara de procesamiento ilustrada 30 incluye una pluralidad de puertos que proporcionan trayectos de comunicación desde un exterior de la cámara de procesamiento 30 al interior de la cámara de procesamiento 30, tales como los puertos 31a, 31b y 31c. Los puertos 31a, 31b y 31c están ilustrados dispuestos en la pared lateral 30a de un cuerpo de la cámara de procesamiento 30. Sin embargo,  
45 los puertos 31a, 31b y 31c también podrían estar situados en otras regiones. El puerto 31a se ilustra como un puerto de entrada de muestra, que está construido para acoplarse a un conducto de manera que una composición que contiene células regenerativas pueda pasar al interior de la cámara de procesamiento 30. El puerto 31b se ilustra como un puerto de salida construido para acoplarse a un conducto de manera que las células separadas y concentradas puedan retirarse del interior de la cámara de procesamiento 30. El puerto 31c se ilustra como un  
50 puerto de entrada construido para acoplarse a un conducto para el suministro de una solución de lavado fresca, tal como una solución salina en el interior de la cámara de procesamiento 30.

Durante el uso, las células regenerativas pueden introducirse en la cámara central 37a a través del puerto de entrada 31a. Se introduce una solución salina u otro tampón en la cámara inferior 37b a través del puerto de entrada  
55 31c. La solución salina puede dirigirse a través de la composición de células regenerativas en la cámara 37a a una velocidad de aproximadamente 10 ml/min. El caudal de la solución salina es tal que contrarresta la fuerza de la gravedad. El flujo de solución salina da a las células de la cámara la capacidad de separarse basándose en la densidad de las células. Típicamente, a medida que la solución salina se hace subir a través de la composición, las células más grandes de la composición se depositarán en el fondo de la cámara central 37a, y las células y

proteínas más pequeñas se transportarán a través del segundo filtro 36b hasta la cámara superior 37c. Esta filtración se consigue ajustando el caudal de la solución salina de tal manera que las células más grandes se enrollan en su lugar, lo que permite que las partículas más pequeñas sean liberadas y transportadas con la solución salina. El respiradero estéril 32 está incluido en la cámara 30 para asegurar que se mantiene el gradiente de presión correcto en las tres cámaras dentro de la unidad de procesamiento. La cámara superior 37c puede comprender un medio absorbente 33. El propósito de los medios absorbentes es atrapar las proteínas no deseadas en la solución para asegurar que no atraviesan el medio filtrante de vuelta a la solución de procesamiento, si, por ejemplo, disminuye el caudal de solución salina. Un medio absorbente puede ser un tipo de material filtrante que es absorbente, o atrae materiales o componentes a filtrar. Se puede añadir un puerto de salida por encima del filtro superior para ayudar a extraer el residuo. Otra versión de esto puede ser aplicar un vacío suave desde la parte superior para ayudar a extraer los residuos. Los medios absorbentes pueden ser implementados cuando, como en la versión ilustrada, los caudales son relativamente pequeños. El exceso de solución salina y proteínas se transportan después a un recipiente de residuos.

15 Cuando las células más grandes (por ejemplo, las células madre derivadas de tejido adiposo y/o las células progenitoras) se han separado suficientemente de células y proteínas más pequeñas, la composición que contiene las células separadas puede concentrarse, como se analiza en el presente documento. La composición puede concentrarse adicionalmente después de haber sido retirada de la cámara 37a a través del puerto de salida 31b, o mientras está en la cámara 37a. En una versión, la concentración de células en la composición se aumenta de la siguiente manera. Una vez que las células se han separado suficientemente, los filtros, tales como los filtros 36a y 36b, pueden moverse uno hacia el otro. Este movimiento tiene el efecto de reducir el volumen entre los dos filtros (por ejemplo, el volumen de la cámara 37a). También se puede proporcionar un elemento vibratorio en conexión con la cámara de procesamiento 30 para facilitar la concentración de las células en la composición. En una versión, el elemento vibratorio puede acoplarse al filtro 36b (por ejemplo, el filtro de poro pequeño). La vibración puede reducir la incidencia de las células que quedan atrapadas en los filtros. La reducción en volumen de la composición permite eliminar el exceso de solución salina como residuo y concentrar las células en un volumen menor.

En otra versión, la concentración de las células regenerativas se lleva a cabo de la siguiente manera. Después de que las células se han separado suficientemente, la composición de células regenerativas se puede transferir a otra cámara (no mostrada) que utiliza la gravedad para filtrar el exceso de solución salina. En una versión preferida, la sedimentación puede producirse al mismo tiempo que la percolación. Esta sedimentación puede lograrse introduciendo la composición sobre un filtro que tiene un tamaño de poro comprendido entre aproximadamente 10 kD y aproximadamente 2 micrómetros. En una versión, un filtro adecuado tiene un tamaño de poro de aproximadamente 1 micrómetro. La fuerza de gravedad permitirá que la solución salina y partículas más pequeñas pasen a través del filtro mientras se impide que las células en la composición fluyan a través del filtro. Después de que se ha obtenido la concentración deseada de células y después de que las partículas más pequeñas filtradas han sido retiradas de debajo del filtro, la composición celular regeneradora puede agitarse para eliminar las células del filtro y, posteriormente, las células regenerativas concentradas pueden transferirse a la bolsa de salida. Las partículas más pequeñas se pueden extraer como residuos a través de una salida.

En una versión particular, la composición de células regenerativas procedente de la cámara de recogida 20 es transportada a la cámara de procesamiento 30, en la que la composición puede centrifugarse para separar y concentrar las células regenerativas. Los principios de centrifugación se conocen bien en la técnica y no se repetirán en el presente documento en aras de brevedad. Se utilizan en la presente invención dispositivos de centrifugación, componentes y parámetros estándares reconocidos en la técnica. Una cámara de procesamiento ejemplar para su uso como parte de un dispositivo de centrifuga se muestra en las figuras 7 y 8. Típicamente, un dispositivo de centrifuga hace que una cámara centrífuga (tal como la mostrada en la figura 7) gire alrededor de un eje para aumentar de este modo la fuerza sobre las células en la solución para que sea mayor que la gravedad. Los materiales más densos o más pesados en la solución se depositan típicamente en un extremo de la cámara de centrifuga, es decir, en una cámara de salida 50 de la figura 7, para formar un sedimento de células regenerativo. El gránulo puede entonces volver a suspenderse para obtener una solución con una concentración deseada de células y/o un volumen deseado de células y medio. La cámara de procesamiento mostrada en la figura 7 está construida para separar y concentrar las células usando fuerzas tanto centrífugas como gravitatorias. Específicamente, durante la centrifugación, la fuerza centrífuga dirige los componentes más densos de la composición de células regenerativas, por ejemplo, las células regenerativas, hacia los extremos más exteriores de la cámara de centrifuga. A medida que la cámara de centrifugación se ralentiza y finalmente se detiene, la fuerza gravitacional ayuda a las células regenerativas a permanecer en los extremos más externos de la cámara de centrifuga y forman un sedimento celular. Por consiguiente, los componentes no deseados de la composición de células regenerativas, es decir, los residuos, se pueden eliminar sin alterar el sedimento celular.

En otra versión más de la invención, la cámara de procesamiento puede estar compuesta por un concentrador de células en forma de un filtro de membrana giratoria. En otra versión del proceso de centrifugación, también se puede aplicar elutriación centrífuga. En esta versión, las células pueden separarse basándose en la velocidad de sedimentación celular individual de tal forma que la fuerza direccional (por ejemplo, hacia fuera) aplicada por centrifugación hace que las células y solutos sedimenten a velocidades diferentes. En la elutriación, la velocidad de sedimentación de la población de células diana se opone a un caudal opuesto (por ejemplo, hacia adentro) aplicado por la solución de bombeo en la dirección opuesta a la fuerza centrífuga. El contraflujo se ajusta de manera que las células y partículas dentro de la solución se separen. La elutriación se ha aplicado en muchos casos de separación celular (Inoue, Carsten et al., 1981; Hayner, Braun et al. 1984, Noga 1999) y los principios y prácticas utilizados para optimizar el flujo y los parámetros centrífugos pueden aplicarse en el presente documento a la luz de la presente divulgación por un experto en la técnica.

La figura 9 ilustra principios asociados con una implementación de elutriación de acuerdo con la presente invención. La versión de elutriación puede ser similar a una implementación de centrifugación en la medida en que se aplica una fuerza a la solución usando un rotor giratorio. Algunas de las variables que están asociadas con la separación de elutriación incorporada en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, el tamaño y la forma de la cámara giratoria, el diámetro del rotor, la velocidad del rotor, el diámetro del tubo de contraflujo, el caudal del contraflujo, así como el tamaño y la densidad de las partículas y las células que se van a retirar de la solución. Como en la centrifugación, las células regenerativas se pueden separar basándose en las densidades de células individuales.

En una versión, la composición de células regenerativas, por ejemplo, la solución que contiene las células regenerativas y la colagenasa, se introduce en una cámara de un rotor giratorio, como se muestra en la figura 9.1. Después de añadir la solución salina a la cámara, se añade una solución salina adicional a la cámara a un caudal predeterminado. El caudal de la solución salina puede determinarse en función de la velocidad del rotor, el diámetro de la celda y la constante de la cámara que se ha establecido empíricamente. El caudal se controlará, por ejemplo, con un dispositivo similar a una bomba IV. Un propósito de la solución salina adicional es proporcionar una condición dentro de la cámara del rotor donde las partículas más grandes se moverán a un lado de la cámara y las partículas más pequeñas se moverán a la otra, como se ilustra en la figura 9.2. El flujo se ajusta de manera que, en esta aplicación, las partículas más pequeñas salgan de la cámara y se muevan a un recipiente de residuos, como se muestra en la figura 9.3. Este movimiento da como resultado que la solución en la cámara del rotor tenga una población sustancialmente homogénea de células, tales como células madre. Después de que se ha determinado que las células madre se han separado del resto de los artículos en la solución (con proteínas no deseadas y lípidos libres que se han extraído de la cámara), el contraflujo se detiene. Las células dentro de la cámara formarán entonces un sedimento concentrado en la pared exterior de la cámara. El contraflujo se invierte y el sedimento celular se transfiere a la bolsa de salida.

Como se ha expuesto anteriormente en el presente documento, la cámara de procesamiento o la cámara de salida puede incluir uno o más puertos, por ejemplo, los puertos 51 o 52. Uno o más de estos puertos pueden estar diseñados para transportar las células regenerativas obtenidas usando cualquier combinación de los métodos descritos anteriormente, o una porción de los mismos, a través de conductos a otros dispositivos quirúrgicos, dispositivos de cultivo celular, dispositivos de maceración celular, dispositivos de terapia génica o dispositivos de purificación. Estos puertos también pueden estar diseñados para transportar las células regenerativas a través de conductos a cámaras o recipientes adicionales dentro del sistema o como parte de otro sistema para los mismos fines descritos anteriormente. Los puertos y conductos también se pueden usar para añadir uno o más aditivos, por ejemplo, factores de crecimiento, fluidos de resuspensión, reactivos de expansión celular, reactivos de conservación de células o reactivos de modificación celular, incluyendo agentes que transfieren genes a las células. Los puertos y conductos también pueden usarse para transportar las células regenerativas a otras dianas tales como materiales de implante (por ejemplo, estructuras o fragmentos de hueso), así como otros implantes y dispositivos quirúrgicos.

El procesamiento adicional de las células puede iniciarse también reconfigurando las interconexiones de los conjuntos desechables del sistema existente, reprogramando el dispositivo de procesamiento del sistema existente, proporcionando recipientes y/o cámaras diferentes o adicionales para el sistema existente, transportando las células a uno o más sistemas o dispositivos adicionales y/o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, el sistema puede reconfigurarse por cualquiera de los medios descritos anteriormente de tal modo que las células regenerativas obtenidas utilizando el sistema pueden someterse a uno o más de los siguientes: expansión celular (de uno o más tipos de células regenerativas) y mantenimiento celular (incluyendo lavado de la lámina celular y cambio de los medios); subcultivo; siembra celular; transfección transitoria (incluyendo siembra de células transfectadas del

suministro a granel); cosecha (incluyendo la cosecha enzimática, no enzimática y la cosecha por raspado mecánico); medición de la viabilidad celular; colocación en placas de las células (por ejemplo, en placas de microtitulación, incluyendo recogida de células de pocillos individuales para expansión, expansión de células en pocillos frescos); cribado de alto rendimiento; aplicaciones de terapia celular; aplicaciones de terapia génica; aplicaciones de ingeniería tisular; aplicaciones de proteínas terapéuticas; aplicaciones de vacunas víricas; cosecha de células regenerativas o sobrenadante para bancos o cribado, medición del crecimiento celular, lisis, inoculación, infección o inducción; generación de líneas de células (incluyendo células de hibridoma); células para ARNi y estudios de resistencia vírica; células para estudios de animales desactivados y transgénicos; estudios de purificación por afinidad; aplicaciones de biología estructural; desarrollo de ensayos y aplicaciones de ingeniería de proteínas.

10

Por ejemplo, si se requiere una expansión de una población de células regenerativa para una aplicación particular, puede usarse un enfoque que utiliza condiciones de cultivo para expandir preferiblemente la población mientras que otras poblaciones se mantienen (y se reducen de este modo por dilución con las células seleccionadas en crecimiento) o se pierden debido a la ausencia de las condiciones de crecimiento requeridas. Sekiya et al. han descrito condiciones que podrían emplearse a este respecto para las células madre derivadas de médula ósea (Sekiya et al., 2002). Este enfoque (con o sin adherencia diferencial al plástico de cultivo tisular) podría aplicarse a una versión adicional de esta invención. En esta versión, el sedimento de células regenerativas final se extrae de la cámara de salida y se coloca en un segundo sistema que proporciona el componente de cultivo celular. Esto podría estar en forma de una incubadora de cultivo de tejidos de laboratorio convencional o un dispositivo de tipo biorreactor, tal como el descrito por Tsao et al., patente de Estados Unidos n.º 6.001.642, o por Armstrong et al., Patente de Estados Unidos n.º 6.238.908. En una versión alternativa, la expansión celular o el componente de cultivo celular podría añadirse al sistema existente, por ejemplo, en la cámara de salida, permitiendo la adherencia a corto plazo de las poblaciones de células derivadas de adiposo. Esta versión alternativa permitirá la integración del componente de expansión celular al sistema y eliminará la necesidad de eliminar las células de este sistema y la colocación dentro de otro.

Durante el procesamiento, se pueden añadir o proporcionar uno o más aditivos a las distintas cámaras o recipientes, según sea necesario, para mejorar los resultados. Estos aditivos pueden proporcionarse también como parte de otro sistema asociado con el sistema existente o separado del sistema existente. Por ejemplo, en ciertas versiones, los aditivos se añaden o proporcionan sin necesidad de eliminar las células regenerativas del sistema. En otras versiones, los aditivos se añaden o proporcionan conectando un nuevo recipiente o cámara que comprende los aditivos en un puerto no utilizado del sistema de una manera estéril. En otras versiones, los aditivos se añaden o se proporcionan en un segundo sistema o dispositivo que no está conectado al sistema de la presente invención. Algunos ejemplos de aditivos incluyen agentes que optimizan el lavado y la desagregación, aditivos que aumentan la viabilidad de la población celular activa durante el procesamiento, agentes antimicrobianos (por ejemplo, antibióticos), aditivos que lisan los adipocitos y/o glóbulos rojos, o aditivos que enriquecen las poblaciones celulares de interés (por adherencia diferencial a restos de fase sólida o para promover de otro modo la reducción sustancial o el enriquecimiento de las poblaciones celulares) como se describe en el presente documento.

Por ejemplo, para obtener una población de células regenerativa homogénea, se puede emplear cualquier método adecuado para separar y concentrar el tipo de célula regenerativa particular, tal como el uso de anticuerpos específicos de células que reconocen y se unen a los antígenos presentes, por ejemplo, en las células madre o células progenitoras, por ejemplo, células precursoras endoteliales. Estos incluyen selección positiva (selección de las células diana), selección negativa (eliminación selectiva de células no deseadas), o combinaciones de las mismas. También pueden usarse marcadores intracelulares tales como enzimas, en la selección usando moléculas que fluorescen cuando actuadas sobre ellas enzimas específicas. Además, se podría insertar un material en fase sólida con propiedades adhesivas seleccionado para permitir la adherencia y/o elución diferencial de una población particular de células regenerativas dentro del sedimento celular final en la cámara de salida del sistema.

Una versión alternativa de este enfoque de adherencia diferencial incluirá el uso de anticuerpos y/o combinaciones de anticuerpos que reconocen moléculas superficiales expresadas diferencialmente en células regeneradoras diana y células no deseadas. La selección en base a la expresión de marcadores de la superficie celular específicos (o combinaciones de los mismos) es otra técnica comúnmente aplicada en la que los anticuerpos están unidos (directa o indirectamente) a una estructura de soporte en fase sólida (Geiselhart et al., 1996; Formanek et al., 1998; Graepler et al., 1998; Kobari et al., 2001; Mohr et al., 2001).

En otra versión, el sedimento celular puede suspenderse de nuevo, superponerse por encima (o debajo) de un material fluido formado en un gradiente de densidad continua o discontinua y colocarse en una centrifuga para la separación de las poblaciones celulares en base a la densidad celular. En una versión similar, también pueden

emplearse enfoques de flujo continuo tales como aféresis (Smith, 1997) y elutriación (con o sin contracorriente) (Lasch et al., 2000) (Ito y Shinomiya, 2001).

Otros ejemplos de aditivos pueden incluir componentes biológicos o estructurales adicionales, tales como factores de diferenciación celular, promotores de crecimiento, agentes inmunosupresores, dispositivos médicos, o cualquier combinación de los mismos, como se analiza en el presente documento. Por ejemplo, pueden añadirse otras células, tejido, fragmentos tisulares, factores de crecimiento tales como VEGF y otros factores de crecimiento angiogénicos o arteriogénicos conocidos, compuestos biológicamente activos o inertes, estructuras reabsorbibles, u otros aditivos destinados a mejorar la administración, eficacia, tolerabilidad o función de la población de células generativas. La población de células regenerativas también puede modificarse por inserción de ADN o por colocación en un sistema de cultivo celular (como se describe en el presente documento o se conoce en la técnica) de tal manera que cambie, mejore o complemente la función de las células regenerativas para su derivación de un propósito estructural o terapéutico. Por ejemplo, las técnicas de transferencia de genes para células madre se conocen por los expertos en la técnica, como se desvela en (Morizono et al., 2003, Mosca et al., 2000), y pueden incluir técnicas de transfección vírica, y más específicamente, técnicas de transferencia génica de virus adeno-asociados, como se desvela en (Walther y Stein, 2000) y (Athanasopoulos et al., 2000). Las técnicas no basadas en virus también pueden realizarse como se desvela en (Muramatsu et al., 1998). También se puede añadir un gen que codifica uno o más factores de diferenciación celular, por ejemplo, uno o más factores de crecimiento o una o más citoquinas. Los ejemplos de diversos agentes de diferenciación celular se desvelan en (Gimble et al., 1995; Lennon et al., 1995; Majumdar et al., 1998; Caplan y Goldberg, 1999; Ohgushi and Caplan, 1999; Pittenger et al., 1999; Caplan y Bruder, 2001; Fukuda, 2001; Worster et al., 2001; Zuk et al., 2001). También se pueden añadir genes que codifican factores o agentes antiapoptóticos. La adición del gen (o combinación de genes) podría ser por cualquier tecnología conocida en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, transducción adenovírica, "pistolas de genes", transducción mediada por liposomas y retrovirus o transducción mediada por lentivirus, plásmido, virus adenoasociados. Estas células regenerativas podrían implantarse a continuación junto con un material portador que tiene un vehículo de administración de genes capaz de liberar y/o presentar genes a las células en el tiempo de manera que la transducción pueda continuar o iniciarse *in situ*.

Cuando las células y/o tejido que contiene las células se administran (por ejemplo, se inyectan) a un paciente distinto del paciente del que se obtuvieron las células y/o tejido, se pueden administrar uno o más agentes inmunosupresores al paciente que recibe las células y/o el tejido para reducir, y preferiblemente prevenir, el rechazo del trasplante. Como se usa en el presente documento, la expresión "fármaco o agente inmunosupresor" pretende incluir agentes farmacéuticos que inhiben o interfieren con la función inmune normal. Los ejemplos de agentes inmunosupresores adecuados con los métodos desvelados en el presente documento incluyen agentes que inhiben las rutas de coestimulación de linfocitos T/linfocitos B, tales como agentes que interfieren con el acoplamiento de linfocitos T y linfocitos B a través de las rutas CTLA4 y B7, como se desvela en la Patente de Estados Unidos N.º 20020182211. Un agente inmunosupresor preferido es la ciclosporina A. Otros ejemplos incluyen miofenilato mofetilo, rapamicina y globulina antitímocítica. En una versión, el fármaco inmunosupresor se administra con al menos otro agente terapéutico. El fármaco inmunosupresor se administra en una formulación que es compatible con la ruta de administración y se administra a un sujeto a una dosificación suficiente para conseguir el efecto terapéutico deseado. En otra versión, el fármaco inmunosupresor se administra transitoriamente durante un tiempo suficiente para inducir tolerancia a las células regenerativas de la invención.

En estas realizaciones, las células regenerativas pueden ponerse en contacto, combinarse, mezclarse o añadirse a los aditivos mediante cualquier forma reconocida en la técnica, incluyendo dispositivos tales como los dispositivos de agitación y los métodos asociados descritos en el presente documento. Por ejemplo, se pueden usar rodillos basculantes, de inversión, de compresión pulsados o móviles.

En otro aspecto, la población de células puede ponerse en el receptor y estar rodeada por una vaina de plástico reabsorbible u otros materiales y componentes relacionados tales como los fabricados por MacroPore Biosurgery, Inc. (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos n.º 6.269.716; 5.919.234; 6.673.362; 6.635.064; 6.653.146; 6.391.059; 6.343.531; 6.280.473).

En todas las realizaciones anteriores, al menos una porción de las células regenerativas separadas y concentradas puede criopreservarse, como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 10/242.094, titulada PRESERVATION OF NON EMBRYONIC CELLS FROM NON HEMATOPOIETIC TISSUES, presentada el 12 de septiembre de 2002, que reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos 60/322.070, presentada el 14 de septiembre de 2001, que se cede comúnmente.

Al final del procesamiento, las células regenerativas pueden recuperarse manualmente de la cámara de salida. Las células pueden cargarse en un dispositivo de administración, tal como una jeringa, para su colocación en el receptor mediante una técnica subcutánea, intramuscular u otra técnica que permita el suministro de las células al sitio diana dentro del paciente. En otras palabras, las células se pueden colocar en el paciente por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica. Las versiones preferidas incluyen la colocación por aguja o catéter, y las versiones modificadas incluyen colocación por implantación quirúrgica directa. En otras versiones, las células pueden transportarse automáticamente a una cámara de salida que puede estar en forma de un recipiente, jeringa o catéter, etc., que puede usarse para colocar las células en el paciente. El recipiente también se puede usar para almacenar las células para su uso posterior o para criopreservación. Todos los métodos de recuperación se realizan de manera estéril. En la versión de implantación quirúrgica, las células podrían aplicarse en asociación con aditivos tales como una matriz o estructura preformada, como se describe en el presente documento.

En versiones preferidas de la invención (por ejemplo, la versión mostrada en la figura 4), el sistema se automatiza. En otra versión, el sistema tiene componentes automatizados y manuales. El sistema puede estar compuesto por uno o más componentes desechables conectados o montados en un componente o módulo de hardware reutilizable. Los sistemas automatizados de la invención proporcionan visualizaciones de pantalla (véase la figura 16) que indican un funcionamiento adecuado del sistema. Los sistemas automatizados también pueden proporcionar una pantalla que proporciona el estado del procedimiento y/o las instrucciones paso a paso en cuanto a la configuración apropiada de los componentes desechables del sistema. La pantalla también puede indicar problemas o fallos en el sistema si se producen y proporcionar orientación de "solución de problemas" si es apropiado. En una versión, la pantalla es una pantalla de interfaz de usuario que permite al usuario introducir parámetros en el sistema a través, por ejemplo, de una pantalla táctil.

Los sistemas parcial y completamente automatizados pueden incluir un dispositivo de procesamiento (por ejemplo, un microprocesador u ordenador personal) y programas de software asociados que proporcionan el control lógico para que el sistema funcione y para automatizar una o más etapas del proceso en base a la entrada del usuario. En ciertas versiones, uno o más aspectos del sistema pueden ser programables por el usuario a través del software residente en el dispositivo de procesamiento. El dispositivo de procesamiento puede tener uno o más programas de software preprogramados en la memoria de sólo lectura (ROM). Por ejemplo, el dispositivo de procesamiento puede tener software preprogramado adaptado para procesar sangre, otro programa para procesar tejido adiposo para obtener pequeños volúmenes de células regenerativas y otro programa para procesar tejido adiposo para obtener mayores volúmenes de células regenerativas. El dispositivo de procesamiento puede tener también un software preprogramado que proporcione al usuario parámetros apropiados para optimizar el proceso basándose en la entrada del usuario de información relevante tal como la cantidad de células regenerativas requeridas, el tipo de tejido que se está procesando, el tipo de manipulación de posprocesamiento requerida, el tipo de aplicación terapéutica, etc.

El software también puede permitir la automatización de etapas tales como el control de la entrada y salida de fluidos y tejidos a lo largo de trayectorias de tubo particulares controlando bombas y válvulas del sistema; el control de la secuencia apropiada y/o la dirección de activación; la detección de bloqueos con sensores de presión; mecanismos de mezcla, medición de la cantidad de tejido y/o fluido a mover a lo largo de una trayectoria particular usando mecanismos volumétricos; el mantenimiento de las temperaturas de los diversos componentes utilizando dispositivos de control de calor; y la integración del proceso de separación y concentración con mecanismos de temporización y software. El dispositivo de procesamiento también puede controlar velocidades de centrifuga en base al tipo de tejido que se está procesando y/o la población celular o subpoblación que se está cosechando, y los tipos de procedimientos a realizar (por ejemplo, mejora de tejido usando tejido adiposo aumentado con células regenerativas, o procesamiento de células para aplicaciones de reparación ósea utilizando injertos óseos recubiertos con células regenerativas). El dispositivo de procesamiento también puede incluir puertos serie o paralelos convencionales u otros medios para comunicarse con otros ordenadores o redes. Por consiguiente, el dispositivo de procesamiento puede ser una unidad independiente o estar asociado con uno o más dispositivos adicionales para los procedimientos de procesamiento adicionales descritos en el presente documento.

El software puede permitir la recogida automática de "datos de ejecución" incluyendo, por ejemplo, los números de lote de los componentes desechables, las mediciones de temperatura y volumen, los parámetros de volumen tisular y número de células, la dosis de enzima aplicada, el tiempo de incubación, la identidad del operador, la fecha y la hora, la identidad del paciente, etc. En una versión preferida del dispositivo se integraría un sistema de reconocimiento de caracteres, tal como un sistema lector de código de barras para permitir la entrada de datos de estas variables (por ejemplo número de lote de conjunto disponible y fecha de caducidad, número de lote y fecha de caducidad de la colagenasa, identificadores de paciente/muestra, etc.) en el dispositivo de procesamiento como

- parte de la documentación del procesamiento. Esto reduciría la posibilidad de errores de entrada de datos. Tal sistema de lectura de código de barras podría fácilmente incorporarse en el dispositivo de procesamiento usando un USB u otro puerto de interfaz y sistema conocido en la técnica. De esta manera el dispositivo proporcionaría control integrado de la entrada de datos y documentación del procedimiento. Un informe impreso de estos parámetros sería
- 5 parte de los parámetros definidos por el usuario de una operación programada del sistema. Naturalmente esto requeriría la integración de un componente de impresión (hardware y controlador) o controlador de impresora en software más un conector de salida de interfaz para una impresora (por ejemplo un puerto USB) en el hardware del dispositivo.
- 10 En ciertas versiones, el sistema es un sistema completamente automático. Por ejemplo, el usuario puede seleccionar inicialmente la cantidad de tejido a procesar, unir el sistema al paciente y el sistema puede aspirar automáticamente el tejido requerido y separar y concentrar las células regenerativas en una secuencia ininterrumpida sin intervención adicional del usuario. El usuario también puede introducir la cantidad de células regenerativas requeridas y permitir que el sistema aspire la cantidad requerida de tejido y procese el tejido. Un sistema completamente automático
- 15 también incluye un sistema que es capaz de reconfigurarse basándose en varios (por ejemplo, dos o más) parámetros introducidos por el usuario, por ejemplo, número de ciclos de lavado, velocidad de centrifugación etc. El sistema también puede ejecutarse en un modo semi-automático durante el cual el sistema atraviesa ciertas etapas sin intervención del usuario pero requiere la intervención del usuario antes de que puedan producirse ciertos procedimientos. En otras versiones, el sistema es un sistema integrado sencillo que presenta instrucciones para
- 20 guiar al usuario para realizar operaciones predeterminadas en momentos predeterminados. Por ejemplo, el dispositivo de procesamiento puede guiar a los usuarios a través de las etapas necesarias para la inserción apropiada de los tubos, cámaras y otros componentes del sistema. En consecuencia, el usuario puede asegurarse de que se está realizando la secuencia de operaciones apropiada. Tal sistema puede requerir adicionalmente confirmación de cada etapa operativa por el usuario para evitar una activación o terminación de etapas involuntaria
- 25 en el procedimiento. En una versión adicional, el sistema puede iniciar ensayos automáticos para confirmar la correcta inserción de los tubos, cámaras, ausencia de bloqueos, etc. En otra versión más, el sistema de la presente invención puede programarse para realizar múltiples procedimientos de separación y concentración a través de control automático del flujo de tejido a través del sistema. Esta característica puede ser importante, por ejemplo, durante la cirugía en un paciente en el que el tejido que de otro modo se perdería se recoge en el sistema y las
- 30 células regenerativas del tejido se separan y concentran y se devuelven al paciente.

Como se ha expuesto anteriormente, los componentes del sistema pueden ser desechables (denominados en el presente documento "conjunto (o conjuntos desechables)", de modo que partes del sistema puedan desecharse después de solamente un uso. Esta implementación puede ayudar a asegurar que cualquier superficie que entre en

35 contacto con el tejido del paciente se desechará de forma apropiada después de usarse. Un conjunto desechable ejemplar se ilustra en la figura 13. En una versión preferida, los componentes desechables del sistema se preesterilizan y empaquetan de modo que puedan utilizarse "tal cual" que son fáciles de usar y fáciles de cargar y que eliminan la necesidad de muchas conexiones de tubos y organización compleja de conexiones de tubos. Tales componentes desechables son relativamente baratos de fabricar y por lo tanto no crean un gasto sustancial debido a

40 su desecho. En una versión, el sistema desechable (denominado referido en el presente documento de forma intercambiable como "conjunto o conjuntos" desechables) comprende, consiste esencialmente en o consiste en la cámara de recogida 20, la cámara de procesamiento 30, la cámara de residuos 40, la cámara de salida 50, los conjuntos de filtros 36, la bolsa de muestras 60 y los conductos asociados 12 o tubos. En versiones preferidas de los conjuntos desechables del sistema, la cámara de recogida 20 y la cámara de procesamiento 30 se conectan

45 mediante conductos 12 que se alojan en un marco rígido. La red de sellado rotatoria (Figuras 7 y 8) de una cámara de procesamiento 30 también puede alojarse en el mismo marco rígido. En otra versión preferida, las diversas cámaras y depósitos del conjunto desechable están comprendidos por las interfaces necesarias que son capaces de comunicarse con el dispositivo de procesamiento del sistema de modo que las bombas, válvulas, sensores y otros dispositivos que automatizan el sistema se activan o desactivan de forma apropiada según sea necesario sin

50 intervención del usuario. Las interfaces también reducen el tiempo y la experiencia requeridos para preparar el sistema y también reducen los errores indicando cómo preparar de forma apropiada el sistema y alertando al usuario en el caso de una preparación errónea.

La mayoría de los conjuntos desechables de la invención tendrán muchos elementos comunes. Sin embargo, el

55 experto en la técnica reconocerá que diferentes aplicaciones del sistema pueden requerir componentes adicionales que pueden ser parte de los conjuntos disponibles. Por consiguiente, los conjuntos desechables pueden comprender adicionalmente una o más agujas o jeringas adecuadas para obtener tejido adiposo o de otro tipo del paciente y devolver células regenerativas al paciente. El tipo, número y diversidad de las agujas y jeringas incluidas dependerá del tipo y cantidad de tejido que se procese. Los conjuntos desechables pueden comprender adicionalmente uno o

más depósitos rígidos o flexibles para retener los fluidos de lavado y otros reactivos de procesamiento usados en el sistema. Por ejemplo, los conjuntos desechables pueden comprender depósitos para retener solución salina, enzimas y cualquier otro fluido de tratamiento o reemplazo requeridos para el procedimiento. Además, pueden proporcionarse soluciones de lavado, fluidos de resuspensión, aditivos, agentes o materiales de trasplante 5 adecuados con los conjuntos desechables para su uso junto con los sistemas y procedimientos de la invención.

Cualquier combinación de los componentes, equipamiento o materiales del sistema descritos en el presente documento o requeridos de otro modo para realizar la práctica de la invención pueden proporcionarse en forma de un kit. Por ejemplo, un kit de la invención puede incluir, por ejemplo, la aguja de longitud y calibre óptimos para la 10 liposucción basada en jeringa y jeringas estériles que contienen el medio de filtro preferido que permite el procesamiento de pequeños volúmenes de tejido. Otro equipamiento y materiales ejemplares que pueden usarse con la invención y también pueden incluirse con los kits de la invención se enumeran en las Tablas II y III.

La Tabla II a continuación identifica ejemplos de materiales que pueden usarse para obtener células regenerativas 15 de tejido adiposo de acuerdo con los sistemas y métodos de la presente invención:

Tabla II

Descripción	Proveedor	Cantidad	Nota
Jeringa de 10 ml	Becton-Dickinson	según se requiera	Opcional, usado para liposucción
Aguja de punta roma 14GA		según se requiera	Opcional, usado para liposucción
Envase de sangre sencillo (600 ml)	Baxter Fenwal	1	Bolsa de procesamiento de células principal; la bolsa tiene un adaptador de punta en línea y dos puertos de punta libres
Envase de transferencia con acoplador (150 ml)	Baxter Fenwal	1	Conjunto de bolsas Quad
Envase de transferencia con acoplador (1 l)	Baxter Fenwal	1	Bolsa de residuos
Acoplador de sitio de muestra	Baxter Fenwal	2	
solución salina al 0,9 % (para inyección)	Baxter Fenwal	1	
Aguja aguda 14GA	Monoject	según se requiera	Para añadir tejido de liposucción a la bolsa
Aguja aguda 20GA	Monoject	3	Para añadir colagenasa y retirar células PLA
Filtro Sterflip de 0,2 µm	Millipore	1	Para filtrar colagenasa
Grapas de sellado de aluminio Teruflex	Terumo	4	ME*ACS121 para sellado temporal de los tubos
Almohadilla de preparación de Povidona yodo	Triadine	según se requiera	10-3201
Liberasa H1 Colagenasa	Roche		Véase la Nota de Procedimiento 1
Obleas de TSCD	Terumo	2	1SC*W017 para su uso con soldador de tubos estériles TSCD

La Tabla III, a continuación, identifica equipamiento que puede usarse con los sistemas y métodos desvelados en el 20 presente documento.

Tabla III

Descripción	Proveedor	Cantidad	Nota
Centrífuga Sorvall Legend T Easy Set	Fisher Scientific	1	75-004-367
Rotor	Kendro/Sorvall	1	Rotor TTH-750
Cubos de rotor	Kenro/Sorvall	4	Cubos de rotor 75006441
Adaptador para bolsas de 150 ml	Kendro/Sorvall	4	00511
Extractor de plasma	Baxter Fenwal	1	4R4414
Sellador de tubos	Sebra	1	Modelo 1060
Soldador de tubos estériles TSCD	Terumo	1	3ME*SC201AD
Agitador térmico LabLine	LabLine	1	4637

Pinza de tipo hemostat plástica "desechable"	Davron	3	
Conjuntos de bolsas de equilibrio		2	Bolsas rellenas de agua usadas para equilibrar la centrifuga
Cámaras de puntas biopeligrosas		1	
Cámara de residuos biopeligrosos		1	

El componente reutilizable del sistema comprende, consiste esencialmente en o consiste en el mecanismo de agitación para la cámara de recogida, la bomba y los sensores variados que activan válvulas y controles de bomba, el motor de centrifuga, el marco rotatorio del motor de centrifuga, la pantalla de interfaz de usuario y los puertos USB, un dispositivo de engranaje o acoplamiento o configuración para conectar el conjunto desechable de modo que el conjunto desechable se una de forma segura y funciona en conjunto con el componente de hardware reutilizable y otros dispositivos asociados. Un componente reutilizable ejemplar se ilustra en la figura 14. En versiones preferidas, el componente reutilizable incluye un medio para separar y concentrar las células regenerativas de la composición de células regenerativas, por ejemplo, una centrifuga rotatoria. En esta versión, el componente reutilizable se diseña para conectarse a y funcionar en conjunto con una parte de la cámara de procesamiento (que comprende una cámara de centrifuga) del conjunto desechable como se muestra en la figura 15A. Se entiende que los medios para separar y concentrar las células regenerativas en el componente reutilizable no se limita a una centrifuga rotatoria sino que también puede incluir cualquier otra configuración descrita en el presente documento, incluyendo un filtro de membrana rotatorio. El componente reutilizable también puede alojar el dispositivo de procesamiento descrito en el presente documento que contiene software preprogramado para llevar a cabo varios procedimientos de procesamiento de tejido diferentes y activar de forma selectiva las diversas bombas y válvulas del sistema en consecuencia. El procesador también puede incluir capacidad de almacenamiento de datos para almacenar información del donante/paciente, información de procesamiento o recogida y otros datos para descargar posteriormente o compilar. El componente reutilizable puede usarse con una diversidad de conjuntos desechables. El conjunto desechable se conecta al componente reutilizable a través, por ejemplo, de un dispositivo de engranaje o configuración para conectar el conjunto desechable de modo que el conjunto desechable se une de forma segura y funciona en conjunto con el componente de hardware reutilizable de una manera que el dispositivo de procesamiento presente en el componente reutilizable pueda controlar, es decir, enviar y recibir señales de y hacia los diversos componentes del conjunto desechable así como diversos componentes del componente reutilizable y otros dispositivos y sistemas asociados.

En una versión, un sistema desechable para su uso en el sistema está compuesto por una cámara de recogida que puede contener aproximadamente 800 ml de tejido; una cámara de procesamiento que puede procesar la composición de células regenerativas generada por aproximadamente 800 ml de tejido lavado y digerido en la cámara de recogida 20; una cámara de salida 30 que puede acomodar al menos 0,5 ml de células regenerativas; y un depósito de residuos 40 que puede contener aproximadamente 10 l de residuos. En esta versión, el dispositivo de hardware no es mayor de 24" de longitud x 18" de ancho x 36" de alto. Pueden construirse dimensiones alternativas de los diversos componentes de los conjuntos desechables así como del dispositivo de hardware según se requiera y se pretende que estén incluidas por la presente invención sin limitación.

Los componentes desechables del sistema son fáciles de colocar en el dispositivo. Una ilustración de un conjunto desechable utilizado montado junto con un componente reutilizable correspondiente se ilustra en la figura 15A. El sistema se diseña preferiblemente de modo que pueda detectar un componente desechable cargado de forma inapropiada. Por ejemplo, los componentes de cada conjunto desechable pueden tener marcas de guía de color para alinear e insertar de forma apropiada los tubos, cámaras, etc. en lugares apropiados en el sistema. En versiones adicionales, el sistema desvelado en el presente documento es una unidad portátil. Por ejemplo, la unidad portátil también puede ser capaz de moverse de una localización en la que se ha producido recogida de tejido adiposo a otra localización para recogida de tejido adiposo. En ciertas implementaciones, la unidad portátil es adecuada para recoger y procesar el tejido adiposo a la cabecera de un paciente. De este modo, una unidad portátil puede ser parte de un sistema que pueda moverse de paciente a paciente. En consecuencia, la unidad portátil puede tener ruedas que se bloquean y, por lo tanto, puede colocarse y usarse fácilmente en una localización conveniente en una posición estable y segura durante el procedimiento. En otras versiones, la unidad portátil se diseña para preparación y funcionamiento en una superficie plana tal como una mesa. La unidad portátil también puede incluirse en una unidad de alojamiento. La unidad portátil puede estar comprendida adicionalmente por perchas, ganchos, etiquetas, escalas y otros dispositivos para ayudar en el procedimiento. Todos los componentes reutilizables descritos en el presente documento del sistema tales como la centrifuga, dispositivo de procesamiento, pantalla de presentación pueden montarse en la unidad portátil del sistema.

Versiones manuales alternativas para obtener células regenerativas también están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, en una versión, el tejido adiposo puede procesarse usando cualquier combinación de los componentes del sistema, equipo y/o materiales descritos en el presente documento

- 5 Una versión manual del sistema de la invención se puede poner en práctica de acuerdo con las siguientes etapas e información, que se proporcionan a modo de ejemplo y no a modo de limitación. En primer lugar, se recoge tejido adiposo de un paciente. Se abre una línea de recuperación de tejidos, o acoplador de sitio de muestreo, y se inserta una punta en un puerto lateral de la bolsa de sangre de 600 ml. Se recogen aproximadamente 10 ml de tejido adiposo en una jeringa de 10 ml a través de la cánula roma. La cánula roma se reemplaza con una aguja
- 10 relativamente puntiaguda (14G). El sitio de muestreo se limpia con una toallita de yodo. El tejido adiposo se inyecta en la bolsa de 600 ml a través del sitio de muestreo. Después, la jeringa y la aguja se desechan en una cámara de puntas peligrosas. Estas etapas se repiten para poner suficiente tejido dentro de la bolsa. Se determina un tejido suficiente en una base caso por caso en base a las especificidades clínicas del paciente y la aplicación.
- 15 En segundo lugar, se lava el tejido adiposo aspirado. Una bolsa de solución salina salina precalentada (37 °C) se cuelga por encima de la superficie de trabajo. Una abrazadera hemostática azul se coloca en el tubo entre la bolsa de 600 ml y la punta. La abrazadera se cierra para sellar el tubo. La punta en la bolsa de 600 ml se utiliza para introducir la bolsa de solución salina (en este caso usar la aguja en la bolsa de 600 ml para introducir la bolsa de solución salina a través del tapón de goma, limpiar el tapón con yodo antes de insertar la aguja). La abrazadera azul se libera y se dejan entrar aproximadamente 150 ml de solución salina en la bolsa de 600 ml. La abrazadera azul se cierra cuando el volumen deseado de solución salina ha entrado en la bolsa de 600 ml. La bolsa de 600 ml se invierte 10-15 veces durante aproximadamente 15 segundos. Una segunda pinza azul se aplica al conducto que conduce de la bolsa de residuos de 3 l a la punta. La punta en la bolsa de 3 l se utiliza para entrar en la bolsa de 600 ml. La bolsa de 600 ml se cuelga invertida sobre la superficie de trabajo, y se deja reposar durante aproximadamente
- 20 1 minuto. La abrazadera azul que conduce a la bolsa de 3 l se libera. Se permite que el fluido residual fluya dentro de la bolsa de 3 l. La abrazadera azul se aplica para detener el flujo antes de que el tejido entre en el tubo. La bolsa de 600 ml se baja a la superficie de trabajo. Estas etapas se repiten dos veces más. Si el residuo de solución salina sigue apareciendo notablemente rojo, se indica un tercer ciclo adicional. Se utiliza un sellador de calor para sellar el tubo entre la bolsa de residuos de 3 l y la bolsa de 600 ml. El sello se hace aproximadamente a la mitad del tubo. La
- 25 30 bolsa de 3 l se retira y se desecha. La bolsa de 600 ml se devuelve a la superficie de trabajo.

- En tercer lugar, se digiere el tejido adiposo lavado. La abrazadera azul en el tubo entre la solución salina y la bolsa de 600 ml se libera para permitir que aproximadamente 150 ml de solución salina entren en la bolsa de 600 ml. El sitio de muestreo en la bolsa de 600 ml se limpia con una toallita de yodo. La colagenasa se inyecta a través del sitio
- 35 de muestreo a la bolsa de 600 ml. La colagenasa se prepara descongelando un vial de colagenasa en un baño de agua a 37 °C o equivalente, en lugar de por microondas. Se inserta una jeringa de 1 ml con una aguja de 22 G en el vial. La colagenasa se retira en la aguja. La aguja se retira y se reemplaza con un filtro de 0,2 µm y una segunda aguja 22G. La colagenasa se expulsa después de la jeringa a través del filtro de 0,2 µm y la aguja. La digestión del tejido adiposo se realiza a una concentración final de colagenasa de 0,1-0,2 unidades de Wünsch/ml. La almohadilla calefactora se coloca sobre el agitador. Durante este tiempo, la bolsa de solución salina, aunque todavía está unida, se coloca al lado del agitador. Se ha de tener cuidado en asegurar que el tubo que conduce a la bolsa de solución salina se coloque de tal manera que no se quede atrapado en el agitador cuando está en movimiento. El regulador de la almohadilla calefactora se ajusta a 37 °C. La bolsa de 600 ml se coloca sobre el agitador. El agitador se ajusta al máximo. Se observa la bolsa para asegurar que esté estable, y se deja balanceándose durante aproximadamente
- 40 45 1 hora (55 ± 10 minutos).

- En cuarto lugar, se recupera la composición de células regenerativas. La bolsa se retira del agitador. Una abrazadera azul se aplica al tubo cerrada antes de dirigirse a la bolsa de residuos. El dispositivo de conexión estéril se utiliza para fijar el conjunto de bolsa cuádruple (preparado previamente de acuerdo con las siguientes
- 50 instrucciones) al tubo que se unió anteriormente a la bolsa de residuos. El paquete cuádruple se puede ver como dos paquetes de cuádruples unidos. Identifique el tubo que lo divide en dos paquetes, plegar el tubo sobre sí mismo, y deslizar un bucle de metal por el tubo plegado (sobre ambas piezas del tubo). Deslizar el bucle hacia abajo aprox. 0,5 pulgadas. El rizo formado en la curva actúa para sellar el tubo. Utilizar un hemostato para rizar parcialmente el bucle cerrado. El bucle no está demasiado rizado porque el bucle necesitará retirarse durante el procesamiento. La
- 55 bolsa de 600 ml se cuelga invertida sobre la superficie de trabajo, y se deja reposar durante aproximadamente 3 minutos. La abrazadera azul en el tubo que conduce al conjunto cuádruple se libera para drenar la fracción celular (la capa debajo de la capa de grasa amarilla/naranja) en el conjunto cuádruple. Se tiene cuidado para evitar que la capa de grasa entre en el tubo. Durante este proceso, el tubo puede rizarse manualmente para retardar el flujo a medida que la capa de grasa se acerca al tubo. El tubo que conduce al conjunto de bolsas cuádruples se cierra con

una abrazadera azul, la bolsa de 600 ml se devuelve a la superficie de trabajo, y la bolsa de solución salina se cuelga. La abrazadera azul en el tubo entre la solución salina y la bolsa de 600 ml se libera para permitir que aproximadamente 150 ml de solución salina entren en la bolsa de 600 ml. La bolsa de 600 ml se invierte aproximadamente 10-15 veces durante aproximadamente 15 segundos. Después, la bolsa de 600 ml se cuelga  
 5 invertida sobre la superficie de trabajo, y se deja reposar durante aproximadamente 3-5 minutos. La abrazadera azul en el tubo que conduce al conjunto cuádruple se libera, y la fracción celular (la capa debajo de la capa de grasa amarilla/naranja) se drena en el conjunto cuádruple. Se tiene cuidado para evitar que la capa de grasa entre en el tubo. Por ejemplo, el flujo puede ralentizarse a medida que la capa de grasa se acerque al tubo rizando el tubo manualmente. El tubo que conduce al conjunto de bolsas cuádruples se cierra con una abrazadera azul. El tubo que  
 10 conduce desde el conjunto de cuatro a la bolsa de 600 ml se termosella a continuación. La bolsa de 600 ml se retira y se desecha.

En quinto lugar, se lava la composición de células regenerativas. Un clip de metal se coloca en el tubo entre las dos bolsas llenas para sellar el tubo. El conjunto cuádruple se coloca en equilibrio. Se añade agua a un segundo  
 15 conjunto "ficticio" cuádruple para equilibrar el conjunto cuádruple. El conjunto cuádruple y el conjunto equilibrado se colocan en cubetas opuestas de la centrífuga. Para el filtro hueco, las células se lavan y se colocan en la bolsa, y el tubo se sella entre la bolsa y el conjunto de filtro de fibra hueca descrito anteriormente. Usando una bomba peristáltica, el fluido se pasa a través del conjunto de filtro y el concentrado de células se recoge en una bolsa en el extremo de aguas abajo. Se tiene cuidado de asegurarse de que las bolsas cuádruples no estén comprimidas y  
 20 estén en posición vertical. La centrífuga se hace funcionar a 400 x g durante 10 minutos. El conjunto cuádruple se retira de la centrífuga y se coloca en el dispositivo de expresión de plasma. Se tiene cuidado de colocar las bolsas en el dispositivo de expresión de tal manera que el tubo duro en la parte superior de la bolsa quede justo en la parte superior de la placa posterior. Si la bolsa es demasiado alta, se mantendrá demasiada solución salina, si es demasiado baja, el tubo interferirá con la capacidad de cierre de la placa frontal y otra vez se mantendrá demasiada  
 25 solución salina. Una pinza azul se aplica a cada una de las líneas que van desde el conjunto cuádruple completo hasta el vacío. Los bucles de metal y las abrazaderas azules se eliminan para permitir que el sobrenadante fluya hacia el conjunto cuádruple vacío. Se expresa la mayor cantidad posible de solución salina, pero se tiene cuidado de no desalojar el sedimento celular. El tubo que entra en cada una de las bolsas que contienen el sobrenadante se sella térmicamente. Se retiran las bolsas de residuos que contienen el sobrenadante. Las abrazaderas azules se  
 30 aplican al tubo que conduce a cada una de las bolsas cuádruples que contienen células. Las bolsas se sacan del dispositivo de expresión de plasma. Un dispositivo de conexión estéril se utiliza para conectar el tubo que conduce al paquete cuádruple y a la bolsa de solución salina. La abrazadera azul que conduce a una de las bolsas cuádruples se retira para permitir que aproximadamente 150 ml de solución salina fluyan en la bolsa, y luego la abrazadera se vuelve a aplicar para detener el flujo de solución salina. La bolsa del conjunto cuádruple completa se  
 35 invierte aproximadamente 10-15 veces durante aproximadamente 15 segundos. La abrazadera azul que conduce a la bolsa vacía del conjunto cuádruple se retira entonces y se drena todo el contenido de la bolsa llena en la bolsa vacía. La abrazadera metálica de bucle se vuelve a aplicar para sellar el tubo entre dos bolsas del conjunto cuádruple. A continuación, el tubo se sella térmicamente y se retira la bolsa de solución salina. La bolsa del conjunto cuádruple completa se invierte aproximadamente 10-15 veces durante aproximadamente 15 segundos. Otro  
 40 conjunto cuádruple ficticio se coloca en una balanza y se vuelve a equilibrar con el conjunto cuádruple de células. Las bolsas del conjunto cuádruple (una llena, una vacía) se colocan entonces en la centrífuga para que las bolsas cuádruples no estén comprimidas y estén en posición vertical.

La centrífuga se hace funcionar a aproximadamente 400 x g durante 10 minutos. El conjunto cuádruple se retira  
 45 entonces de la centrífuga y se coloca cuidadosamente en el dispositivo de expresión de plasma de tal manera que la tubería dura en la parte superior de la bolsa esté justo en la parte superior de la placa posterior. Si la bolsa es demasiado alta, se mantendrá demasiada solución salina, si es demasiado baja, el tubo interferirá con la capacidad de cierre de la placa frontal y otra vez se mantendrá demasiada solución salina. El bucle de metal se retira para expresar todo el sobrenadante de la bolsa llena en la bolsa vacía teniendo cuidado de no tirar el sedimento de  
 50 células regenerativo. El tubo entre las bolsas se sella, y la bolsa (de residuos) completa se retira y se desecha. Un nuevo acoplador de sitio de muestreo se inserta entonces en la bolsa restante. Las células del sedimento celular se resuspenden entonces en la solución salina residual (si existe) para obtener una concentración de células regenerativas. La resuspensión se puede llevar a cabo por manipulación suave de la bolsa (por ejemplo, compresión y frotamiento).

55 Un ejemplo particular del sistema que incorpora la presente invención se muestra en la figura 4. La figura 4 ilustra un sistema automático y procedimiento para separar y concentrar células regenerativas de tejido, por ejemplo, tejido adiposo, adecuadas para reinfusión dentro de un paciente. En ciertas versiones del sistema mostrado en la figura 4, el sistema incluye adicionalmente una etapa automática para aspirar una cantidad dada de tejido del paciente. El

sistema mostrado en la figura 4 está compuesto por el conjunto desechable mostrado en la figura 13 que se conecta al componente reutilizable del sistema mostrado en la figura 14 para llegar a una versión automática del sistema mostrado en la figura 15A. El conjunto desechable se conecta al componente reutilizable a través, por ejemplo, de un dispositivo de engranaje o acoplamiento o configuración, que conecta el conjunto desechable con el componente reutilizable de modo que el conjunto desechable se una de forma segura y se asocie con el componente de hardware reutilizable de una manera que el dispositivo de procesamiento presente en el componente reutilizable pueda controlar y con el que pueda funcionar en conjunto, es decir, enviar y recibir señales a y desde los diversos componentes del conjunto desechable, así como diversos componentes del componente reutilizable y otros dispositivos y sistemas asociados.

10

El usuario puede conectar el conjunto desechable al componente reutilizable, introducir ciertos parámetros usando el interfaz del usuario, por ejemplo, el volumen de tejido a recoger, unir el sistema al paciente y el sistema automáticamente realiza todas las etapas mostradas en la figura 4 en una secuencia ininterrumpida usando parámetros preprogramados y/o introducidos por el usuario. Una secuencia tal se ilustra en la figura 15B. Como alternativa, el tejido puede aspirarse manualmente del paciente por el usuario y transportarse al sistema para su procesamiento, es decir, separación y concentración de células regenerativas.

15

Específicamente, como se muestra en la figura 4, el tejido, por ejemplo, tejido adiposo puede retirarse del paciente usando el conducto 12 e introducirse en la cámara de recogida 20. Una ilustración detallada de la cámara de recogida de la figura 4 se muestra en la figura 5. Como se ilustra en la figura 5, la cámara de recogida 20 puede estar compuesta por una línea de vacío 11 que facilita la retirada del tejido usando una cánula convencional. El usuario puede introducir el volumen estimado de tejido dirigido a la cámara de recogida 20 en este punto. El tejido se introduce en la cámara de recogida 20 a través de un puerto de entrada 21 que es parte de una ruta de fluido cerrada que permite al tejido, solución salina y otros agentes añadirse al tejido de una manera aséptica. Un sensor óptico del sistema, por ejemplo, sensor 29, puede detectar cuando el volumen de tejido introducido por el usuario está presente en la cámara de recogida 20. En ciertas versiones, si está presente menos tejido en la cámara de recogida que el introducido por el usuario, el usuario tendrá la opción de comenzar a procesar el volumen de tejido que está presente en la cámara de recogida 20. En ciertas versiones, una parte del tejido retirado del paciente puede dirigirse a la cámara de muestras 60 a través del uso de una bomba, por ejemplo, una bomba peristáltica, mediante un conducto, que puede activarse mediante entrada del usuario utilizando las interfaces de usuario.

20

25

30

Un sensor 29 puede señalar el dispositivo de procesamiento presente en el componente reutilizable para activar las etapas necesarias para lavar y disgregar el tejido. Por ejemplo, el dispositivo de procesamiento puede introducir un volumen prefijado de agente de lavado basándose en el volumen de tejido recogido usando válvulas y bombas automáticas. Este ciclo puede repetirse en la cámara de recogida hasta que el sensor óptico determine que el líquido efluente es suficientemente transparente y desprovisto de material no deseado. Por ejemplo, un sensor óptico 29 junto con el conducto que conduce fuera de la cámara de recogida 12b o 12d puede detectar que los materiales no deseados se han retirado y puede señalar para que el dispositivo de procesamiento cierre las válvulas requeridas e inicie la siguiente etapa.

35

40

A continuación, el dispositivo de procesamiento puede introducir una cantidad preprogramada de agente de disgregación basándose en el volumen de tejido recogido. El dispositivo de procesamiento también puede activar la agitación del tejido en la cámara de recogida durante un periodo prefijado de tiempo basándose en el volumen inicial de tejido recogido o basándose en la entrada de usuario. En la versión mostrada en la figura 4, una vez que el agente de disgregación, por ejemplo, colagenasa, se añade a la cámara de recogida 20 a través de la fuente de colagenasa 24, el motor en la cámara de recogida 20 se activa mediante el dispositivo de procesamiento. El motor activa el eje rotatorio 25 que está compuesto por un agitador magnético y un dispositivo de tipo pala en el que una o más palas 25a están unidas de forma rígida al cartucho de filtro 27 de un filtro prefijado a la cámara de recogida 28. Las palas agitan en presencia del agente de disgregación de modo que las células regenerativas se separan del tejido.

45

50

Se permite que la solución en la cámara de recogida 20 se asiente durante un periodo prefijado de tiempo. Se permite que la parte flotante de la solución ascienda hasta la parte superior de la solución. Una vez que ha pasado el periodo de tiempo prefijado, las válvulas y bombas necesarias se activan por el dispositivo de procesamiento para retirar la parte no flotante a la cámara de residuos 40. La transferencia a la cámara de residuos 40 continúa hasta que un sensor 29 a lo largo del conducto que conduce a la cámara de recogida 12b o 12d puede detectar que la fracción flotante de la solución está a punto de transferirse a la cámara de residuos 30. Por ejemplo, un sensor 29 a lo largo del conducto que conduce a la cámara de recogida 12b o 12d puede detectar que los materiales no deseados se han retirado y puede señalar al dispositivo de procesamiento para que cierre las válvulas requeridas.

55

En este momento la fracción no flotante de la solución, es decir, la composición de células regenerativas, se mueve a la cámara de procesamiento 30. Esto se consigue a través del uso de las válvulas necesarias y las bombas peristálticas. En ciertas versiones, antes de la transferencia de la composición de células regenerativas a la cámara de procesamiento 30, puede añadirse un volumen adicional de solución salina a la fracción flotante de la solución que permanece en la cámara de recogida 20. Puede repetirse otro ciclo de lavado. Después de este ciclo, se permite que la solución se asiente y la fracción no flotante (que contiene las células regenerativas) se transporte a la cámara de procesamiento 30 y la fracción flotante se drene a la cámara de residuos 40. El ciclo de lavado adicional se usa para optimizar la transferencia de todas las células regenerativas separadas a la cámara de procesamiento

Una vez que la composición de células regenerativas se transporta a la cámara de procesamiento 30 por medio de los conductos 12, la composición puede someterse a una o más etapas de lavado adicionales antes del comienzo de la fase de concentración. Esto asegura la retirada de contaminantes residuales y residuos de la cámara de recogida 20. De forma similar, posteriormente a la etapa de concentración, la composición de células regenerativas puede someterse a una o más etapas de lavado adicionales para retirar los contaminantes residuales. Pueden retirarse los materiales no deseados de la cámara de procesamiento 30 a la cámara de residuos 40 de la misma manera, es decir, control de válvulas y bombas mediante señales desde el dispositivo de procesamiento, como se ha descrito anteriormente.

Las diversas versiones de la cámara de procesamiento 30 mostrada en la figura 4, se describen en detalle a continuación. La cámara de procesamiento 30 mostrada en la figura 4 está en forma de una cámara de centrífuga. Una ilustración detallada de la cámara de procesamiento de la figura 4 se muestra en las figuras 7 y 8. Una cámara de procesamiento tal 30 está comprendida generalmente por una red de sellado rotatoria 30.1 que comprende un alojamiento exterior 30.2, uno o más sellos 30.3, uno o más cojinetes 30.4 y un punto de unión 30.6 para conectar la cámara de procesamiento al dispositivo de centrífuga presente en el componente reutilizable del sistema; una o más rutas fluidas 30.5 en forma de conductos que se extienden desde el sello rotatorio y que terminan en una cámara de centrífuga en cada extremo que está en forma de una cámara de salida 50 alojada en un marco 53 estando comprendido el marco por uno o más puertos 52 y una o más palancas para reposicionar manualmente la cámara de salida 50.

La red de sellado rotatoria 30.1 está incluida para asegurar que las rutas fluidas de la cámara de procesamiento pueden mantenerse en una condición estéril. Además, puede accederse a las rutas de fluido de la cámara de procesamiento de una manera estéril (por ejemplo, para añadir agentes o solución de lavado) en cualquier momento, incluso cuando la cámara de centrífuga de la cámara de procesamiento está girando.

La red de sellado rotatoria 30.1 mostrada en las figuras 7 y 8 incluye un eje rotatorio compuesto por dos o más soportes 30.4, tres o más sellos de reborde 30.3 y un alojamiento exterior 30.2. En esta versión, los cojinetes 30.4 comprenden adicionalmente un eje exterior e interior (no mostrados) denominados en el presente documento canales. Estos canales pueden separarse por esferas pulidas de precisión. Los canales y esferas que comprenden los cojinetes están preferiblemente fabricados con material adecuado para contacto con fluido corporal o están revestidos con material adecuado para contacto con fluido corporal. En una versión preferida, los canales y esferas están fabricados usando, por ejemplo, nitrato de silicón o zirconia. Además, en esta versión, los tres sellos de reborde están comprendidos por un canal en forma de "U" circular (no mostrado), así como un muelle circular (no mostrado). El canal en forma de "U" circular está preferiblemente fabricado usando material flexible de modo que se forma un punto de unión a prueba de filtraciones con el eje rotatorio de la red de sellado rotatoria 30.1. Adicionalmente, los sellados de reborde se orientan preferiblemente de una manera tal que la presión de la composición de células regenerativas que fluye a través de la cámara de procesamiento provoque que el conjunto de sellos estrechen su unión con el eje rotatorio por medio de tensión aumentada. Los sellos pueden asegurarse en su posición por medio de una o más grapas circulares (no mostradas) que son capaces de extender y/o colapsar según se requiera para engranar con una ranura en el alojamiento exterior 30.2 de la red de sellado rotatoria 30.1. El calor generado por o cerca de la red de sellado rotatoria 30.1 debe controlarse para evitar la lisis de las células en la solución que se está moviendo a través del paso. Esto puede conseguirse mediante, por ejemplo, selección de un material duro para construir el eje rotatorio, puliendo el área del eje rotatorio que entra en contacto con los sellos y minimizando el contacto entre el eje rotatorio y el sello.

En otra versión, la red de sellado rotatoria 30.1 está compuesta por un sello de goma sencillo 30.3 y una junta de aire (no mostrada). Este sello y junta proporcionan una ruta sinuosa para cualquier materia biológica que pudiera comprometer la esterilidad del sistema. En otra versión, la red de sello rotatoria 30.1 está compuesta por múltiples

sellos cargados en muelles 30.3 que aíslan las rutas de fluido individuales. Los sellos 30.3 están fabricados por un material que puede esterilizarse así como sellar el eje rotatorio sin lubricante. En otra versión la red de sello rotatoria 30.1 está compuesta por un par de discos de cerámica (no mostrados) que crean las diferentes rutas de fluido y que pueden soportar la rotación del sistema y no provocar lisis celular. En otra versión la ruta de fluido es flexible y se permite que se enrolle y desenrolle con respecto a la cámara de procesamiento. Esto se consigue haciendo que la ruta de fluido flexible rote una revolución por cada dos revoluciones de la cámara de procesamiento 30. Esto elimina la necesidad de un sello rotatorio completamente.

La composición de células regenerativas se bombea desde la cámara de recogida 20 por una ruta fluida a través del eje de rotación de la red de sello rotatoria 30.1 y después se divide en un mínimo de dos rutas fluidas 30.5 cada una de las cuales irradia hacia fuera desde el eje central de la cámara de procesamiento 30 y termina cerca de los extremos exteriores de la cámara de procesamiento 30, es decir, dentro de las cámaras de centrífuga que alojan las cámaras de salida 50 (figura 7 y 8). Por consiguiente, en una versión preferida, la cámara de procesamiento 30 está compuesta por dos o más cámaras de salida 50 como se muestra en las figuras 7 y 8. Estas cámaras de salida 50 están situadas de modo que estén en una orientación durante el procesamiento 30.7 y en otra orientación para la recuperación de células regenerativas concentradas 30.8. Por ejemplo, los cambios de producción están inclinados en un ángulo durante el procesamiento y otro ángulo para la recuperación de células. El ángulo de recuperación de células es más vertical que el ángulo de procesamiento. Las dos posiciones de la cámara de salida 50 pueden manipularse manualmente a través de una palanca 53 que sobresale de la cámara de procesamiento 30. Las células regenerativas pueden recuperarse manualmente desde las cámaras de salida 50 cuando están en la orientación de recuperación 30.8 usando una jeringa. En otra versión, se construye ruta fluida 30.5 de modo que se divida fuera de la cámara de procesamiento y después se conecte con los extremos exteriores de la cámara de procesamiento 30, es decir, dentro de las cámaras de centrífuga que alojan las cámaras de salida 50 (no mostrado). En esta versión, grandes volúmenes de composición de células regenerativas y/o aditivos, soluciones, etc. pueden transportarse a la cámara de centrífuga y/o las cámaras de salida directamente.

Con referencia a las figuras 4 y 7-9, entre la cámara de recogida 20 y la cámara de procesamiento 30, pueden proporcionarse una bomba 34 y una o más válvulas 14. En una versión preferida, las válvulas 14 son válvulas electromecánicas. Además, pueden proporcionarse sensores, tales como sensor de presión 29 en línea con la cámara de procesamiento 30 y la cámara de recogida 20. Las válvulas, bombas y sensores actúan en sintonía con el dispositivo de procesamiento presente en el componente reutilizable (figura 14) para automatizar las etapas de concentración del sistema.

Los sensores detectan la presencia de la composición de células regenerativas en las cámaras de centrífuga y activan el dispositivo de centrífuga a través de comunicación con el dispositivo de procesamiento del sistema. La composición de células regenerativas se somete después a una carga preprogramada durante un tiempo preprogramado basándose en la cantidad de tejido recogido originalmente y/o entrada de usuario. En ciertas versiones, esta etapa puede repetirse automáticamente o a través de entrada de usuario. Por ejemplo, la composición se somete a una carga de aproximadamente 400 veces la fuerza de la gravedad durante un periodo de aproximadamente 5 minutos. La cámara de salida 50 se construye de modo que los extremos exteriores de la cámara formen un depósito pequeño para las partículas densas y células. La cámara de salida 50 conserva las partículas densas en lo que se denomina un "sedimento celular", mientras que permite que el sobrenadante más ligero se retire a través de una ruta fluida, por ejemplo, una ruta fluida que está a lo largo del eje de rotación de la red de sellado rotatoria 30.1 y viaja desde el punto inferior en el centro de la cámara de procesamiento 30 a través de la red de sellado rotatoria 30.1 al depósito de residuos 40. Las válvulas 14 y bombas 34 señalizan al dispositivo de procesamiento para activar las etapas de retirar el sobrenadante al depósito de residuos 40 sin alterar el sedimento celular presente en la cámara de salida 50.

El sedimento celular que se obtiene usando el sistema mostrado en la figura 4 comprende las células regenerativas concentradas de la invención. En algunas versiones, después de que se ha retirado el sobrenadante y se ha dirigido a la cámara de residuos 40, puede usarse una ruta fluida 30.5 para resuspender el sedimento celular que se forma después de la centrifugación con soluciones y/u otros aditivos adicionales. La resuspensión del sedimento celular de esta manera posibilita lavados adicionales de las células regenerativas para retirar proteínas no deseadas y compuestos químicos así como aumentar el flujo de oxígeno a las células. La suspensión resultante puede someterse a otra carga de aproximadamente 400 veces la fuerza de la gravedad durante otro periodo de aproximadamente 5 minutos. Después de que se forme un segundo sedimento celular y el sobrenadante resultante se retire a la cámara de residuos 40, puede realizarse un lavado final de la manera descrita anteriormente con solución salina u otra solución de tampón apropiada. Estos lavados repetidos pueden realizarse múltiples veces para potenciar la pureza de la solución de células regenerativas. En ciertas versiones, la solución salina puede añadirse

en cualquier etapa que se considere necesaria para mejorar el procesamiento. Las concentraciones de las células regenerativas obtenidas usando el sistema mostrado en la figura 4 pueden variar dependiendo de la cantidad de tejido recogido, edad del paciente, perfil del paciente, etc. Se proporcionan rendimientos ejemplares en la Tabla 1.

- 5 El sedimento final presente en la cámara de salida 50 puede después recuperarse de una manera aséptica usando una jeringa apropiada después de que la cámara de salida 50 se haya posicionado en la orientación apropiada para la retirada de células. En otras versiones, el sedimento final puede moverse automáticamente a un depósito en la cámara de salida 50 que puede retirarse y almacenarse o usarse según se necesite. Este depósito puede ser de cualquier forma o tamaño apropiados. Por ejemplo, el depósito puede ser una jeringa. En ciertas versiones, el
- 10 depósito de salida 50 en sí mismo puede estar sellado por calor (automática o manualmente) y aislado de los otros componentes de la cámara de procesamiento para recuperación y uso posterior de las células regenerativas en aplicaciones terapéuticas como se describen en el presente documento incluyendo reinfusión en el paciente. Las células también pueden someterse a procesamiento adicional como se describe en el presente documento antes de la recuperación de la cámara de salida o después de la transferencia a un segundo sistema o dispositivo. El
- 15 componente reutilizable mostrado en la figura 14 se construye de modo que pueda conectarse con uno o más sistemas o dispositivos adicionales para procesamiento adicional según sea necesario.

Como se describe en el presente documento, las células regenerativas obtenidas utilizando los sistemas y métodos de la presente invención se pueden usar para tratar PVD y enfermedades y trastornos relacionados basándose en sus propiedades como se describe en los Ejemplos. Por ejemplo, las células regenerativas tienen la capacidad de sintetizar y secretar factores de crecimiento que estimulan la formación de nuevos vasos sanguíneos, la capacidad de sintetizar y secretar factores de crecimiento que estimulan la supervivencia y proliferación celular, y la capacidad de proliferar y diferenciarse en células que participan directamente en la nueva formación de vasos sanguíneos. Por consiguiente, en un aspecto de la presente invención, las células regenerativas se extraen del tejido adiposo de un

20 donante usando los sistemas y métodos de la presente invención y se usan para obtener un beneficio terapéutico en los vasos sanguíneos ocluidos a través de uno o más de los mecanismos demostrados en el presente documento. En una realización preferida, las células se extraen del tejido adiposo de la persona a la que se van a administrar/implantar, reduciendo de este modo posibles complicaciones asociadas con respuestas antigénicas y/o inmunógenas al trasplante. Los pacientes son típicamente evaluados para valorar la PVD por uno o más de los

30 siguientes procedimientos realizados por un médico u otro proveedor clínico: historial médico del paciente, examen físico y datos objetivos.

En una realización, el procedimiento de recogida se lleva a cabo antes de que el paciente reciba cualquier producto diseñado para reducir la coagulación sanguínea en relación con el tratamiento de PVD o trastorno relacionado. Sin embargo, en ciertas realizaciones, el paciente puede haber recibido aspirina antes del procedimiento de recolección. Además, un método preferido incluye la recogida de tejido adiposo antes de cualquier intento de procedimiento. Sin embargo, como se entiende por los expertos en la técnica, se espera que el tiempo de recogida varíe y dependerá de varios factores incluyendo, entre otras cosas, la estabilidad del paciente, el perfil de coagulación del paciente, la disponibilidad del proveedor y estándares de calidad en cuidados. En última instancia, el momento de la recolección

40 será determinado por el profesional responsable atender al paciente afectado.

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

45

Las células pueden administrarse, tal como por inyección, a un paciente en cualquier situación en la que se produzca PVD. Las células se pueden extraer de antemano y almacenarse de una manera crioconservada o pueden extraerse en o cerca del momento de necesidad definida. Como se desvela en el presente documento, las células

50 pueden administrarse al paciente, tal como, por ejemplo, por inyección, o aplicarse directamente al tejido dañado, tal como, por ejemplo, por inyección, o en proximidad del tejido dañado, tal como, por ejemplo, mediante inyección, sin procesamiento adicional o tras procedimientos adicionales para purificar, modificar, estimular o cambiar de otra manera las células. Por ejemplo, las células obtenidas de un paciente pueden administrarse (por ejemplo, inyectadas) a un paciente que lo necesite sin cultivar las células antes de administrarlas al paciente. En una

55 realización, la recogida de tejido adiposo se realizará en la habitación de un paciente. Puede usarse supervisión hemodinámica para controlar el estado clínico del paciente.

De acuerdo con la invención, las células regenerativas se pueden suministrar al paciente poco después de recoger el tejido adiposo del paciente. Por ejemplo, las células pueden administrarse inmediatamente después del

procesamiento del tejido adiposo para obtener una composición de células regenerativas. En otra realización, la temporización para la administración puede ser relativamente más larga si las células que se vuelven a infundir al paciente están sujetas a una modificación, purificación, estimulación u otra manipulación adicional, como se analiza en el presente documento. Además, las células regenerativas pueden administrarse varias veces. Por ejemplo, las células pueden administrarse continuamente durante un periodo prolongado de tiempo (por ejemplo, horas), o pueden administrarse en múltiples inyecciones en bolo extendidas durante un periodo de tiempo. En ciertas realizaciones, se administrará una administración inicial de células en aproximadamente 12 horas, tal como a las 6 horas, y se administrarán una o más dosis de células a intervalos de 12 horas.

- 10 El número de células administradas a un paciente puede estar relacionado, por ejemplo, con el rendimiento celular después del procesamiento del tejido adiposo. Una parte del número total de células puede conservarse para su uso posterior o crioconservarse. Además, la dosis administrada dependerá de la vía de administración de las células al paciente. En una realización de la invención, se espera que el número de células regenerativas a administrar al paciente sea de aproximadamente  $5,5 \times 10^5$  células. Sin embargo, este número puede ajustarse por órdenes de magnitud para conseguir el efecto terapéutico deseado.

Las células también pueden aplicarse con aditivos para potenciar, controlar o dirigir de otro modo el efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, en una realización, y como se describe en el presente documento, las células pueden purificarse adicionalmente mediante el uso de selección celular positiva y/o negativa mediada por anticuerpos para enriquecer la población de células para aumentar la eficacia, reducir la morbilidad o facilitar la facilidad del procedimiento. De forma similar, las células pueden aplicarse con una matriz biocompatible que facilita el diseño tisular *in vivo* al soportar y/o dirigir el destino de las células implantadas. De la misma manera, las células pueden administrarse después de la manipulación genética de tal manera que expresen productos génicos que se cree o están destinados a promover la respuesta o respuestas terapéuticas proporcionadas por las células. Los ejemplos de manipulaciones incluyen manipulaciones para controlar (aumentar o disminuir) la expresión de factores que promueven la angiogénesis o la vasculogénesis (por ejemplo, VEGF).

En una realización, se prefiere la administración indirecta de células al sitio del beneficio deseado. Esto puede lograrse mediante una inyección intravenosa periférica. Las vías de administración conocidas por un experto en la técnica incluyen, pero no se limitan a, intravenosa, intraarterial, y pueden o no incluir un mecanismo de administración basado en catéter endovascular.

Las células pueden inyectarse en un solo bolo, a través de una infusión lenta, o a través de una serie escalonada de aplicaciones separadas varias horas o, siempre que las células se almacenen apropiadamente, varios días o semanas. Como se ha mencionado anteriormente, las células también pueden aplicarse mediante el uso de cateterización de tal manera que las células se suministran directamente a la región del tejido isquémico afectado. Al igual que con el acceso venoso periférico, las células se pueden inyectar a través de los catéteres en un único bolo o en múltiples alcuotas más pequeñas. Las células también pueden aplicarse directamente al tejido afectado en el momento de la cirugía abierta de derivación periférica.

En una realización, la ruta de administración incluirá la administración intravenosa a través de un catéter intravenoso periférico estándar, o un catéter venoso central. El flujo de células puede controlarse por inflado/desinflado en serie de globos distales y proximales situados dentro de la vasculatura del paciente, creando así zonas temporales sin flujo que promueven el injerto celular o la acción terapéutica celular. Además, las células se pueden administrar a través de las siguientes rutas, en solitario o en combinación con uno o más de los enfoques identificados anteriormente: subcutánea, intramuscular y sublingual.

La dosis celular administrada al paciente dependerá de la cantidad de tejido adiposo recolectado y del índice de masa corporal del donante (como una medida de la cantidad de tejido adiposo disponible). La cantidad de tejido cosechado también se determinará por la distribución de tejido isquémico o afectado. Los múltiples tratamientos que utilizan múltiples cosechas de tejidos o que utilizan una única cosecha con el almacenamiento apropiado de células entre las aplicaciones están dentro del alcance de esta invención.

Las porciones de la lipoaspirado procesado pueden almacenarse antes de administrarse a un paciente. Para el almacenamiento a corto plazo (menos de 6 horas), las células pueden almacenarse a temperatura ambiente o por debajo de la misma en un recipiente sellado con o sin suplementación con una solución nutritiva. El almacenamiento a medio plazo (menos de 48 horas) se realiza preferiblemente a 2-8 °C en una solución isosmótica tamponada (por ejemplo, Plasmalyte®) en un recipiente compuesto por o recubierto de un material que evita la adhesión celular. El almacenamiento a más largo plazo se realiza preferiblemente mediante crioconservación y almacenamiento adecuados de células en condiciones que promueven la retención de la función celular, tal como se desvela en la

Solicitud PCT numero PCT/US02/29207, presentada el 13 de septiembre de 2002 y la Solicitud provisional de Estados Unidos número 60/322.070, presentada el 14 de septiembre de 2001 de propiedad común y cedidas.

De acuerdo con un aspecto de la invención, las células derivadas del tejido adiposo que se administran a un paciente pueden actuar como vehículos de administración del factor de crecimiento. Por ejemplo, mediante la ingeniería las células expresan uno o más factores de crecimiento adecuados para aliviar los síntomas asociados con la enfermedad vascular periférica, las células pueden administrarse a un paciente, y diseñarse para liberar uno o más de los factores de crecimiento. La liberación puede proporcionarse de manera controlada durante periodos prolongados de tiempo. Por ejemplo, la liberación puede ser controlada de manera que el factor o factores de crecimiento se liberen de una manera pulsada o periódica de manera que haya elevaciones locales en el factor de crecimiento, y/o recesiones locales en la cantidad de factor de crecimiento en la proximidad de una zona de tejido afectada.

Las células que se administran al paciente no sólo ayudan a restaurar la función a tejidos dañados o enfermos de otro modo, sino que también facilitan la remodelación de los tejidos dañados. La entrega celular puede tener lugar, pero no se limita a, los siguientes lugares: clínica, despacho de clínica, centro de diálisis, servicio de urgencias, sala de hospitalización, unidad de cuidados intensivos, quirófano, salas de cateterismo y suites radiológicas. En una realización, los efectos de la terapia de administración celular se demostrarán mediante, pero sin limitación, una de las siguientes medidas clínicas: flujo sanguíneo mejorado según se mide por; ultrasonografía dúplex, angiografía y angiografía por resonancia magnética; reducción de los síntomas (claudicación); cicatrización de las ulceraciones isquémicas; aumento del contenido de oxígeno del tejido, medido por pletismografía corporal; mejora en el índice tobillo-brazo (ABI). Los efectos de la terapia celular pueden ser evidentes durante el transcurso de días a semanas después del procedimiento. Sin embargo, los efectos beneficiosos pueden observarse tan pronto como en varias horas después del procedimiento, y pueden durar durante varios años. Los pacientes se supervisa típicamente antes y durante la administración de las células. Los procedimientos de supervisión pueden incluir, pero sin limitación, estudios de coagulación, saturación de oxígeno y monitoreo hemodinámico.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para demostrar situaciones y configuraciones particulares en las que esta tecnología puede aplicarse y no pretenden restringir el alcance de la invención y las reivindicaciones incluidas en esta descripción.

### Ejemplos

Las ADC o las células regenerativas utilizadas a lo largo de todos los ejemplos expuestos a continuación pueden obtenerse por el método o métodos descritos en la presente divulgación y/o el método o métodos descritos en la Solicitud de Estados Unidos N.º de serie 10/316.127, titulada SYSTEMS AND METHODS FOR TREATING PATIENTS WITH PROCESSED LIPOASPIRATE CELLS, presentada el 9 de diciembre de 2002, que reivindica la prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos n.º de serie 60/338.856, presentada el 7 de diciembre de 2001, así como los métodos descritos en la Solicitud de Estados Unidos n.º titulada, SYSTEMS AND METHODS FOR SEPARATING AND CONCENTRATING REGENERATIVE CELLS FROM TISSUE, presentada el 25 de junio de 2004, que reivindica la prioridad de la Solicitud de Estados Unidos n.º de serie 10/316.127, titulada SYSTEMS AND METHODS FOR TREATING PATIENTS WITH PROCESSED LIPOASPIRATE CELLS, presentada el 9 de diciembre de 2002, que se all commonly assigned.

#### 45 EJEMPLO 1: Expresión del factor de crecimiento angiogénico, VEGF, por células regenerativas

El factor de crecimiento endotelial Vascular (VEGF) es uno de los principales reguladores de la angiogénesis (Nagy et al., 2003, Folkman, 1995). El factor de crecimiento placentario, otro miembro de la familia VEGF, desempeña un papel similar tanto en la angiogénesis como en la arteriogénesis. Específicamente, el trasplante de células de tipo salvaje (PIGF +/+) en un ratón desactivado PIGF restaura la capacidad para inducir una recuperación rápida de la isquemia de miembros posteriores (Scholz et al., 2003).

Dada la importancia de la angiogénesis y la arteriogénesis en el proceso de revascularización, la expresión de PIGF y VEGF por las células regenerativas de la presente invención se examinó utilizando un ensayo ELISA (R & D Systems, Minneapolis, MN) utilizando células regenerativas derivadas de adiposo procedentes de tres donantes. Un donante tenía antecedentes de hiperglucemia y diabetes tipo 2 (una afección altamente asociado con enfermedad microvascular y macrovascular). Las células regenerativas de cada donante se sembraron a 1.000 células/cm<sup>2</sup> en medio DMEM/F-12 complementado con FCS al 10 % y HS al 5 % y se cultivaron hasta confluir. Se tomaron muestras sobrenadantes y se ensayaron para determinar la expresión de la proteína PIGF y VEGF. Como se

muestra en las figuras 16A y 16B, los resultados demuestran una expresión robusta tanto de VEGF (figura 16A) como de PIGF (figura 16B) por las células regenerativas derivadas de adiposo de la invención.

En un estudio separado, se midió la cantidad relativa de citocinas relacionadas con la angiogénesis secretadas por células regenerativas cultivadas de ratones adultos normales. Las células regenerativas se cultivaron en alfa-MEM con FBS al 10 % hasta cinco días después de la confluencia celular, momento en el que se recogió el medio de cultivo celular y se evaluó mediante análisis de matrices de anticuerpos (RayBio® Mouse Cytokine Antibody Array II (RayBiotech, Inc.). Se detectaron los siguientes factores de crecimiento relacionados con la angiogénesis: Factor del crecimiento endotelial vascular (VEGF), bFGF, IGF-II, Eotaxina, G-CSF, GM-CSF, IL-12 p40/p70, IL-12 p70, IL-13, IL-6, IL-9, Leptina, MCP-1, M-CSF, MIG, PF-4, TIMP-1, TIMP-2, TNF- $\alpha$ , y trombopoyetina. Los siguientes factores de crecimiento o citocinas relacionados con la angiogénesis se elevaron al menos dos veces en comparación con el medio de control en blanco con FBS al 10 %: factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), Eotaxina, G-CSF, IL-6, MCP-1 y PF-4.

Estos datos demuestran que las células regenerativas de la presente invención expresan una amplia gama de factores de crecimiento angiogénicos y arteriogénicos. Además, el hallazgo de que un paciente diabético expresó VEGF y PIGF a niveles equivalentes a los de pacientes normales sugiere que los pacientes diabéticos pueden ser candidatos para terapia angiogénica por células regenerativas derivadas de tejido adiposo autólogo.

## 20 EJEMPLO 2: Las células regenerativas contienen poblaciones celulares que participan en la angiogénesis

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

Las ADC se aislaron mediante digestión enzimática de tejido adiposo subcutáneo humano. Las ADC (100  $\mu$ l) se incubaron en tampón de fosfato salino (PBS) que contenía suero fetal bovino al 0,2 % (FBS), y se incubaron durante 20 a 30 minutos a 4 °C con anticuerpos marcados con fluorescencia dirigidos hacia los marcadores endoteliales humanos CD-31 (marcador celular endotelial diferenciado) y CD-34 (marcador EPC), así como ABCG2 humano (transportador de casete de unión a ATP), que se expresa selectivamente en células multipotentes. Después del lavado, las células se analizaron en un clasificador FACSaria (Beckton Dickinson-Immunocytometry). La adquisición de datos y los análisis se realizaron después por el software FACSDiva (BD-Immunocytometry, CA). Los resultados (no mostrados) mostraron que las células regenerativas derivadas de adiposo de un adulto sano expresaron el marcador EPC CD-34 y ABCG2, pero no el marcador de células endoteliales CD-31. Las células que expresan el marcador EPC CD-34 y ABCG2 se detectaron a una frecuencia similar en células regenerativas derivadas de un donante con antecedentes de diabetes.

Para determinar la frecuencia de EPC en células regenerativas derivadas de adiposo humano después de su cultivo en medio de diferenciación de células endoteliales, las células regenerativas se colocaron sobre placas revestidas con fibronectina y se cultivaron en medio de células endoteliales durante tres días para eliminar células endoteliales maduras. Las células no adherentes se retiraron y se volvieron a colocar en placas. Después de 14 días, se identificaron colonias mediante tinción con aglutinina 1 de *Ulex europaeus* conjugada con FITC (Vector Labs, Burlingame, CA) y LDL acetilada marcada con Dil (Molecular Probes, Eugene, OR). Como se muestra en la figura 17, los resultados indican una frecuencia de EPC de aproximadamente 500 células EPC/10<sup>6</sup> EPC.

La presencia de EPC dentro de las células regenerativas derivadas del tejido adiposo indica que estas células pueden participar directamente en el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos y potencian la angiogénesis y la perfusión.

50

## EJEMPLO 3: Desarrollo *in vitro* de estructuras vasculares en células regenerativas

Un ensayo reconocido en la técnica para la angiogénesis es uno en el que las células endoteliales cultivadas en una capa alimentadora de fibroblastos desarrollan una red compleja de tubos positivos a CD31 que recuerdan a una red capilar incipiente (Donovan et al., 2001). Dado que las células regenerativas derivadas de tejido adiposo contienen células endoteliales, EPC y otros precursores de células estromales, se ensayó la capacidad de estas células regenerativas para formar estructuras de tipo capilar *en ausencia de una capa alimentadora*. Las células regenerativas obtenidas a partir de almohadillas de grasa inguinal de ratones normales desarrollaron redes capilares dos semanas después del cultivo (figura 18A). En particular, las células regenerativas de ratones hiperglucémicos

con diabetes de tipo 1 inducida por estreptozotocina (STZ) ocho semanas después de la administración de STZ formaron redes capilares equivalentes como las formadas por células de ratones normales (figura 18B).

En un estudio posterior, se cultivaron células regenerativas derivadas de adiposo en medio de cultivo completo ( $\alpha$ -MEM complementado con FCS al 10 %) y sin factores de crecimiento adicionales. Estas células regenerativas también formaron redes capilares. Además, las estructuras vasculares formadas se tiñeron positivas para los marcadores de células endoteliales CD31, CD34, VE-cadherina y factor de von Willebrand/Factor VIII, pero no para el marcador pan-linfocitario, CD45.

10 Para comparar la capacidad de las células regenerativas de ratones jóvenes frente a ancianos para formar redes capilares, se cultivaron células regenerativas de ratones jóvenes y ancianos normales (de edades de 1, 12 o 18 meses) durante 2 semanas en medio de cultivo completo ( $\alpha$ -MEM complementado con FCS al 10 %) y sin factores de crecimiento adicionales. Se observaron redes de tipo capilar equivalentes en cultivos de células regenerativas de todos los donantes (no mostradas).

15 Los datos anteriores demuestran que las células regenerativas derivadas de adiposo de pacientes normales y diabéticos, así como jóvenes y ancianos pueden formar estructuras vasculares consistentes con la formación de redes capilares incipientes. Por consiguiente, las células regenerativas de la invención pueden usarse para tratar insuficiencias angiogénicas.

#### 20 **EJEMPLO 4: Desarrollo *in vivo* de estructuras vasculares en células regenerativas**

El potencial angiogénico *in vitro*, aunque prometedor, es de poco valor si las células no ejercen actividad angiogénica *in vivo*. La inducción quirúrgica de isquemia de los miembros posteriores es un modelo *in vivo* capaz de 25 identificar el potencial angiogénico de una terapia dada. Este modelo se desarrolló en ratones inmunodeficientes (NOD-SCID) en los que se pudo observar la capacidad de las células humanas para impulsar la reperfusión.

Los valores de flujo sanguíneo preoperatorio se determinaron para ambas extremidades posteriores como se describe a continuación. La vasculatura de los ratones anestesiados se ató con una ligadura de seda 4-0 en los 30 siguientes sitios: 1) arteria iliaca proximal a su bifurcación, 2) justo distal al origen de la arteria femoral profunda, 3) justo proximal a la ramificación de la superficie arteria femoral. Después de la ligadura, la vasculatura se retiró en bloque. Antes del cierre de la herida, también se ligaron colaterales claramente observables que se ramificaban a partir de las arterias femorales ligadas. Veinticuatro horas más tarde, a 1295 ratones se les inyectaron  $5 \times 10^6$  células singénicas regenerativas derivadas de tejido adiposo de ratón y a los ratones NOD SCID se les inyectaron 35 células regenerativas derivadas de tejido adiposo humano a través de la vena de la cola. El flujo se visualizó inmediatamente después de la cirugía y a intervalos después del tratamiento usando un Laser Doppler Flow Imager (Moor Instruments Inc., Wilmington, DE). Las mediciones, tomadas tres veces por semana durante 24 días, se normalizaron con el valor preoperatorio para esa extremidad y se presentaron en relación con la extremidad de control (no operada).

40 El modelo de isquemia del miembro posterior es extremadamente sensible a la cepa de ratón utilizada. Los ratones NOD SCID son animales inmunodeficientes, que carecen de la capacidad de iniciar una respuesta inflamatoria aguda. Para estos ratones, este enfoque quirúrgico genera una isquemia severa de tal forma que dos tercios de los animales no tratados perdieron las estructuras de los miembros posteriores por debajo del sitio de la escisión 45 femoral. Ningún animal tratado con células perdió ninguna estructura por encima del dedo. Sin embargo, para 1295 ratones inmunocompetentes, ningún animal no tratado perdió estructuras por encima de las falanges y mostró una capacidad endógena para regenerar parcialmente la reperfusión. Esto podría deberse a la angiogénesis intrínseca asociada con una respuesta inflamatoria aguda. Esto puede explicar por qué la reperfusión fue menos extrema al comparar los animales tratados frente a los de control de diferentes cepas.

50 Sin embargo, los resultados mostraron que los ratones tratados con células regenerativas derivadas de adiposo mostraron una perfusión significativamente mejorada en comparación con los ratones no tratados de ambas cepas. El Día 12, se restableció el flujo sanguíneo a  $50 \pm 11$  % en ratones NOD-SCID tratados con células regenerativas humanas, en comparación con  $10 \pm 10$  % en ratones no tratados ( $p < 0,05$ ). De forma similar, 1295 ratones 55 inmunocompetentes mostraron una restauración del flujo de  $80 \pm 12$  % al día 14, en comparación con  $56 \pm 4$  % en ratones no tratados. Además, la disección macroscópica de ratones reveló la aparición de vasos colaterales en las extremidades posteriores de ratones tratados con células regenerativas, pero no en aquellos de ratones no tratados o en los miembros sanos de cualquier ratón.

**EJEMPLO 5: El aumento de la dosis de ADC se asocia con una mejor supervivencia a injerto y angiogénesis**

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

Se realizó un estudio en ratas Fisher en el que se trasplantaron fragmentos de tejido adiposo en el espacio subcutáneo sobre los músculos del muslo externo. La pata derecha se trasplantó con 0,2 g de fragmentos de tejido adiposo en solitario, la pata izquierda con 0,2 g de fragmentos de tejido adiposo complementados por la adición de células madre derivadas de adiposo en tres dosis diferentes ( $1,7 \times 10^5$ - $1,3 \times 10^6$  células/injerto, tres animales por dosis); de esta manera la pata contralateral actuó como un control. En un enfoque, se puede aplicar una o más de las dosis por inyección. Los animales se mantuvieron durante un mes después de lo cual los animales fueron sacrificados y los injertos se recuperaron, se pesaron, se fijaron en formalina y se incrustaron en parafina para su análisis histológico.

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

Por consiguiente, los Ejemplos 1-5 demuestran que las células regenerativas derivadas de adiposo de la invención segregan factores de crecimiento angiogénicos y arteriogénicos; forman redes capilares incipientes *in vitro*; mejoran la supervivencia de los injertos de grasa; y potencian la reperfusión isquémica. Por lo tanto, las células regenerativas de la invención son capaces de promover la angiogénesis y la arteriogénesis, y pueden ser funcionales en el tratamiento de múltiples enfermedades con insuficiencias circulatorias subyacentes.

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende una población concentrada de células derivadas del tejido adiposo para su uso en el tratamiento de la enfermedad vascular periférica (PVD) fuera del corazón y del sistema nervioso central en un sujeto que lo necesite, en la que dicha población concentrada de células derivadas de adiposo se administrará a un paciente que lo necesite sin cultivar las células derivadas del tejido adiposo antes de administrarlas al sujeto, en la que las células derivadas de adiposo se obtienen mediante el procesamiento de tejido adiposo para separar las células derivadas de adiposo de adipocitos maduros y tejido conectivo, y lavando, separando y concentrando dichas células derivadas de adiposo, en la que dicha población concentrada de células derivadas del tejido adiposo comprende una concentración celular mínima de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/ml, y en la que al menos el 0,1 % del componente celular de la población concentrada de células derivadas de adiposo son células madre.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la población concentrada de células derivadas de tejido adiposo comprende además células progenitoras derivadas de adiposo.
3. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende además un aditivo.
4. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dicha composición comprende una estructura.
5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dicha estructura es una estructura reabsorbible.
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que dichas células se administran en combinación con tejido o fragmentos de tejido, y en la que la extracción y la concentración de dicho tejido adiposo y la colocación de dichas células tiene lugar en el contexto de un único procedimiento operativo.
7. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que las células derivadas del tejido adiposo se modifican mediante transferencia génica.
8. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la enfermedad vascular periférica está caracterizada por que un flujo sanguíneo aberrante, arteriosclerosis, una lesión traumática a un vaso, o una arteritis inflamatoria.
9. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la enfermedad vascular periférica surge del frío, el estrés o el tabaquismo.
10. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición comprende además un factor angiogénico o un fármaco inmunosupresor.
11. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición se formula para administración intravenosa, intramuscular o subcutánea.
12. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el tratamiento de la enfermedad vascular periférica (PVD) fuera del corazón y del sistema nervioso central comprende la reducción de la claudicación.
13. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el tratamiento de la enfermedad vascular periférica (PVD) fuera del corazón y del sistema nervioso central comprende la curación de úlceras isquémicas.
14. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el tratamiento de la enfermedad vascular periférica (PVD) fuera del corazón y el sistema nervioso central comprende un mayor contenido de oxígeno del tejido, según se mide por pletismografía corporal.
15. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el tratamiento de la enfermedad vascular periférica (PVD) fuera del corazón y el sistema nervioso central comprende la

mejora del índice tobillo-brazo (ABI).

16. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la composición se formula para administración en dosis múltiples.
- 5 17. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el aditivo comprende otras células, tejido o fragmentos de tejido.
18. El uso de una composición que comprende una población concentrada de células derivadas del tejido adiposo para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la enfermedad vascular periférica (PVD) fuera del corazón y del sistema nervioso central en un sujeto que lo necesite, en la que dicha población concentrada de células derivadas de adiposo se administrará a un paciente que lo necesite sin cultivar las células derivadas del tejido adiposo antes de administrarlas al sujeto, en la que las células derivadas de adiposo se obtienen mediante el procesamiento de tejido adiposo para separar las células derivadas de adiposo de adipocitos maduros y tejido conectivo, y lavando, separando y concentrando dichas células derivadas de adiposo, en la que dicha población concentrada de células derivadas del tejido adiposo comprende una concentración celular mínima de aproximadamente  $1 \times 10^5$  a aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/ml, y en la que al menos el 0,1 % del componente celular de la población concentrada de células derivadas de adiposo son células madre.
- 10 15 20 19. El uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 18, en la que la población concentrada de células derivadas de tejido adiposo comprende además células progenitoras derivadas de adiposo.
20. El uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 18 o la reivindicación 19, en el que dicha composición comprende además un aditivo.
- 25 21. El uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18, 19 y 20, en el que dicha composición comprende una estructura.
22. El uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 21, en el que la estructura es una estructura reabsorbible.
- 30 23. El uso de la composición de acuerdo con la reivindicación 21, en la que dichas células se administran en combinación con tejido o fragmentos de tejido, y en la que la extracción y la concentración de dicho tejido adiposo y la colocación de dichas células tiene lugar en el contexto de un único procedimiento operativo.
- 35 24. El uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-23, en el que las células derivadas de tejido adiposo se modifican mediante transferencia génica.
25. El uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-24, en el que la enfermedad vascular periférica está **caracterizada por** un flujo sanguíneo inadecuado, arteriosclerosis, una lesión traumática a un vaso, o una arteritis inflamatoria.
- 40 26. El uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-25, en el que la enfermedad vascular periférica surge del frío, el estrés o el tabaquismo.
- 45 27. El uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-26, en el que la composición comprende además un factor angiogénico o un fármaco inmunosupresor.
28. El uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-27, en el que la composición se formula para administración intravenosa, intramuscular o subcutánea.
- 50 29. El uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-28, en el que el tratamiento de la enfermedad vascular periférica (PVD) fuera del corazón y el sistema nervioso central comprende la reducción de la claudicación.
- 55 30. El uso de la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-29, en el que el tratamiento de la enfermedad vascular periférica (PVD) fuera del corazón y del sistema nervioso central comprende la cicatrización de las úlceras isquémicas.

31. El uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-30, en el que el tratamiento de la enfermedad vascular periférica (PVD) fuera del corazón y del sistema nervioso central comprende un aumento del contenido de oxígeno del tejido, medido por pletismografía corporal.
- 5 32. El uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-31, en el que el tratamiento de la enfermedad vascular periférica (PVD) fuera del corazón y del sistema nervioso central comprende la mejora del índice tobillo-brazo (ABI).
33. El uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 18-32, en el que la  
10 composición se formula para su administración en dosis múltiples.
34. El uso de una composición de acuerdo con la reivindicación 20, en el que el aditivo comprende otras células, tejido o fragmentos de tejido.

Figura 1

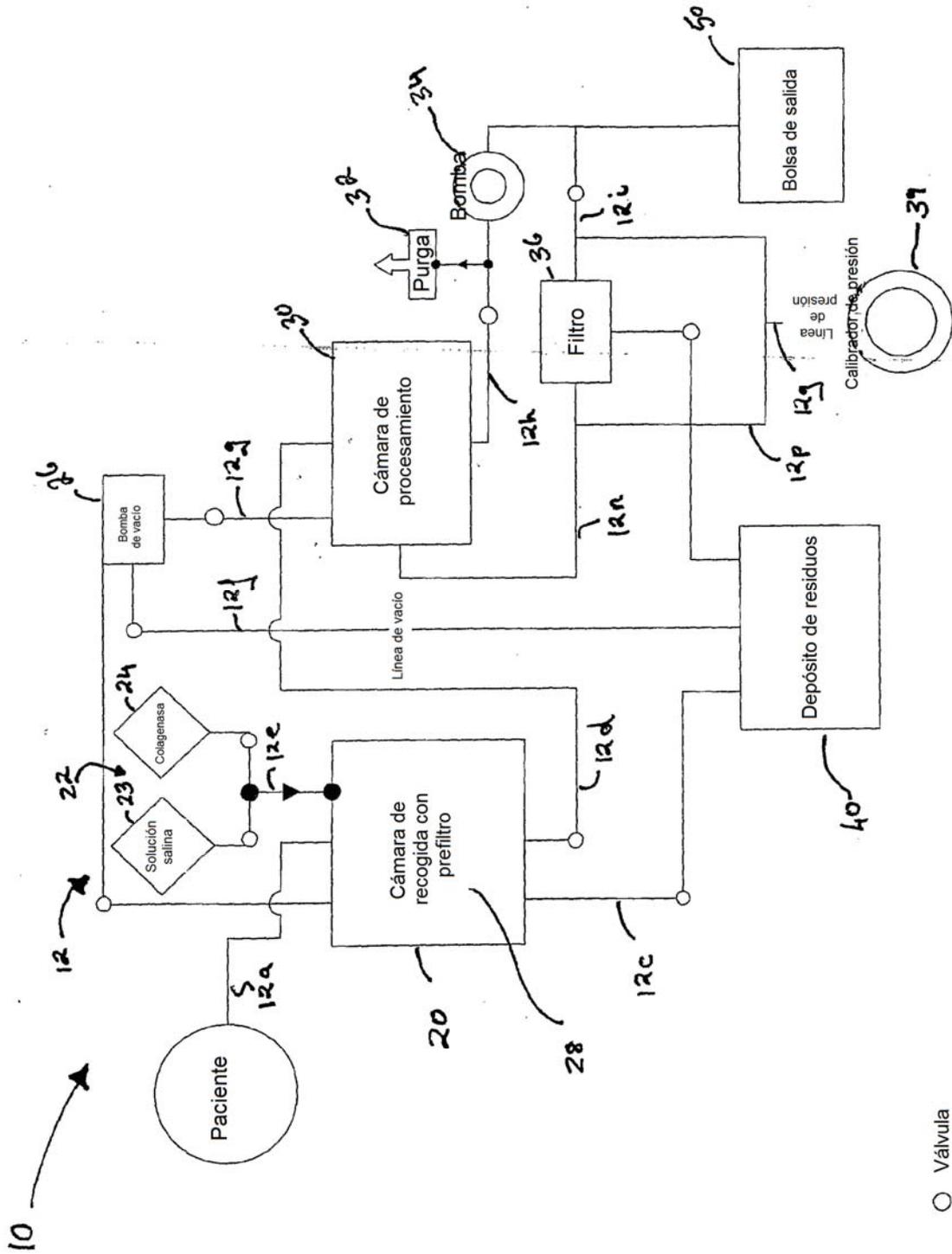
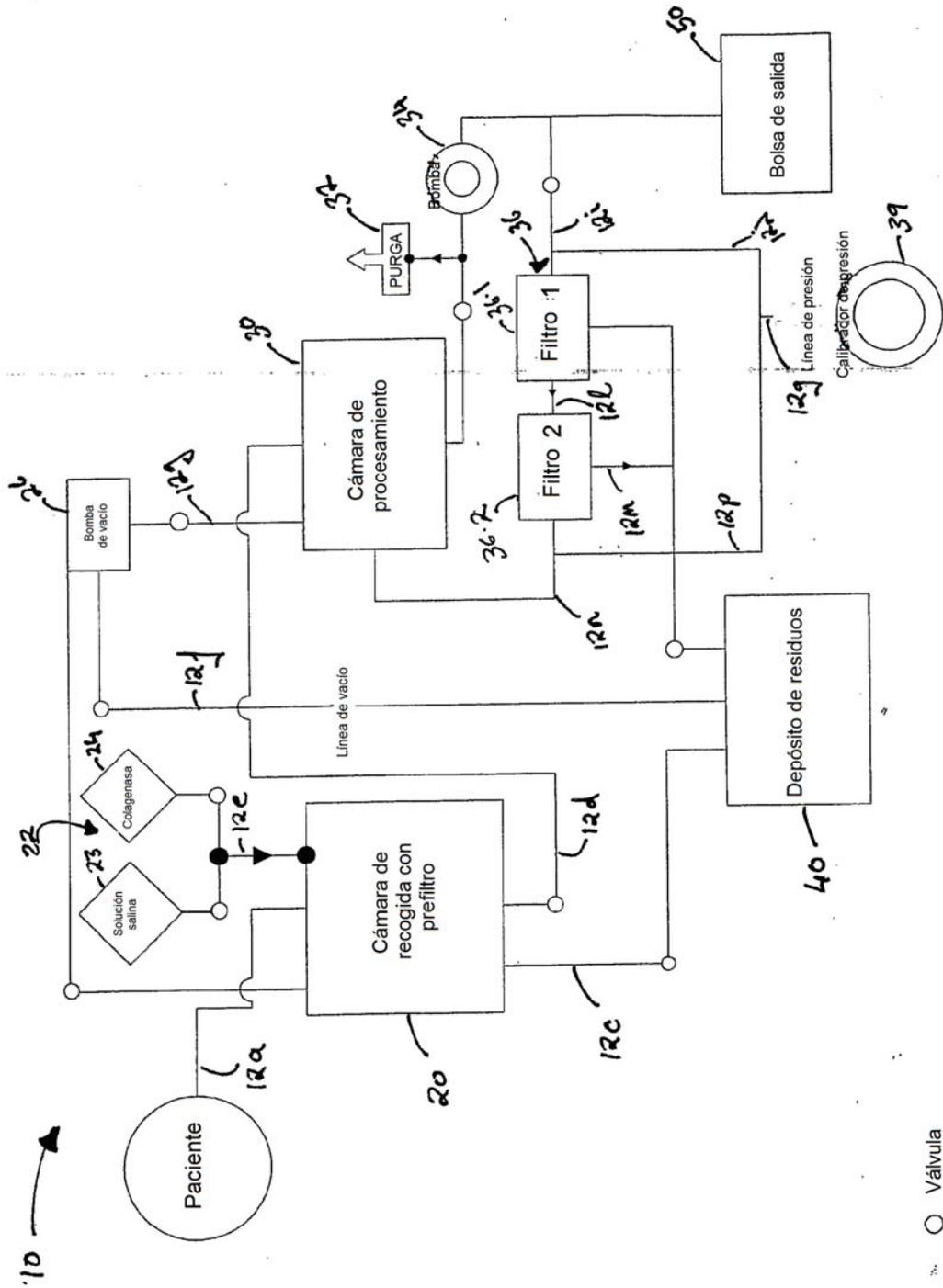


Figura 2



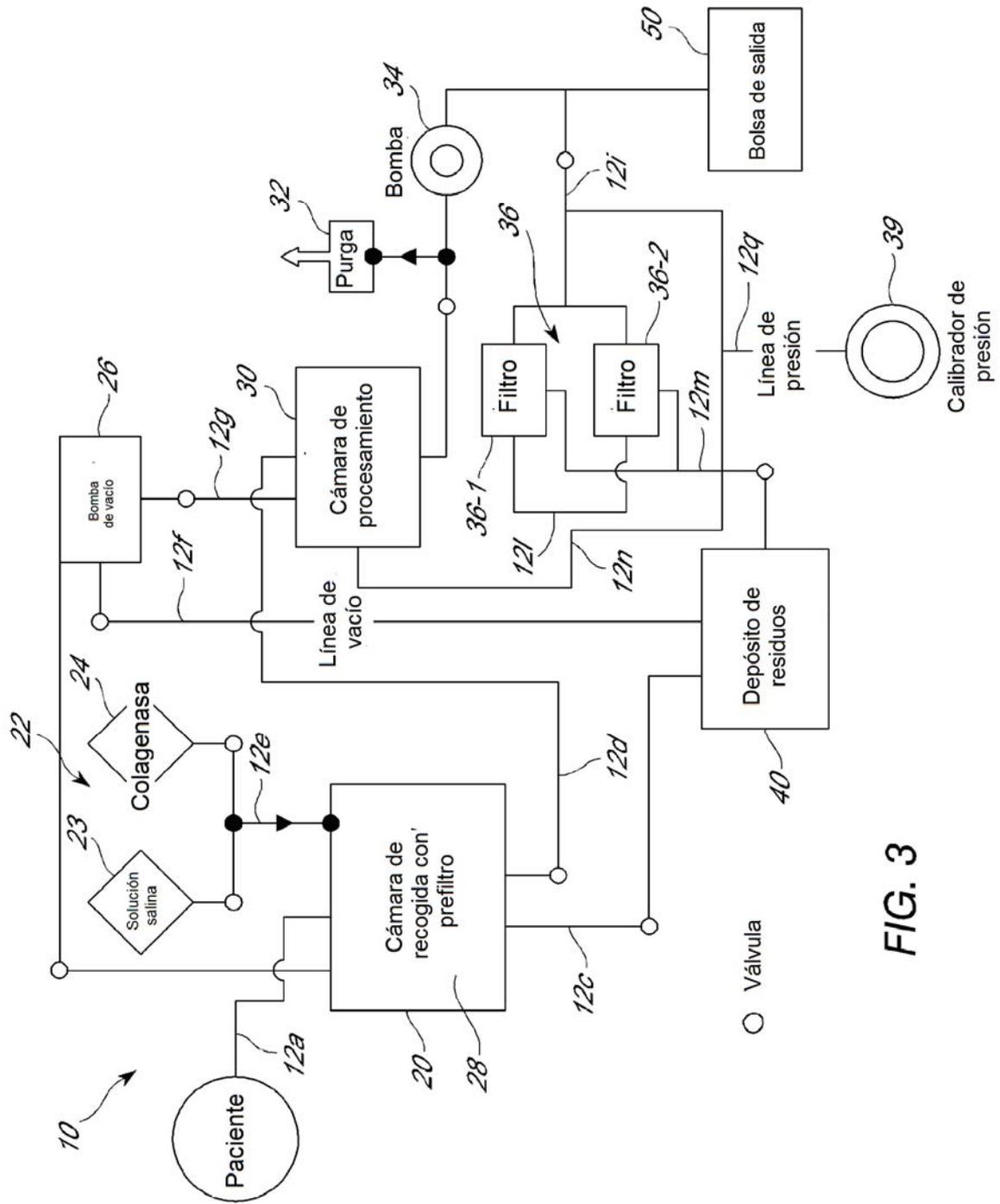


FIG. 3

Figura 4

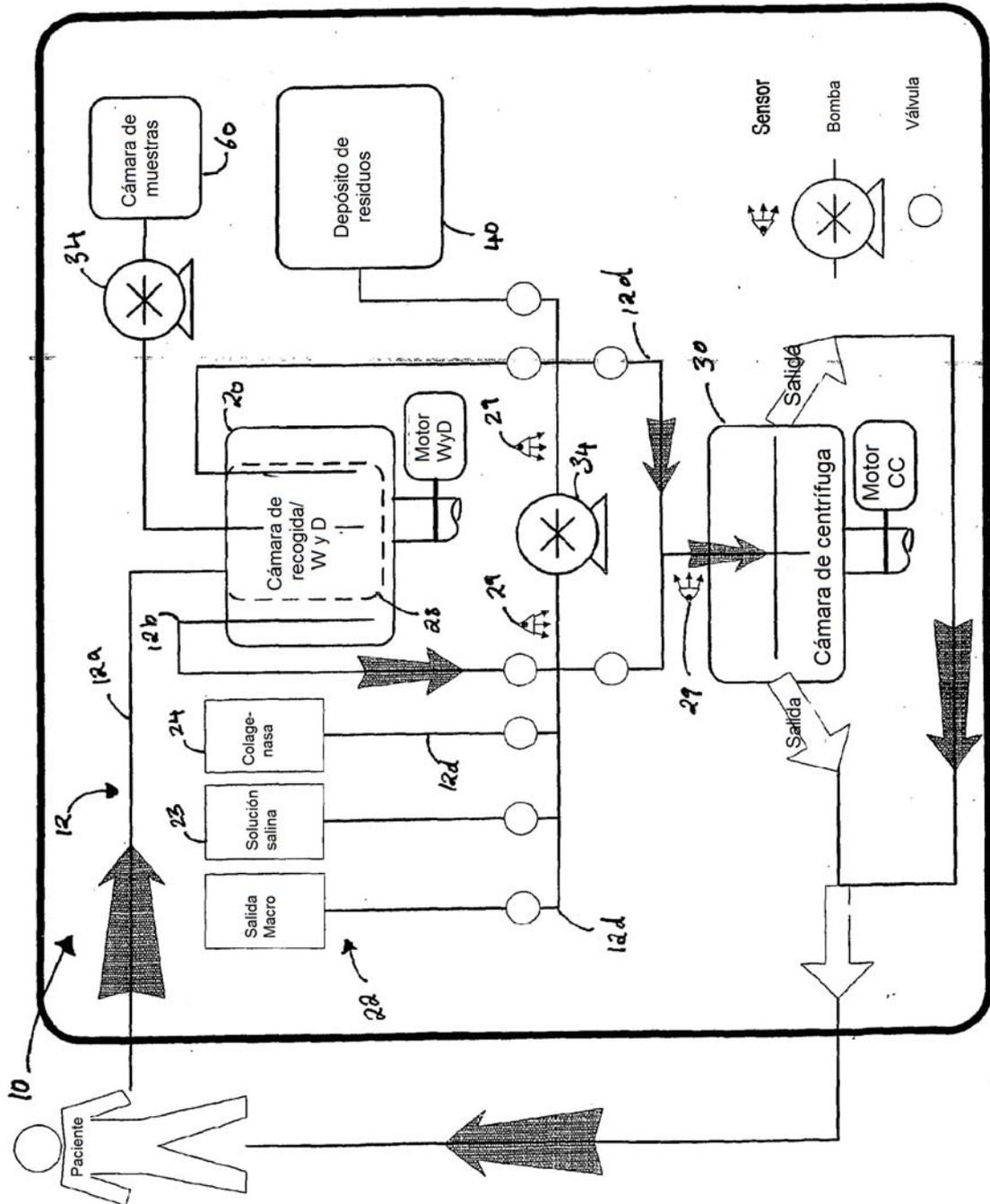


Figura 5

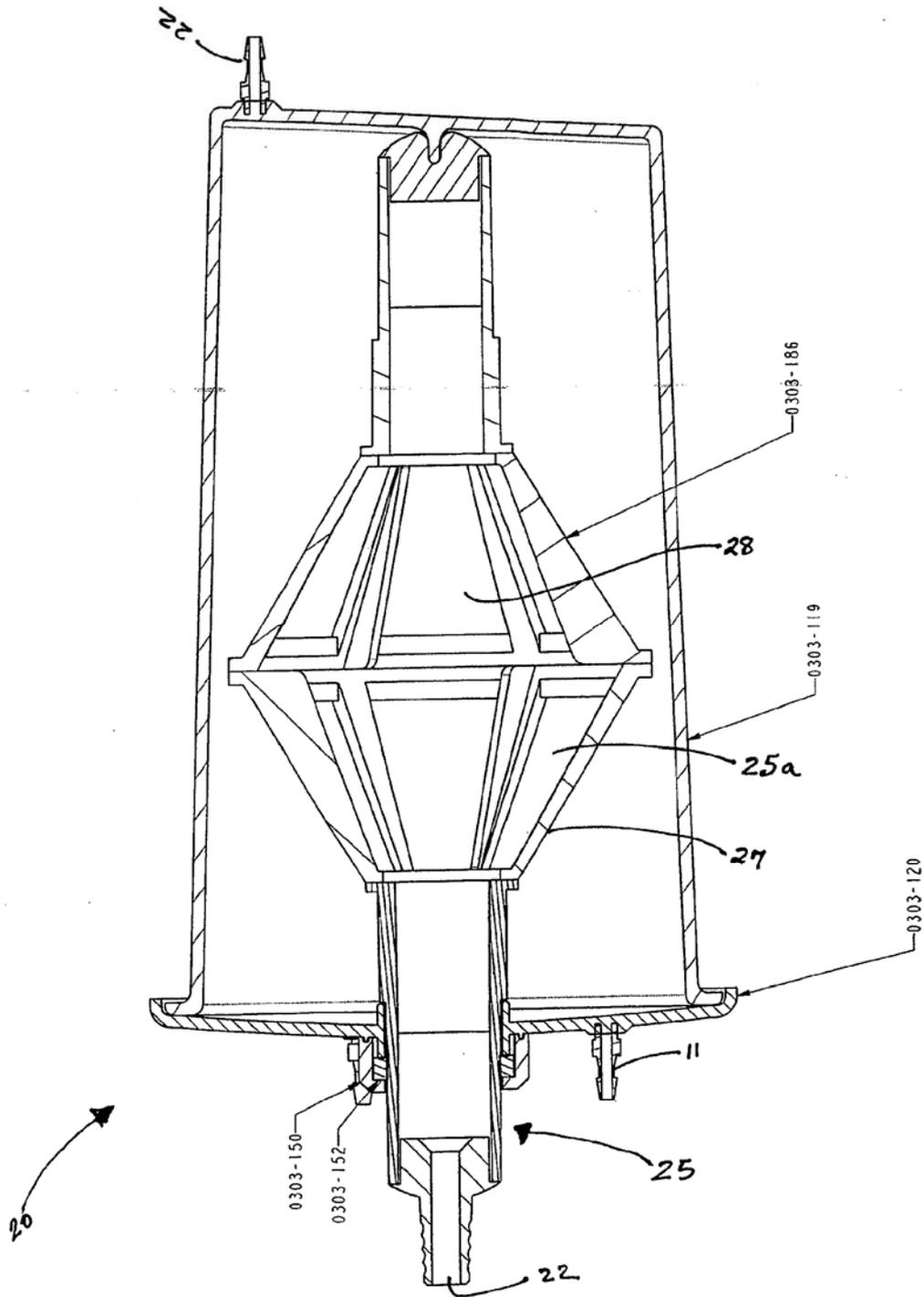


Figura 6

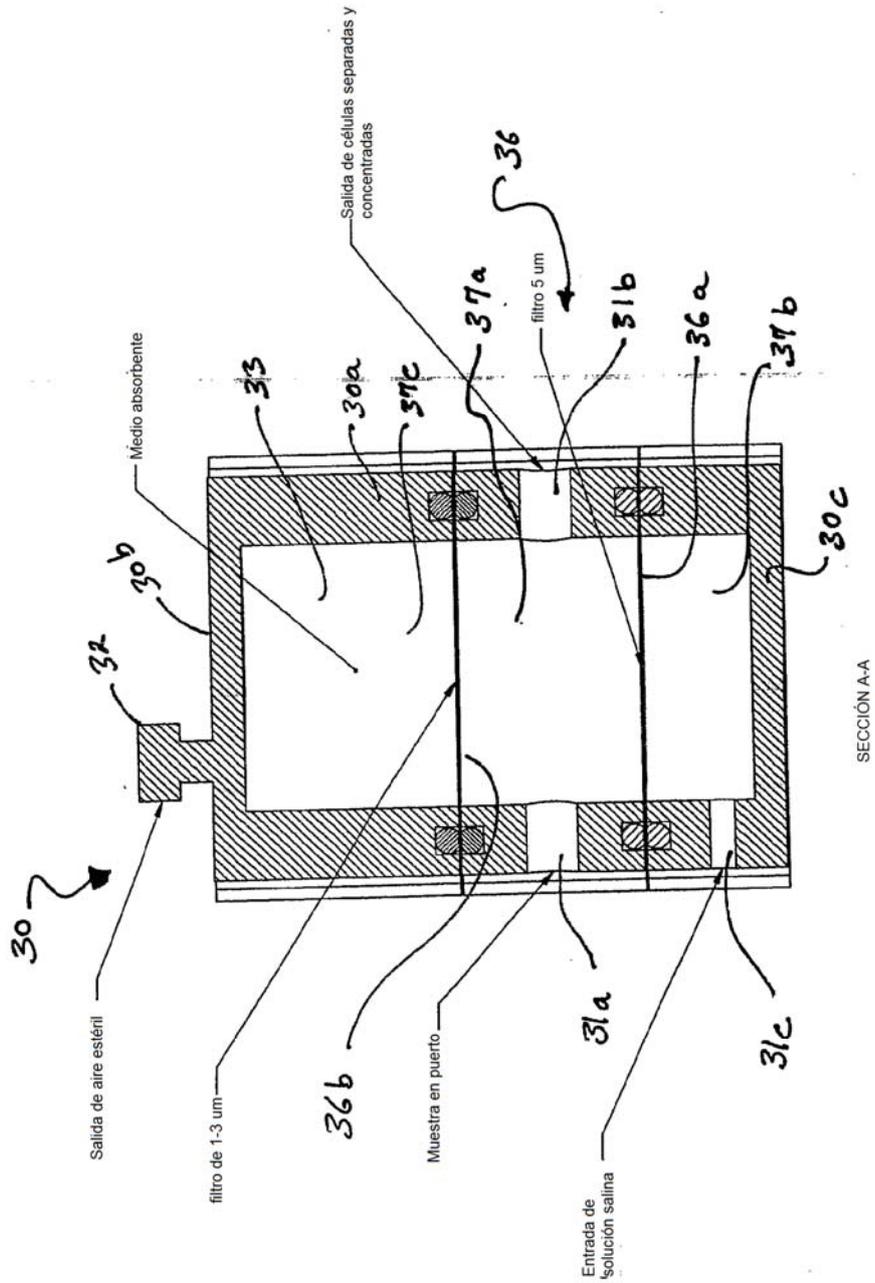


Figura 7

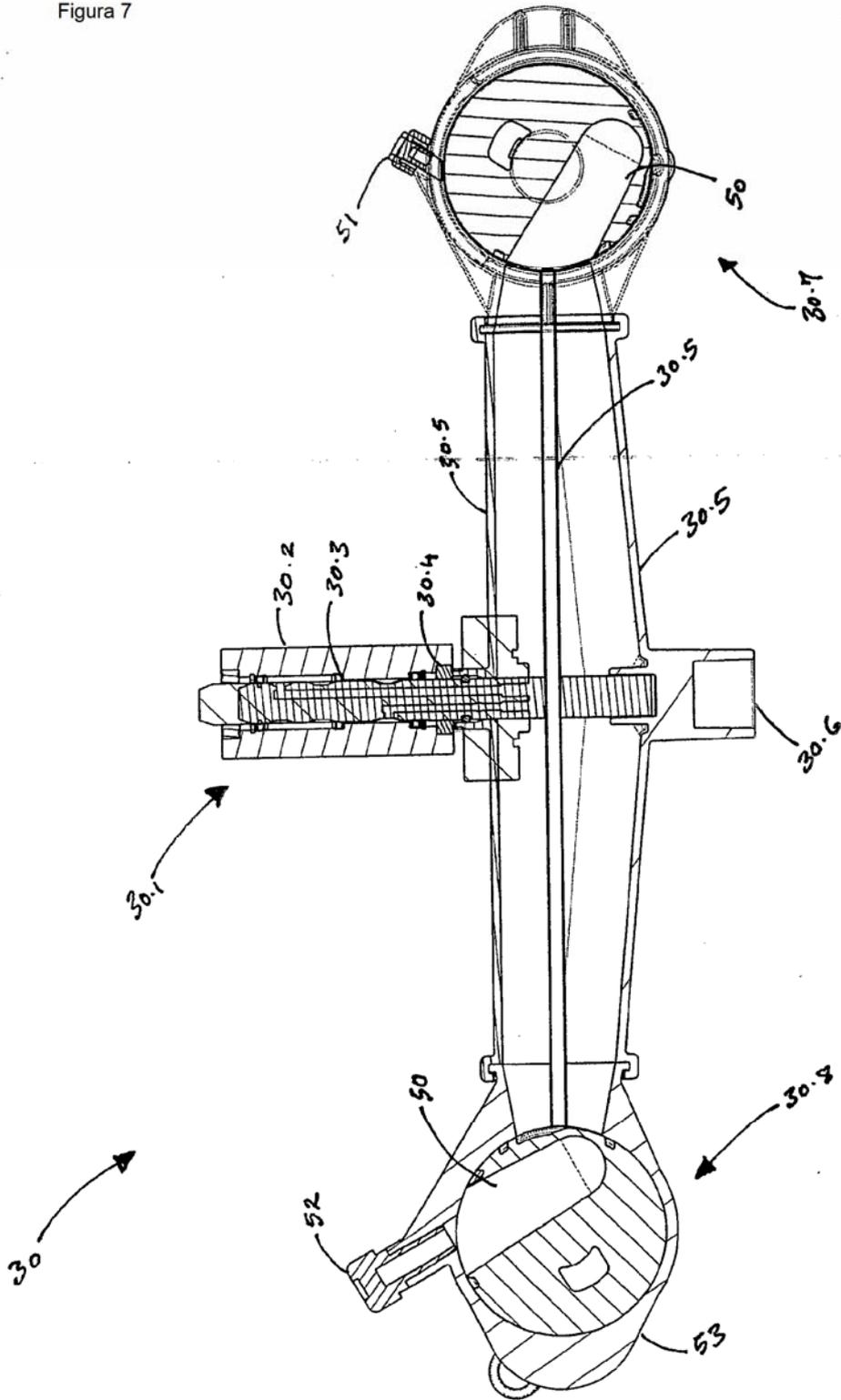


Figura 8

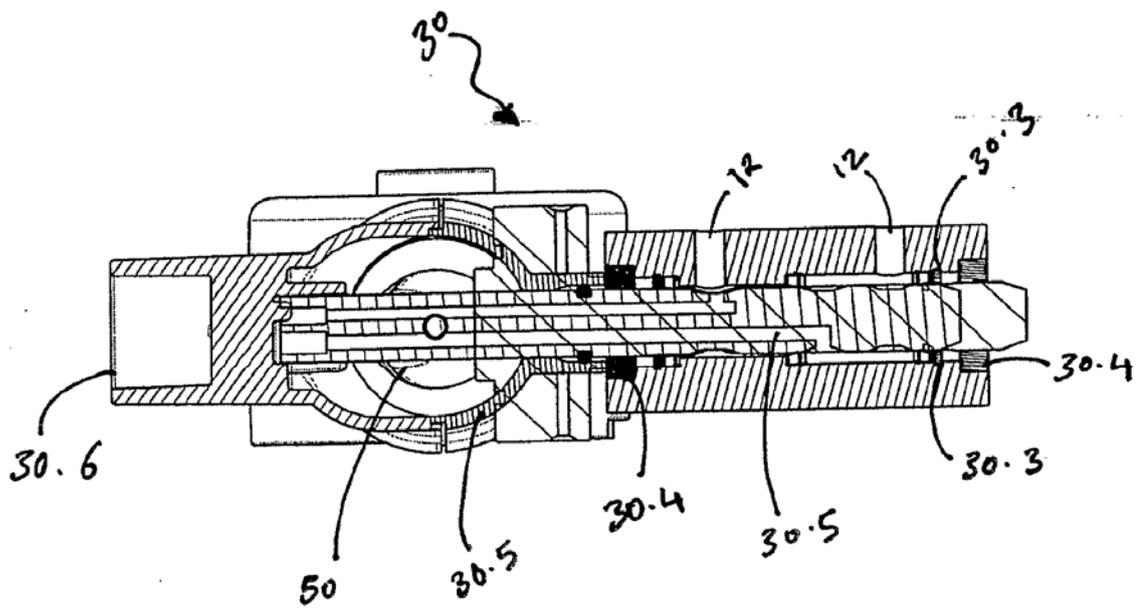


Figura 9

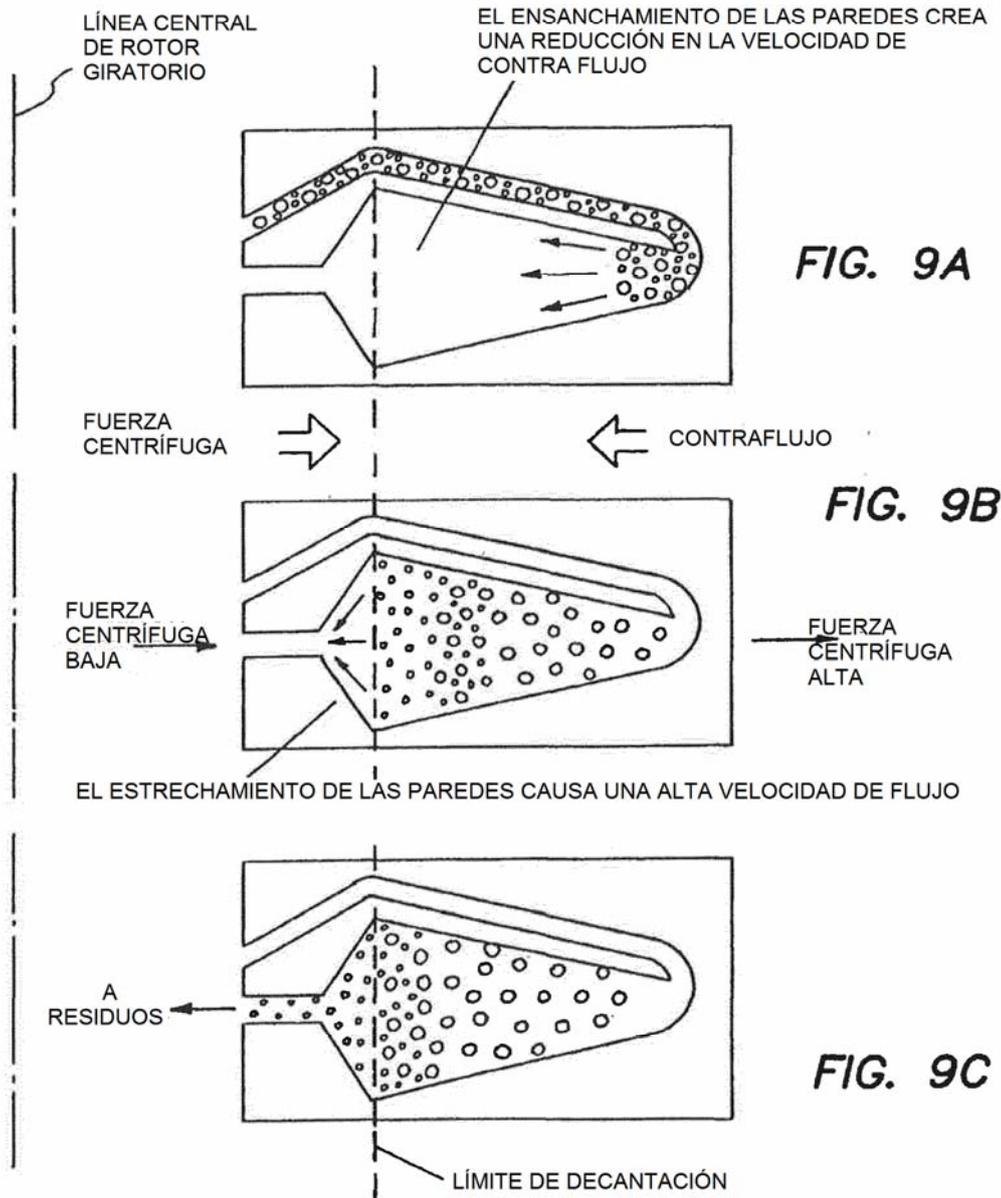


Figura 10

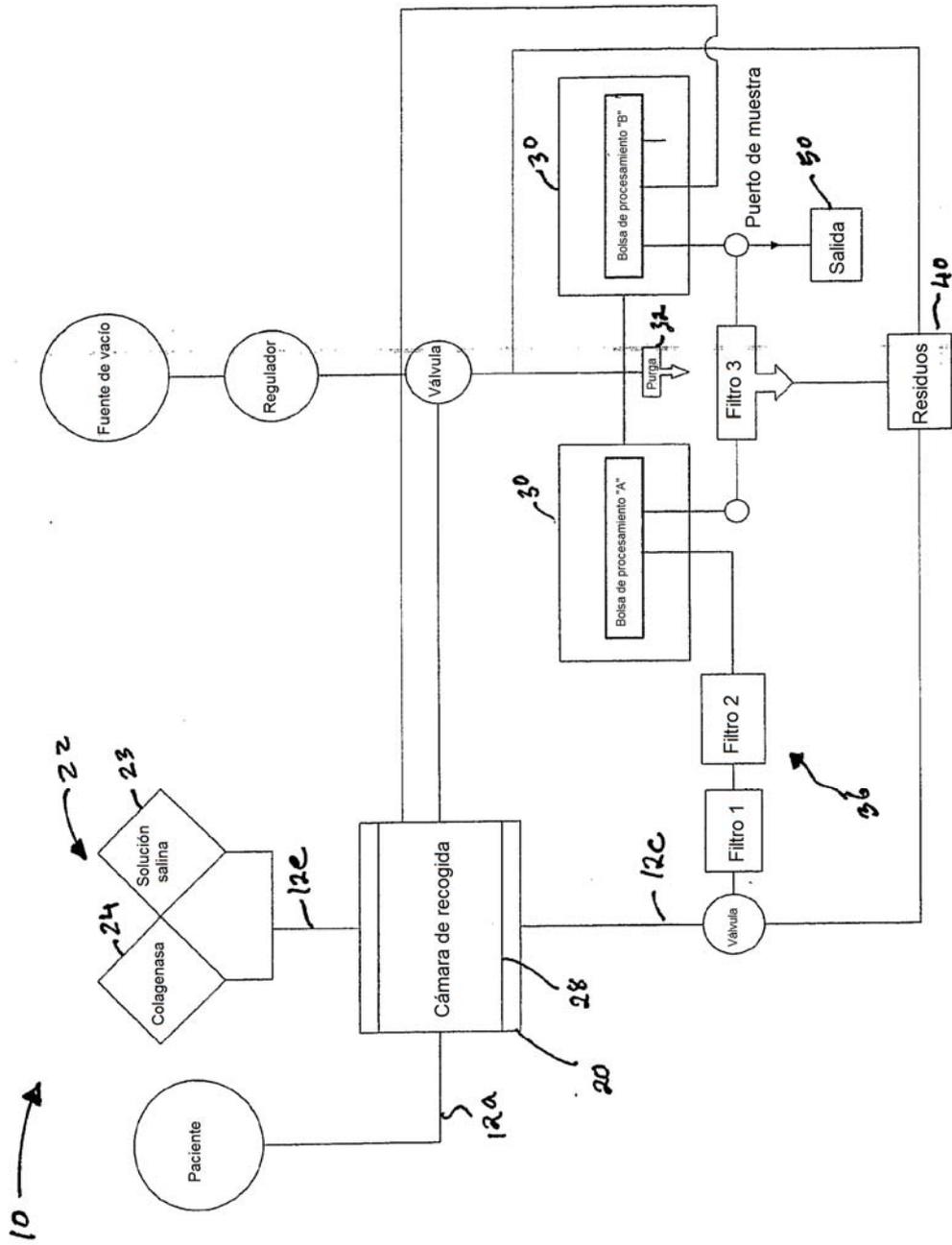


Figura 11

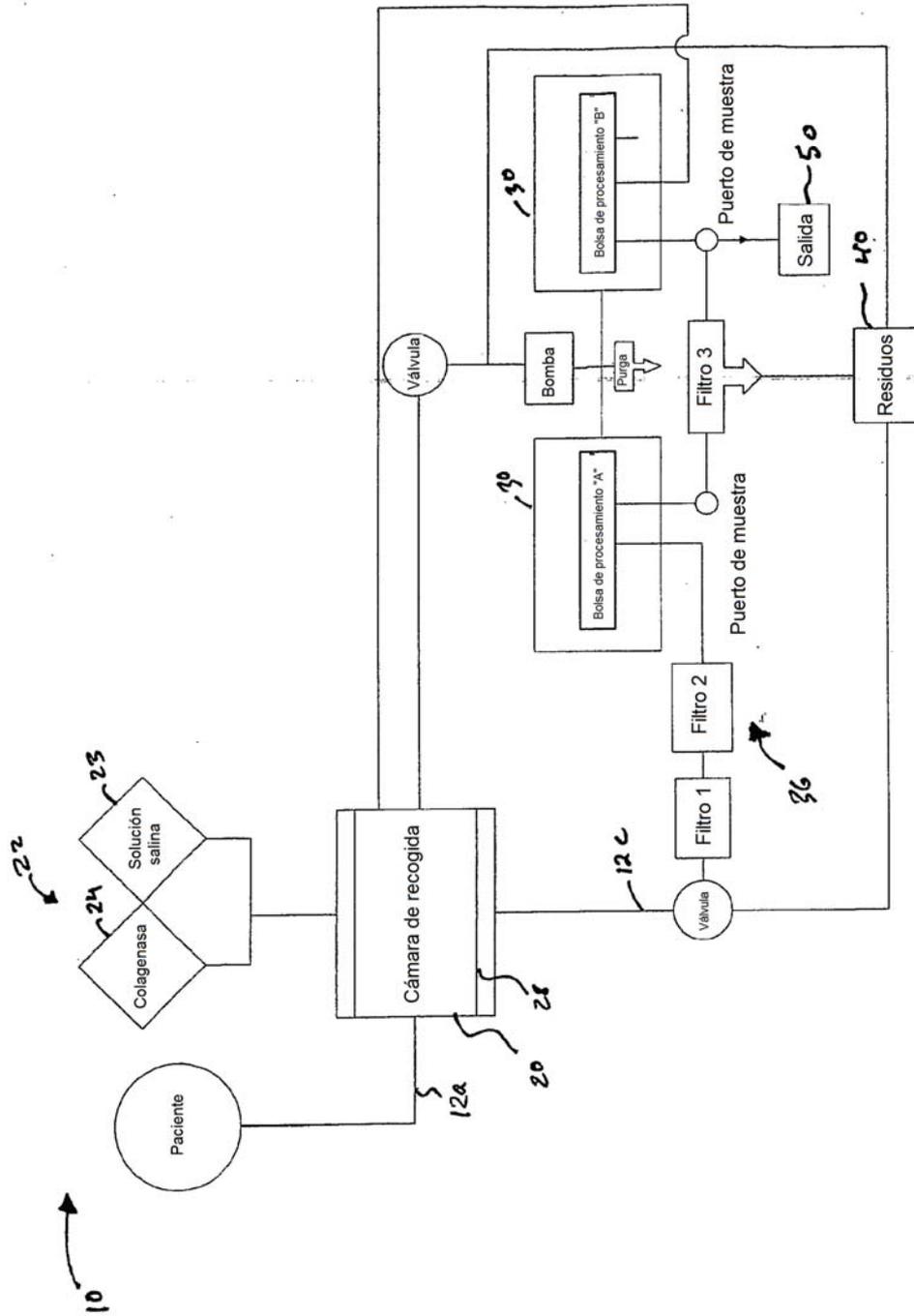


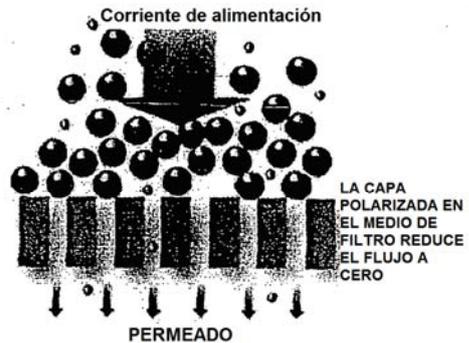
FIGURA 12

Flujo tangencial frente a filtración de extremo cerrado



Filtración de flujo cruzado tangencial  
(alta velocidad de permeación)

Figura 12A



Filtración de extremo cerrado  
(baja velocidad de permeación)

Figura 12B

FIGURA 13

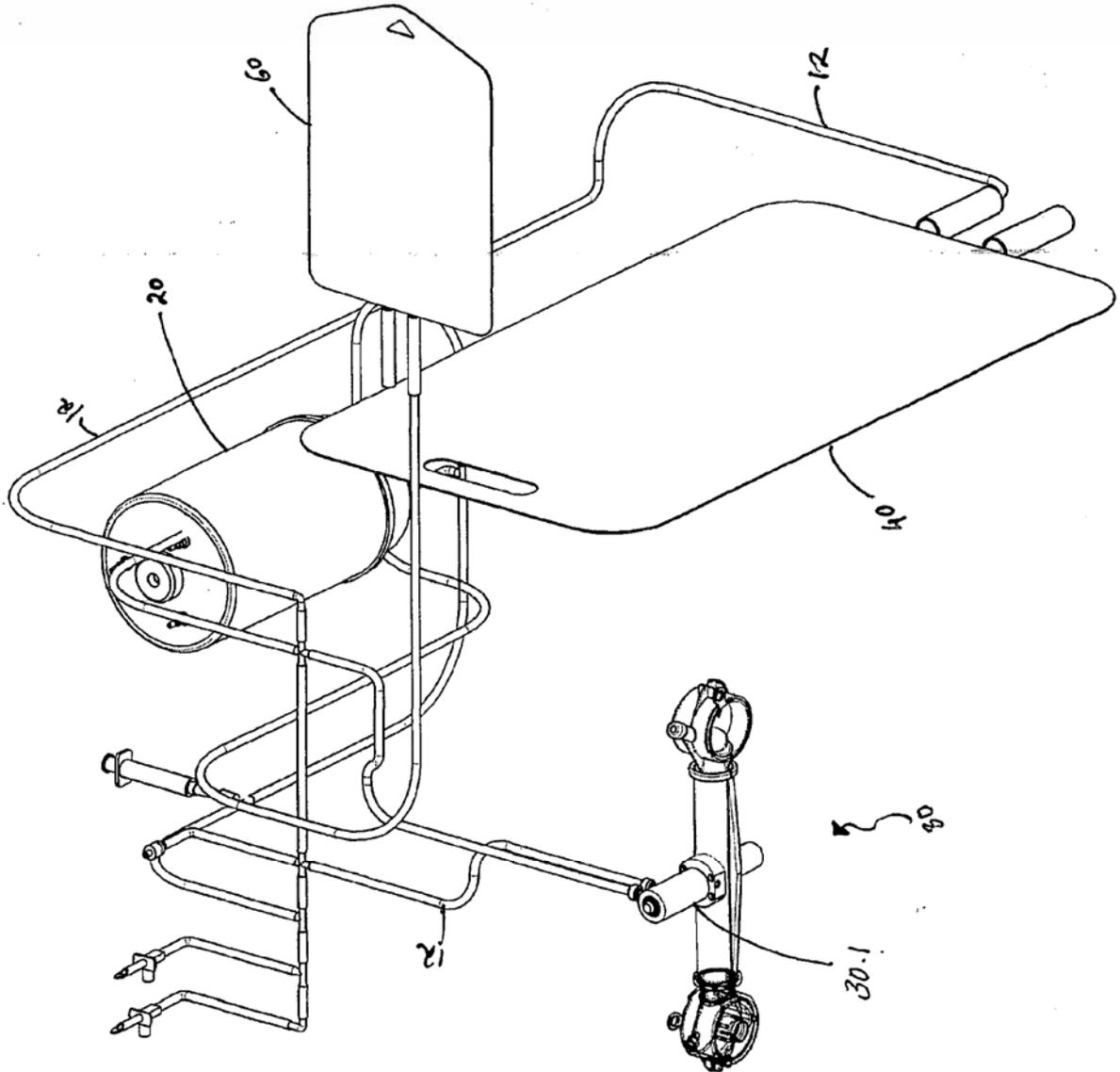


FIGURA 14

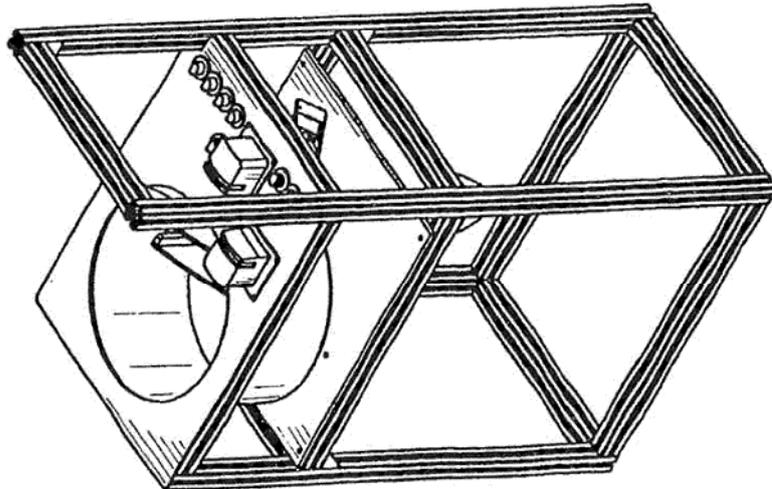
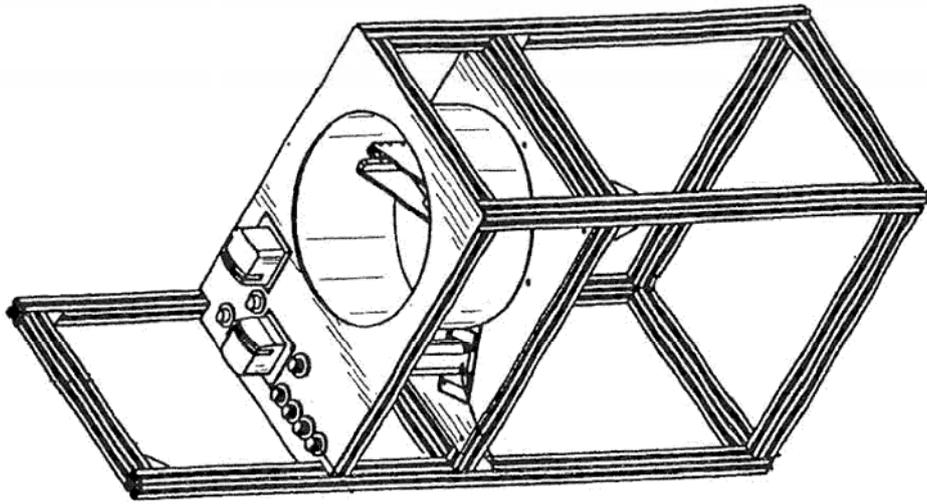


FIGURA 15A

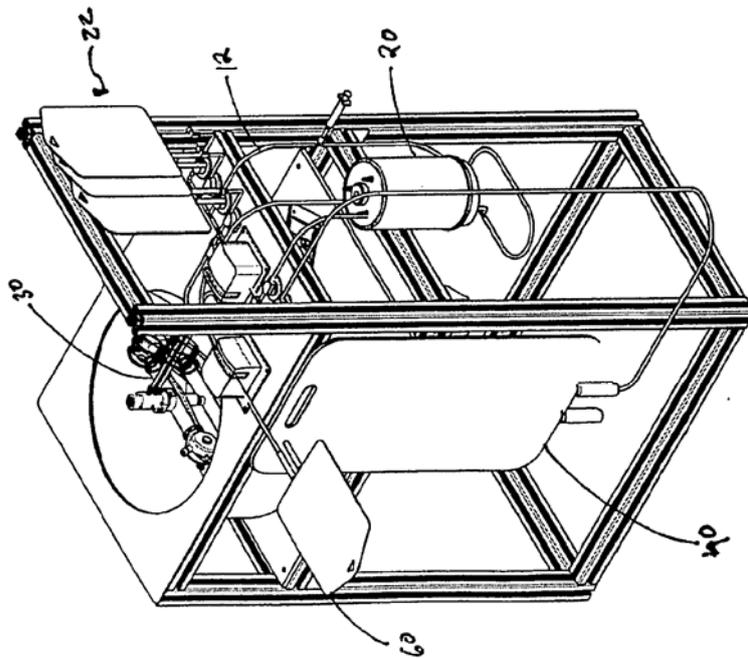
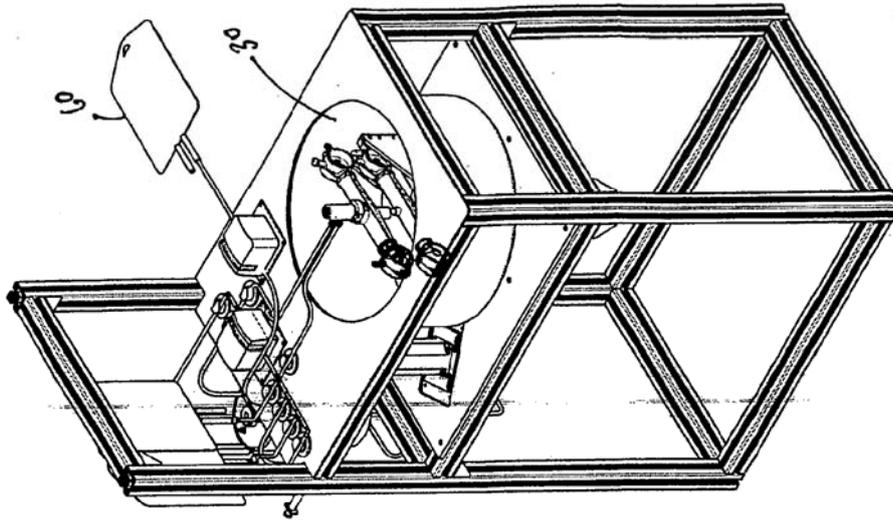


FIGURA 15B

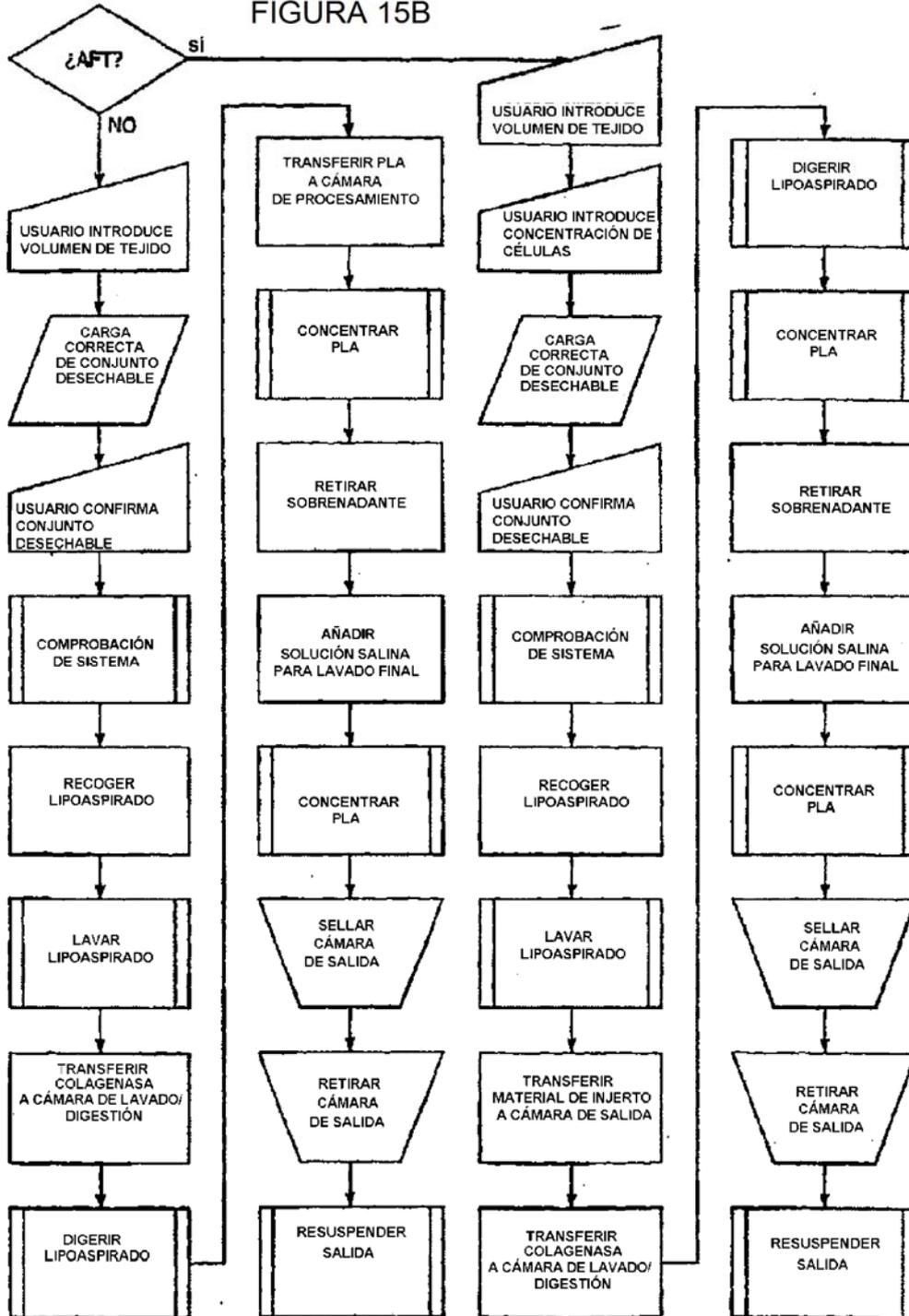
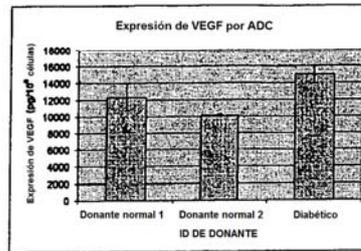
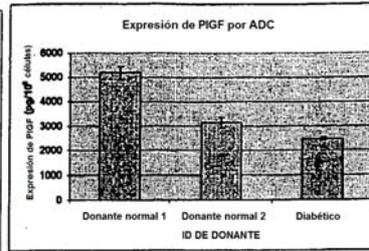


FIGURA 16

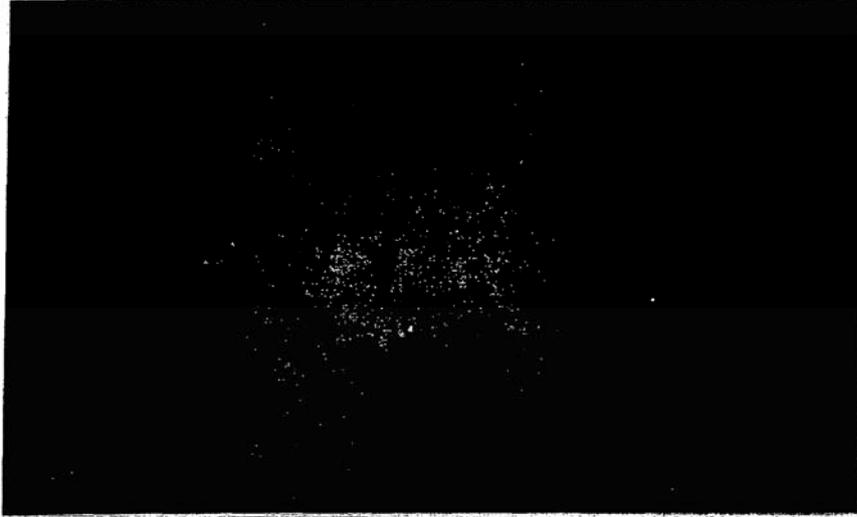
16A



16B



**FIGURA 17**



**Tinción UEA-1 de colonia de EPC derivadas de ADC**

**FIGURA 18**

Crecimiento de estructuras vesiculares positivas a CD31 de ADC de ratones normales y tratados con STZ

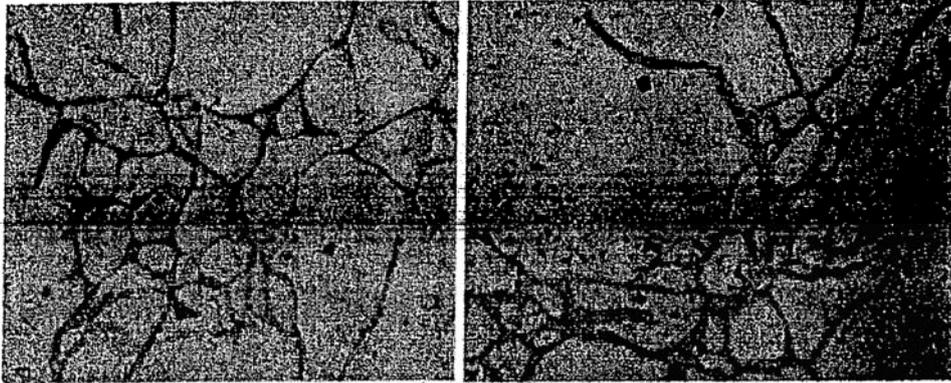


Figura 18A

Figura 18B

FIGURA 19

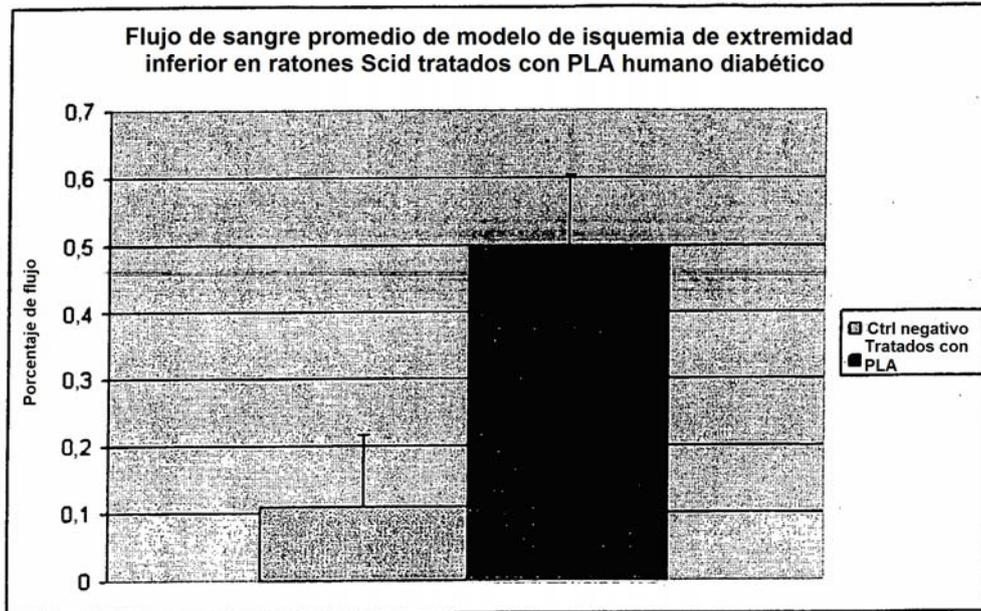


FIGURA 20

Figura 20A

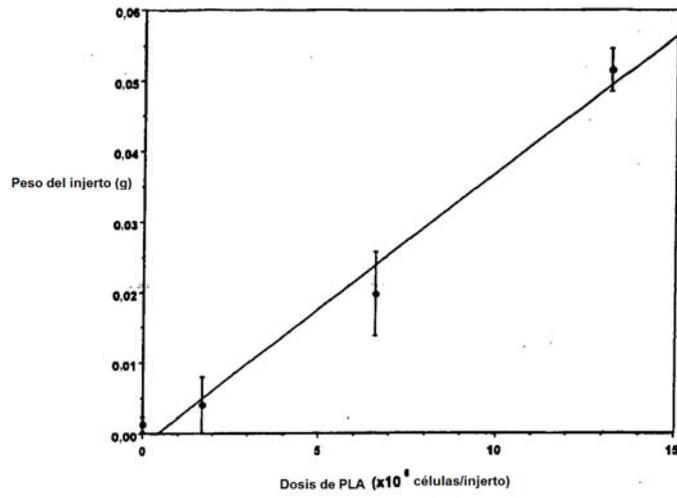


Figura 20B

