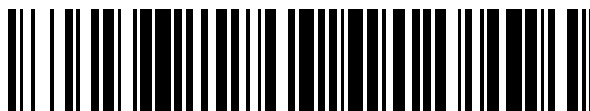


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 911**

51 Int. Cl.:

C12M 1/33 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2017** **PCT/EP2017/059934**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.11.2017** **WO17186795**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2017** **E 17718958 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019** **EP 3443068**

54 Título: **Procedimiento no enzimático y dispositivo de molienda**

30 Prioridad:

26.04.2016 EP 16167009

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.03.2020

73 Titular/es:

LIPOREGENA GMBH (100.0%)
Meisenweg 10
2384 Breitenfurt bei Wien, AT

72 Inventor/es:

WURZER, CHRISTOPH;
PRIGLINGER, ELENI y
REDL, HEINZ

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 746 911 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

Procedimiento no enzimático y dispositivo de molienda

La presente invención se refiere a un procedimiento no enzimático y a un dispositivo de molienda correspondiente para la preparación de células terapéuticas a partir de tejido adiposo, así como a un dispositivo de procesamiento para llevar a cabo dicho procedimiento y un conjunto proporcionado para aplicaciones de liposucción de dicho procedimiento y dispositivo. El dispositivo de molienda comprende una carcasa que tiene una entrada y una salida y que define un volumen operativo y un rotor recibido en el volumen operativo y pivotable con respecto a la carcasa alrededor de un eje de rotación.

El tejido adiposo humano es una fuente atractiva y disponible en abundancia de células madre adultas aplicables en medicina regenerativa e ingeniería tisular. El tejido adiposo y la fracción vascular estromal (FVE) derivada y las células madre/estromales derivadas de tejido adiposo (CMA) que contiene se han utilizado con éxito en estudios clínicos y ensayos clínicos para el tratamiento de defectos de tejidos blandos, defectos óseos, lesiones gastrointestinales, trastornos del sistema inmunitario, lesiones neurológicas y enfermedades cardiovasculares.

La adición de células terapéuticas, tales como las contenidas en la FVE, en la lipotransferencia asistida con células (LAC) puede reducir la atrofia postoperatoria en el aumento de pecho, aumenta la supervivencia del injerto de grasa y conduce a la neovascularización en el interior de los injertos. La interacción entre las células del tejido adiposo injertado y las células del tejido circundante desencadena mecanismos de reparación mediante la liberación de citoquinas y factores de crecimiento.

El requisito previo para la traducción en clínicas es la producción de células derivadas de tejido adiposo con buenas prácticas de fabricación. Una serie de empresas desarrollaron sistemas dirigidos a un procedimiento de aislamiento celular, seguro y reproducible, estéril y cerrado que limita las variaciones del donante, el riesgo de contaminación y la imprevisibilidad del material celular. Sin embargo, muchos de estos sistemas están basados en la digestión enzimática con colagenasa.

El documento WO 2015/035221 A1 (Cimino, W.W., y col., Tissue processing apparatus and method for processing adipose tissue. 2015, documento WO 2015035221 A1) y el anterior documento WO 2012/006587 A2 (de los mismos inventores) describen un procedimiento de procesamiento de tejido adiposo en un aparato portátil para la preparación de células. El recipiente del aparato está separado por un filtro en un volumen de retención de tejido y un volumen de filtrado. Un mezclador giratorio es proporcionado en el volumen de retención de tejido y conectado a un mango manipulable a mano para el funcionamiento del mezclador. La separación de las células se logra mediante la digestión del tejido en el interior del recipiente por medio de un medio de digestión que contiene enzimas durante un tiempo de retención después de un ciclo de lavado. Por ende, el procedimiento y dispositivo descritos en el documento WO 2015/035221 A1 (Cimino, W.W., y col., 2015 como se ha citado anteriormente, y en el documento WO 2012/006587 A2 se limitan a un procesamiento por lotes de tejido. El mezclador giratorio en ambos casos sólo consigue mezclar tejido y medio de digestión; un procedimiento o dispositivo para la separación mecánica de las células no se desvela en ninguno de los dos documentos.

En el documento US 2015/118752 A1 se desvela un procedimiento y un aparato similares de los mismos inventores.

El dispositivo y procedimiento descritos en el documento US 2014/0193852 A9 (Vossman, E., y col., Adipose tissue collection and pre-processing devices for use in liposuction procedure. 2014, el documento US 20140193852 A9; también publicado como WO 2010/129817 A1) utilizan un dispositivo de trituración y separación para el pre-procesamiento de tejido adiposo mediante la extracción de material fibroso a partir de una muestra de tejido. El dispositivo de trituración y separación consiste en una cesta que forma un volumen de retención para los componentes de tejido fibroso, mientras que una composición de un producto celular intermedio puede pasar a través de un tamiz en el fondo de la cesta, y por lo tanto, evitar la trituración por un conjunto de álabes giratorios en la cesta. Acto seguido, se lava la muestra no fibrosa que pasa por el tamiz, se centrifuga y se dirige por adición de una enzima digestiva como colagenasa. Por ende, el dispositivo y el procedimiento desvelados en el documento US 2014/0193852 A9 (Vossman, E., y col., 2014 como se ha citado anteriormente, sólo se utilizan para el pre-procesamiento de tejido adiposo y sólo mediante dicha digestión se obtiene una suspensión celular liberada.

El uso de enzimas tales como colagenasa complica la autorización reglamentaria respecto a la seguridad y eficacia, es caro, lo cual se refleja en el costo de los productos celulares, y puede repercutir negativamente en la potencia y eficacia celular. Por lo tanto, se han desarrollado varios procedimientos de aislamiento de células derivadas de tejido adiposo no enzimático y se han transferido a dispositivos cerrados. Sin embargo, cada procedimiento o sistema tienen diferentes ventajas y desventajas y está en continuo desarrollo y optimización (véase Oberbauer, E., y col., Enzymatic and nonenzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells: current state of the art. Cell Regen (Lond), 2015. 4: pág. 7.).

El documento US 4 028 190 A desvela un procedimiento de trituración de tejidos que emplea una pluralidad de elementos de álabe móviles.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento no enzimático y dispositivo para enriquecer tejido

adiposo con células terapéuticas. La eficacia del procedimiento en términos de duración, rendimiento del procesamiento y la calidad del material celular obtenido debe ser al menos comparable a los procedimientos existentes.

El procedimiento según la presente invención comprende:

- 5 suministrar continuamente el tejido adiposo a un dispositivo de molienda;
procesamiento continuo controlado del tejido adiposo en el interior del dispositivo de molienda por separación mecánica de las células o agregados celulares del tejido adiposo que se mueve por el dispositivo de molienda por medio de una multiplicidad de álabes, en el que los álabes están dispuestos en una disposición espaciada con respecto a la dirección general de flujo y los álabes se mueven alrededor de un eje de rotación, en el que el eje de rotación es proporcionado esencialmente paralelo a dicha dirección general de flujo;
- 10 retirar continuamente el tejido procesado que comprende las células separadas del dispositivo de molienda.

En funcionamiento, existe un flujo continuo de tejido adiposo en el dispositivo de molienda y fuera del dispositivo de molienda. En consecuencia, el procedimiento proporciona un procesamiento controlado continuo de tejido adiposo en el interior del dispositivo de molienda, es decir, sin la necesidad de recoger o retener el tejido sin procesar en lotes separados antes del procesamiento. Durante el funcionamiento, existe un caudal esencialmente constante de suministro y un material procesado resultante del dispositivo de molienda.

El presente procedimiento se lleva a cabo preferentemente como un procedimiento de homogeneización de material de liposucción (que comprende tejido adiposo según la presente invención). Los agregados celulares obtenidos por el presente procedimiento (a partir, p. ej., de material de liposucción) se refieren preferentemente como "microtejido".

20 Tales microtejidos son fragmentos tisulares homogeneizados, que mantienen los componentes celulares en su microentorno natural.

En consecuencia, el dispositivo de molienda, como se ha definido desde el principio, tiene

- 25 una carcasa que tiene una entrada y una salida y que define un volumen operativo y
un rotor recibido dentro del volumen operativo y pivotable con respecto a la caja alrededor de un eje de rotación,
si se define además según la presente invención porque
el rotor comprende al menos ocho filas de álabes en una disposición espaciada con respecto al eje de rotación del rotor,
en el que el volumen operativo definido por la carcasa corresponde al sólido de revolución creado por una línea que conecta los radios de los álabes de cada fila subsiguiente del rotor girado alrededor del eje de rotación del rotor,
- 30 y porque la entrada y la salida están dispuestas en extremos opuestos del rotor, esencialmente cerca de la primera y última fila de álabes respectivamente en una dirección de flujo.

La disposición de la entrada y la salida con respecto al rotor es tal que un flujo de material entre la entrada y la salida tiene una dirección general (es decir, dirección promedio o media) que es esencialmente paralela al eje de rotación del rotor. El material que se procesa en el dispositivo de molienda se mueve esencialmente a lo largo de un árbol alargado del rotor. Los álabes o paletas del rotor se disponen preferentemente a lo largo y alrededor de dicho árbol alargado. Durante el funcionamiento del dispositivo, los álabes giran normalmente en la longitud del árbol. Con el fin de minimizar cualquier volumen muerto en la carcasa, la entrada y la salida están dispuestas en extremos opuestos del rotor, esencialmente cerca de la primera y última fila de álabes respectivamente en una dirección de flujo.

40 Por medio del procedimiento y dispositivo anteriores, la presente invención proporciona de este modo un medio no enzimático, cerrado y estéril para una leve homogeneización de tejido adiposo y posterior enriquecimiento de células terapéuticas para aplicaciones clínicas autólogas, tales como reconstrucción, reparación o reemplazo de tejidos. Sin la necesidad de digestión enzimática o procesamiento posterior de tejidos, se presenta un procedimiento y dispositivo seguros para llevar a cabo lo mismo, con una tasa muy alta de rendimiento en un tiempo de procesamiento breve. La posibilidad de ser utilizado en un sistema cargado mejora la esterilidad sin contaminación del aire, que es un criterio importante para la producción de terapias celulares.

De este modo, el presente procedimiento y dispositivo, cuando se utilizan para enriquecimiento celular, tienen la capacidad de generar células terapéuticas de alta calidad con propiedades definidas para la aplicación clínica directa. Se ha descubierto que las células obtenidas por el presente procedimiento no enzimático poseen un contenido de ATP intra- y extracelular más alto y un potencial de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica más fuerte en comparación con las células aisladas por procedimientos de aislamiento no enzimático y enzimático conocidos. Las células derivadas del presente procedimiento no enzimático tienen el potencial de formar estructuras similares a tubos que indican vasculogénesis. Además, el presente procedimiento afectó a la composición celular recién aislada y adherente con respecto a las subpoblaciones específicas, que pueden ser importantes para la neovascularización y la diferenciación, tal como las células progenitoras endoteliales (CD45-/CD31+/CD34+), las células similares a pericitos (CD45-/CD31-/CD146+), y las CMA supra-adventiciales (CD45-/CD31-/CD146-/CD34+) (James, A.W., y col., An abundant perivascular source of stem cells for bone tissue engineering. Stem Cells Transl Med, 2012. 1(9): págs. 673-84; Hager, G., y col., Three specific antigens to isolate endothelial progenitor cells from human liposuction material.

Cytherapy, 2013. 15(11): págs. 1426-35; Holnthoner, W., y col., Adipose-derived stem cells induce vascular tube formation of outgrowth endothelial cells in a fibrin matrix. J Tissue Eng Regen Med, 2015. 9(2): págs. 127-36).

El volumen operativo definido por la carcasa corresponde al sólido de revolución creado por una línea que conecta los radios de los álabes (es decir, el radio de la punta del álabe más largo de cada fila) de cada fila subsiguiente del rotor girado alrededor del eje de rotación del rotor. En otras palabras, el volumen operativo corresponde a un volumen de referencia que consiste en discos barridos por los álabes durante una vuelta del rotor y el espacio cilíndrico o cónico entre dos de tales discos posteriores. Por razones prácticas, p. ej., para reducir el contacto entre los álabes y la pared interior de la carcasa, el volumen operativo puede ser un 20 %, preferentemente un 10 %, en particular un 5 % superior a dicho volumen de referencia. La forma del volumen operativo que se ha definido anteriormente es de tal manera que el volumen muerto en el interior del dispositivo de molienda se minimiza, al tiempo que se mantiene baja la resistencia de flujo, y definida esencialmente por los álabes del rotor en el interior del volumen operativo.

En una configuración preferida del presente dispositivo de molienda, el rotor comprende entre 20 y 80 filas de álabes. Un menor número de filas de álabes disminuye la eficacia del procesamiento de manera significativa y reduce innecesariamente el rendimiento de células separadas. Un mayor número de filas de álabes aumenta el volumen operativo y, por lo tanto, también la cantidad de tejido que queda en el dispositivo una vez que se ha consumido la totalidad del material de suministro, sin aumentar significativamente la eficacia de procesamiento y el rendimiento de células separadas. Además, un contacto prolongado del tejido y el dispositivo puede provocar un mayor daño celular.

Preferentemente, al menos ocho de las filas de álabes, comprende cada una, dos, tres o cuatro álabes dispuestos circunferencialmente con respecto al eje de rotación del rotor. El número de álabes por fila determina la superficie de trabajo que actúa transversalmente sobre el tejido que se procesa. Por otra parte, demasiados álabes por fila complican la fabricación del dispositivo y disminuyen la fiabilidad con respecto a los daños, así como con respecto a la oclusión durante el funcionamiento.

Se ha descubierto que lo más eficaz, es que los álabes de al menos una fila estén formados por elementos similares a placas planas. Además, la longitud y la anchura de cada álabe pueden estar preferentemente en el intervalo de 1 a 50 mm. En cuanto a la orientación de los álabes, es ventajoso que para al menos algunas de las filas, preferentemente entre cuatro y 70 filas, el eje de rotación del rotor es esencialmente perpendicular al plano medio de los álabes. Asimismo, para al menos algunas de las filas, preferentemente entre tres y 20 filas, el eje de rotación del rotor puede disponerse esencialmente paralelo al plano medio de los álabes. Preferentemente, una configuración de ambas disposiciones de álabe se utiliza en un solo dispositivo. La expresión "plano medio" se refiere al plano medio de la superficie de los álabes similares a placas planas. De este modo, el plano medio es el plano en el que se definen las dimensiones planas de los elementos similares a placas. Según las propiedades preferidas anteriores del rotor, los álabes del presente dispositivo pueden disponerse en dos orientaciones diferentes, por ejemplo en dos grupos de orientaciones diferentes. Se puede disponer un grupo de álabes, p. ej., un grupo corriente arriba, que tiene los planos medios paralelos al eje de rotación. Por lo tanto, los álabes proporcionan esencialmente una propulsión circular del tejido cuando se mueve a la largo de este grupo de álabes. Se puede disponer un segundo grupo de álabes, p. ej., un grupo corriente abajo, que tiene los planos medios transversales al eje de rotación. Los álabes de este grupo actúan por lo tanto en el tejido con su borde estrecho, produciendo así un efecto de corte en las estructuras celulares que pasan por este grupo de álabes.

Con el fin de lograr una resistencia al flujo relativamente baja en el volumen operativo, es preferible que al menos algunas de las filas tengan el mismo número de álabes, en el que los álabes están dispuestos en columnas paralelas al eje de rotación del rotor.

Ventajosamente, el caudal que pasa por el dispositivo de molienda en funcionamiento es de al menos 100 ml/min, preferentemente al menos 200 ml/min. El caudal determina el tiempo que el tejido que se procesa permanece dentro del volumen operativo y también determina la velocidad del flujo del material que golpea los álabes. Por tanto, resulta ventajoso adaptar el caudal a la forma y movimiento de los álabes y al tiempo de procesamiento deseado.

Para garantizar un movimiento homogéneo sobre la totalidad de la sección transversal del dispositivo, el rotor puede comprender un propulsor, formado preferentemente por al menos una fila de álabes configurados como álabes del propulsor. Tales álabes del propulsor pueden estar dispuestos con sus planos medios inclinados con respecto al plano de movimiento (que es normal al eje de rotación). En este caso, el dispositivo actúa como una bomba de flujo axial. Cuando se desea un flujo relativamente bajo y preciso, el rotor puede comprender adicional o alternativamente un propulsor de tornillo.

En consecuencia, el presente procedimiento puede comprender: el bombeo del tejido que pasa por el dispositivo de molienda, preferentemente por medio de la rotación de los álabes. El bombeo se refiere a una presión de bombeo que acciona o empuja el tejido por el dispositivo y conduce eficazmente a un movimiento de avance del tejido dentro del dispositivo, paralelo al eje de rotación. Este movimiento de avance empuja el tejido contra los álabes normales al movimiento de los álabes, y por lo tanto participa en la separación mecánica de las células o agregados celulares del tejido adiposo.

Ventajosamente, al menos uno de los álabes comprende dos o más dientes radialmente espaciados, preferentemente

en paralelo al eje de rotación. Los dientes también pueden estar inclinados en un ángulo comprendido entre 0 y 80° con respecto a un plano paralelo al eje de rotación del rotor. Por medio de dichos dientes radialmente espaciados, se puede lograr una retención temporal de tejido fibroso entre los dientes. Esto aumenta el tiempo de procesamiento de dicho tejido fibroso en relación con otro tejido no fibroso y mejora de esta manera la capacidad de separación con respecto al tejido fibroso sin disminuir el rendimiento del tejido no fibroso.

En una realización preferida, al menos una sección del volumen operativo tiene una forma ahusada con una sección transversal que disminuye en una dirección de la entrada a la salida. La sección o sección ahusada se refiere aquí a una parte de la longitud total del volumen operativo paralelo al eje de rotación del rotor. La forma ahusada es preferentemente troncocónica, siendo el eje de simetría del cono el eje de rotación del rotor. La sección ahusada está preferentemente ubicada de forma adyacente a la entrada de la carcasa, en la que una sección cilíndrica posterior del volumen operativo sigue entre la sección ahusada y la salida de la carcasa.

La carcasa se forma preferentemente a partir de uno o más componentes conectados entre sí en una disposición fija. En particular, la carcasa no tiene partes móviles y los componentes de la carcasa están soldados o pegados entre sí después de la inserción del rotor en el volumen operativo formado por la carcasa. Debido a la ausencia de piezas móviles en la carcasa, los depósitos de material tisular en huecos o uniones de la carcasa se pueden evitar con eficacia. Esto ayuda a evitar zonas muertas impredecibles dentro de la carcasa y también a facilitar la manipulación y limpieza del dispositivo.

La eficacia del procesamiento del presente dispositivo y la eficacia de la separación mecánica de las células son básicamente una función de la longitud y sección transversal del volumen operativo en el que los álabes están siendo girados. Ha resultado que la relación preferida de la sección transversal media del volumen operativo transversal al eje de rotación del rotor con respecto a la longitud total del volumen operativo paralelo al eje de rotación del rotor está comprendida entre 0,02 y 0,5. Esto significa que el volumen operativo es al menos el doble de largo que de ancho y hasta 50 veces más largo que ancho (en promedio). Mayores longitudes conducirían a volumen muerto considerable sin mejorar de manera significativa el resultado de separación.

En términos de números absolutos, que se adaptan a la aplicación preferida en el procesamiento de tejido eliminado por liposucción, la longitud del volumen operativo paralelo al eje de rotación del rotor es inferior a 500 mm.

Con el fin de alcanzar niveles más altos posibles en términos de limpieza y esterilidad, el dispositivo de molienda se puede proporcionar como un cartucho de molienda. En otras palabras, el dispositivo de molienda se puede proporcionar como un dispositivo de un solo uso. En este caso, el dispositivo se utiliza básicamente para procesar el tejido de un solo paciente o se retira de un solo paciente durante una sesión de tratamiento. Una vez procesado todo el volumen de tejido con una sesión de tratamiento dada, se desecha el cartucho de molienda.

El dispositivo de molienda empleado preferentemente en el presente procedimiento es un dispositivo de molienda según una de las variantes estructurales y realizaciones más detalladas discutidas anteriormente.

La invención se refiere además al uso general del presente dispositivo de molienda como parte de un dispositivo de procesamiento para preparar células terapéuticas o microtejido a partir de tejido adiposo (p. ej., por homogeneización de material de liposucción), comprendiendo dicho dispositivo de procesamiento: al menos un dispositivo de molienda como se ha definido anteriormente, y un accionamiento conectado al rotor del dispositivo de molienda a través de un eje impulsor, en el que el accionamiento está formado preferentemente por un motor. Es decir, el dispositivo de procesamiento complementa eficazmente el dispositivo de molienda con un accionamiento para accionar el rotor y realizar de este modo automáticamente el procesamiento y separación deseados.

Cuando esté previsto un dispositivo de procesamiento de este tipo, es preferible que el accionamiento esté conectado al rotor del dispositivo de molienda mediante un acoplamiento magnético. El acoplamiento magnético tiene la ventaja de aplicar el par motor al rotor sin necesidad de partes móviles de la carcasa. Asimismo, el acoplamiento magnético limita naturalmente el par máximo transmitido y evita así daños en el rotor. También ayuda a evitar daños celulares debido a picos imprevistos del par aplicado por el accionamiento (p. ej., durante el arranque y la parada del accionamiento).

Se ha observado una mayor eficacia de procesamiento cuando el presente procedimiento comprende: el control de la velocidad de rotación a una velocidad constante predefinida, preferentemente entre 700-1100 rpm. El uso de una velocidad constante predefinida es posible gracias al flujo continuo y al caudal esencialmente constante. La velocidad real de rotación se puede elegir en función de la longitud y el radio máximo de los álabes del rotor. Con respecto al dispositivo de procesamiento, como se ha definido anteriormente, el accionamiento puede conectarse de manera correspondiente a un controlador para controlar la velocidad de rotación a una velocidad constante, preferentemente entre 700-1100 rpm.

Con el fin de lograr el flujo continuo y el procesamiento deseados en el dispositivo de molienda, el procedimiento puede comprender: la extracción continua del tejido procesado que comprende las células separadas del dispositivo de molienda mediante la aplicación de una aspiración a una salida o presión a una entrada del dispositivo de molienda y/o mediante la aplicación de una presión a una entrada del dispositivo de molienda.

Además, el dispositivo de molienda del dispositivo de procesamiento puede estar formado por un cartucho de molienda, como se ha definido anteriormente, que se proporciona como parte consumible del dispositivo de procesamiento. En este caso, el cartucho de molienda se puede desechar después de cada uso, p. ej., después de cada sesión de tratamiento, incluyendo el procesamiento del tejido adiposo. El cartucho de molienda utilizado se puede acoplar y desacoplar del accionamiento del dispositivo de procesamiento y reemplazarlo con uno nuevo, un cartucho de molienda no utilizado.

En una aplicación preferida del presente procedimiento, el procedimiento comprende: recibir el tejido adiposo a través de un tubo flexible conectado a una cánula, es decir, una aguja utilizada en liposucción, antes de suministrar continuamente el tejido adiposo al dispositivo de molienda. En este caso de uso preferido, el dispositivo de molienda se utiliza para procesar tejido adiposo extraído durante la liposucción, es decir, para procesar el "lipoaspirado".

Una realización preferida adicional de la presente invención con respecto a esta aplicación es un conjunto para aplicaciones de liposucción que comprende: un dispositivo de molienda (o cartucho de molienda) como se ha definido anteriormente, y una cánula, que se conecta a la entrada del dispositivo de molienda. El conjunto tiene la ventaja, de que se puede proporcionar una conexión fiable y lista para usar entre la cánula y el dispositivo de molienda. El equipo de liposucción existente (bomba, recipiente de recogida, etc.) puede conectarse al dispositivo de molienda en lugar de directamente a la cánula utilizando la misma interfaz. Por consiguiente, so se necesita un equipo adicional.

En lo sucesivo, se definirán realizaciones preferentes del procedimiento, el dispositivo de molienda, el dispositivo de procesamiento y el conjunto según la invención, así como las combinaciones preferidas de las mismas:

1. Procedimiento no enzimático de preparación de células terapéuticas a partir de un tejido adiposo que comprende:

suministrar continuamente el tejido adiposo a un dispositivo de molienda;
procesamiento continuo controlado del tejido adiposo en el interior del dispositivo de molienda por separación mecánica de las células o agregados celulares del tejido adiposo que se mueve por el dispositivo de molienda por medio de una multiplicidad de álabes, en el que los álabes están dispuestos en una disposición espaciada con respecto a la dirección general de flujo y los álabes se mueven alrededor de un eje de rotación, en el que el eje de rotación es proporcionado esencialmente paralelo a dicha dirección general de flujo;
retirar continuamente el tejido procesado que comprende las células separadas del dispositivo de molienda.

2. Procedimiento según la realización 1, en el que el caudal que pasa por el dispositivo de molienda en funcionamiento es de al menos 100 ml/min, preferentemente al menos 200 ml/min.

3. Procedimiento según la realización 1 o 2, que comprende:
controlar la velocidad de rotación a una velocidad constante predefinida, preferentemente entre 700-1100 rpm.

4. Procedimiento según una de las realizaciones precedentes, que comprende: bombear el tejido que pasa por el dispositivo de molienda, preferentemente por medio de la rotación de los álabes.

5. Procedimiento según una de las realizaciones precedentes, que comprende: extraer de forma continua el tejido procesado que comprende las células separadas de los agregados celulares del dispositivo de molienda al aplicar una aspiración a una salida del dispositivo de molienda.

6. Procedimiento según una de las realizaciones precedentes, que comprende: recibir el tejido adiposo a través de un tubo flexible conectado a una cánula antes de suministrar continuamente el tejido adiposo al dispositivo de molienda.

7. Procedimiento según una de las realizaciones precedentes, en el que el dispositivo de molienda es un dispositivo de molienda según una de las realizaciones 9 a 23.

8. Dispositivo de molienda para la preparación de células terapéuticas a partir del tejido adiposo que comprende:

una carcasa que tiene una entrada y una salida y que define un volumen operativo y
un rotor recibido dentro del volumen operativo y pivotable con respecto a la carcasa alrededor de un eje de rotación, caracterizado porque
el rotor comprende al menos ocho filas de álabes en una disposición espaciada con respecto al eje de rotación del rotor,
en el que el volumen operativo definido por la carcasa corresponde al sólido de revolución creado por una línea que conecta los radios de los álabes de cada fila subsiguiente del rotor girado alrededor del eje de rotación del rotor, y porque la entrada y la salida se disponen en extremos opuestos del rotor, esencialmente cerca de la primera y última fila de álabes respectivamente en una dirección de flujo.

9. Dispositivo de molienda según la realización 8, caracterizado porque el rotor comprende entre 20 y 80 filas de álabes.

10. Dispositivo de molienda según la realización 8 o 9, caracterizado porque al menos ocho de las filas de álabes,

comprende cada una, dos, tres o cuatro álabes dispuestos circunferencialmente con respecto al eje de rotación del rotor.

11. Dispositivo de molienda según una de las realizaciones 8 a 10, caracterizado porque los álabes de al menos una fila están formados por elementos similares a placas planas.

5 12. Dispositivo de molienda según la realización 11, caracterizado porque la longitud y la anchura de cada álabe está en el intervalo de 1 a 50 mm.

13. Dispositivo de molienda según la realización 11 o 12, caracterizado porque para al menos algunas de las filas, preferentemente entre cuatro y 70 filas, el eje de rotación del rotor es esencialmente perpendicular al plano medio de los álabes.

10 14. Dispositivo de molienda según una de las realizaciones 11 a 13, caracterizado porque para al menos algunas de las filas, preferentemente entre tres y 20 filas, el eje de rotación del rotor es esencialmente paralelo al plano medio de los álabes.

15 15. Dispositivo de molienda según una de las realizaciones 8 a 14, caracterizado porque al menos algunas de las filas tienen el mismo número de álabes, en el que los álabes están dispuestos en columnas paralelas al eje de rotación del rotor.

16. Dispositivo de molienda según una de las realizaciones 8 a 15, caracterizado porque el rotor comprende un propulsor, formado preferentemente por al menos una fila de álabes configurados como álabes del propulsor.

17. Dispositivo de molienda según una de las realizaciones 8 a 16, caracterizado porque al menos uno de los álabes comprende dos o más dientes radialmente espaciados, preferentemente en paralelo al eje de rotación.

20 18. Dispositivo de molienda según una de las realizaciones 8 a 17, caracterizado porque al menos una sección del volumen operativo tiene una forma ahusada con una sección transversal que disminuye en una dirección de la entrada a la salida.

19. Dispositivo de molienda según una de las realizaciones 8 a 18, caracterizado porque la carcasa se forma a partir de uno o más componentes conectados entre sí en una disposición fija.

25 20. Dispositivo de molienda según una de las realizaciones 8 a 19, caracterizado porque la relación de la sección transversal media del volumen operativo transversal al eje de rotación del rotor con respecto a la longitud total del volumen operativo paralelo al eje de rotación del rotor está comprendida entre 0,02 y 0,5.

21. Dispositivo de molienda según una de las realizaciones 8 a 20, caracterizado porque la longitud del volumen operativo paralelo al eje de rotación del rotor es inferior a 500 mm.

30 22. Dispositivo de molienda según una de las realizaciones 8 a 21, caracterizado porque el dispositivo de molienda se proporciona como un cartucho de molienda.

23. Dispositivo de procesamiento para la preparación de células terapéuticas a partir del tejido adiposo que comprende:

35 al menos un dispositivo de molienda según una de las realizaciones 8 o 22, y un accionamiento conectado al rotor del dispositivo de molienda mediante un eje impulsor, en el que el accionamiento está formado preferentemente por un motor.

24. Dispositivo de procesamiento según la realización 23, caracterizado porque el accionamiento está conectado al rotor del dispositivo de molienda mediante un acoplamiento magnético.

40 25. Dispositivo de procesamiento según la realización 23 o 24, caracterizado porque el accionamiento está conectado a un controlador para controlar la velocidad de rotación, preferentemente a una velocidad constante, en particular a una velocidad constante entre 700-1100 rpm.

26. Dispositivo de procesamiento según una de las realizaciones 23 a 25, caracterizado porque el dispositivo de molienda se forma por un cartucho de molienda según la realización 22, que se proporciona como parte consumible del dispositivo de procesamiento.

45 27. Conjunto para aplicaciones de liposucción que comprende:

un dispositivo de molienda según una de las realizaciones 8 a 22, y una cánula, que está conectada a la entrada del dispositivo de molienda por medio de un tubo que aloja también preferentemente una bomba de rodillos.

50 La invención se definirá con más detalle a continuación por medio de realizaciones a modo de ejemplo preferidas, a las que no se ha de limitar, sin embargo, y con referencia a los dibujos. En detalle:

La Fig. 1 muestra esquemáticamente una vista despiezada de un dispositivo de procesamiento que comprende un dispositivo de molienda según la presente invención;

La Fig. 2 muestra esquemáticamente el rotor del dispositivo de molienda mostrado en la Fig. 1;

La Fig. 3 y la Fig. 4 muestran una vista lateral y una vista superior, respectivamente del rotor de la Fig. 2;

La Fig. 5 y la Fig. 6 muestran una vista en corte y superior, respectivamente de la carcasa del dispositivo de molienda de la Fig. 1;

La Fig. 7 muestra una vista en corte parcial de un dispositivo de molienda ensamblado que comprende un rotor según la Fig. 3 y una carcasa según la Fig. 5;

La Fig. 8 muestra el rendimiento celular de células/microtejidos terapéuticos recién aislados a partir de 100 ml de material de liposucción, en el que el microtejido obtenido con el procedimiento de aislamiento enzimático mostró un rendimiento celular significativamente mayor en comparación con las células aisladas después de realizar el procedimiento inventivo o el procedimiento de agitación y corte ($***p < 0,001$. $n=5-7$);

La Fig. 9 muestra la viabilidad celular de células/microtejidos terapéuticos recién aislados a partir de 100 ml de material de liposucción, en el que el porcentaje de células vivas recién aisladas derivadas de procedimientos de aislamiento enzimático o no enzimático fue examinado por tinción por fluorescencia de naranja de acridina/DAPI. No hubo diferencias significativas en la viabilidad celular entre los procedimientos de aislamiento enzimático y no enzimático aplicados. ($n=7$);

La Fig. 10a muestra imágenes representativas de un ensayo de unidades formadora de colonias de fibroblastos (UFC-F) de células recién aisladas. Las células recién aisladas derivadas de aislamiento enzimático (lado derecho) y según la invención (lado izquierdo) se sembraron en un número definido de células en cada pocillo de una placa de 6 pocillos y después de 14 días de cultivo, las colonias formadas se tiñeron con hematoxilina/eosina;

La Fig. 10b muestra el resultado de un análisis cuantitativo, que reveló que las células aisladas según la invención mostraron un mayor potencial para formar colonias en comparación con las células obtenidas por el procedimiento de aislamiento enzimático ($n=5$);

La Fig. 11 muestra un diagrama de ATP intra-/extracelular de células adherentes. Las células adherentes derivadas de procedimientos de aislamiento enzimático o no enzimático se examinaron para la concentración de ATP intra-/extracelular. Las células aisladas según la invención mostraron una concentración de ATP intra-/extracelular significativamente más alta en comparación con el procedimiento de aislamiento enzimático y con los procedimientos de aislamiento no enzimáticos de agitación y corte ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $n=5$);

Las Figs. 12a y 12b ilustran el potencial de proliferación de las células adherentes. Las células adherentes derivadas de procedimientos de aislamiento enzimático y no enzimático fueron examinadas después de 3 y 7 días en medios de expansión por microscopía óptica (Fig. 12a) y después de 7, 14 y 21 días en medios de expansión para determinar su potencial de proliferación por nivel de duplicación de la población (NDP) (Fig. 12b). Las células derivadas de todos los procedimientos de aislamiento mostraron una morfología de las células en forma fusiforme en el día 7. Barra de tamaño = 100 μm (Fig. 12a). Las células aisladas después del procesamiento según la invención mostraron NDP similares en comparación con el procedimiento de aislamiento enzimático o con los procedimientos de aislamiento no enzimáticos de agitación y corte (Fig. 12b) ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $n=5$);

La Fig. 13a-f muestra diagramas que comparan el inmunofenotipo de células recién aisladas. Se examinaron las células recién aisladas derivadas del procedimiento de aislamiento enzimático (0,2 U/ml de collagenasa) y el aislamiento no enzimático según la invención para determinar la composición celular. Si bien no hubo diferencia en el marcador de células madre mesenquimales CD73 (Fig. 13a), CD90 (Fig. 13b) y CD105 (Fig. 13c), las células progenitoras endoteliales (CD45-/CD31+/CD34+) (Fig. 13d) y las células similares a pericitos (Fig. 13e) se redujeron ligeramente cuando se utilizó la invención en comparación con el aislamiento enzimático. El número de CMA-SA fue mejorado cuando se utilizó la invención en comparación con el aislamiento enzimático (Fig. 13f). ($n=3-4$);

La Fig. 14a-d muestra diagramas que comparan el inmunofenotipo de células adherentes. Se examinaron las células adherentes derivadas con la invención o el procedimiento de aislamiento enzimático (0,2 U/ml de collagenasa) para determinar la composición celular. Si bien no hubo diferencia en el marcador de células madre mesenquimales CD73, CD90 y CD105, así como el marcador endotelial/pericitico CD146, un aumento en el marcador hematopoyético CD45 y en los marcadores endoteliales CD31 y CD34 fue visible con la invención (Fig. 14a). Las células progenitoras endoteliales (CD45-/CD31+/CD34+) fueron significativamente mejoradas con la invención en comparación con el aislamiento enzimático (Fig. 14b). Asimismo, el número de células similares a pericitos (CD45-/CD31-/CD146+) fue afectado positivamente por la invención (Fig. 14c). El número de CMA-SA era todavía alto después de 6 días en cultivo con la invención pero menor que con el aislamiento enzimático (Fig. 14d). ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$. $n=3$);

La Fig. 15 muestra un diagrama que compara la citotoxicidad de las células recién aisladas (liberación de LDH). La muerte celular se evaluó mediante la liberación de LDH después de 24 horas en medio de expansión. Las células derivadas utilizando la invención y el procedimiento de aislamiento enzimático (0,2 U/ml de collagenasa) fueron comparadas con un control utilizando Tritón X-100 en el que murió el 100 % de las células. Las células derivadas del procedimiento inventivo mostraron una liberación de LDH significativamente menor en comparación con el procedimiento de aislamiento enzimático. ($**p < 0,01$; $***p < 0,0001$. $n=3$);

Las Figs. 16a y 16b ilustran una comparación del potencial de diferenciación osteogénica de las células adherentes analizadas con tinción de rojo alizarina (Fig. 16a) y cuantificación (Fig. 16b). Las células adherentes derivadas por la invención, los procedimientos de aislamiento enzimático y no enzimático se examinaron después de 1 semana en medio de expansión y 3 semanas más en medio de diferenciación osteogénica por su potencial de diferenciación osteogénica teñido con rojo alizarina para la mineralización y calcificación de la matriz. La tinción con rojo alizarina

demonstró menos mineralización para las células aisladas con el procedimiento de aislamiento enzimático y los procedimientos de aislamiento no enzimático de agitación y corte, pero una tinción intensa para las células derivadas de la invención. Barra de tamaño = 100 μm (Fig. 16a). El análisis cuantitativo reveló que las células aisladas con la invención mostraron una extinción de rojo alizarina significativamente mayor en comparación con las células obtenidas por el procedimiento de aislamiento enzimático y los procedimientos de aislamiento no enzimático de corte y agitación (Fig. 16b). (Ctrl.: células en medios de control sin factores de crecimiento ni estímulos, dif.: células en medios de diferenciación osteogénica. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$. $n=5$);

La Fig. 17 muestra un diagrama del potencial de diferenciación osteogénica de las células adherentes analizadas con fosfatasa alcalina (ALP). Las células adherentes derivadas con la invención, los procedimientos de aislamiento enzimático y no enzimático se examinaron después de 1 semana en medio de expansión y 3 semanas más en medio de diferenciación osteogénica por su potencial de diferenciación osteogénica teñido con ALP que se expresa en osteoblastos activos. Las células aisladas que utilizan la invención mostraron una actividad de ALP significativamente más alta en comparación con todos los demás procedimientos. (Ctrl.: células en medios de control sin factores de crecimiento ni estímulos, dif.: células en medios de diferenciación osteogénica. Para el análisis estadístico, se realizó la prueba post hoc de Tukey con ANOVA unidireccional. * $p < 0,05$. $n=5$);

Las Figs. 18a y 18b ilustran una comparación del potencial de diferenciación adipogénica de las células adherentes analizadas con tinción de rojo aceite O (Fig. 18a) y cuantificación (Fig. 18b). Las células adherentes derivadas con la invención, los procedimientos de aislamiento enzimático y no enzimático se examinaron después de 1 semana en medio de expansión y 3 semanas más en medio de diferenciación adipogénica por su potencial de diferenciación adipogénica teñido con rojo aceite O para la formación de gotas de lípidos. La tinción con rojo aceite O demostró menos formación de gotas de lípidos para las células aisladas con el procedimiento de aislamiento enzimático y los procedimientos de aislamiento no enzimático de agitación y corte, pero una formación de gotas de lípidos intensa para las células derivadas por la invención. Barra de tamaño = 100 μm (a). El análisis cuantitativo reveló que las células aisladas con la invención mostraron una extinción de rojo aceite O significativamente mayor en comparación con las células obtenidas por el procedimiento de aislamiento enzimático y los procedimientos de aislamiento no enzimático de corte y agitación (Fig. 18b). (Ctrl.: células en medios de control sin factores de crecimiento ni estímulos, dif.: células en medios de diferenciación adipogénica. ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$; $n=5$);

Las Figs. 19a y 19b ilustran una comparación del potencial de diferenciación condrogénica de los sedimentos de micromasa 3D analizados con la tinción de azul alcian y colágeno tipo II (Fig. 19a) y el aumento del tamaño de los sedimentos con el tiempo (Fig. 19b). Las células adherentes derivadas con la invención, los procedimientos de aislamiento enzimático y no enzimático se transfirieron después de 1 semana en medios de expansión como sedimentos de micromasa 3D durante 5 semanas más en medios de diferenciación condrogénica. Los sedimentos de micromasa 3D se midieron cada semana para su área de sección transversal y después de 5 semanas se tiñeron con azul alcian y colágeno tipo II por su potencial de diferenciación condrogénica. La tinción con azul alcian y colágeno tipo II demostraron una tinción débil o ausente para las células aisladas con el procedimiento de aislamiento enzimático y los procedimientos de aislamiento no enzimático de agitación y corte, pero una tinción intensa para las células derivadas con la invención. Barra de tamaño = 100 μm (Fig. 19a). Las células obtenidas con la invención mostraron un crecimiento más rápido del tamaño de los sedimentos en los medios de diferenciación condrogénica en comparación con todos los demás procedimientos de aislamiento, aunque el aumento no alcanzó una significación estadística (Fig. 19b). (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. $n=5$);

La Fig. 20 ilustra el potencial de vascularización de células recién aisladas analizadas en matrices de fibrina en 3D. Las células recién aisladas derivadas del aislamiento enzimático y con la invención se mezclaron con fibrinógeno y trombina para la formación de coágulos de fibrina. Después de 2 semanas en medios de expansión incluyendo la aprotinina, se analizó su potencial de vascularización con el marcador endotelial CD31 (verde). La tinción demostró el desarrollo de una morfología tubular para las células derivadas del aislamiento enzimático y con la invención. Barra de tamaño = 200 μm (fila superior), 100 μm (fila inferior). ($n=1$); y

La Fig. 21 muestra un conjunto para aplicaciones de liposucción que comprende un dispositivo de molienda según la Fig. 1 y una cánula.

La Fig. 22 muestra el rendimiento celular de células/microtejidos terapéuticos recién aislados a partir de 100 ml de material de liposucción, en el que el microtejido obtenido con el procedimiento de aislamiento enzimático mostró un rendimiento celular significativamente mayor en comparación con las células aisladas después de realizar el procedimiento inventivo o el procedimiento de agitación y corte (** $p < 0,001$. $n=5-9$);

La Fig. 23 muestra la viabilidad celular de células/microtejidos terapéuticos recién aislados a partir de 100 ml de material de liposucción, en el que el porcentaje de células vivas recién aisladas derivadas de procedimientos de aislamiento enzimático o no enzimático fue examinado por tinción por fluorescencia de DAPI. No hubo diferencias significativas en la viabilidad celular entre los procedimientos de aislamiento enzimático y no enzimático aplicados. ($n=5-9$);

La Fig. 24a muestra imágenes representativas de un ensayo de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (UFC-F) de células recién aisladas. Las células recién aisladas derivadas de aislamiento enzimático (lado derecho) y según la invención (lado izquierdo) se sembraron en un número definido de células en cada pocillo de una placa de 6 pocillos y después de 14 días de cultivo, las colonias formadas se tiñeron con hematoxilina/eosina;

La Fig. 24b muestra el resultado de un análisis cuantitativo, que reveló que las células aisladas según la invención mostraron un mayor potencial para formar colonias en comparación con las células obtenidas por el procedimiento de aislamiento enzimático ($n=5$);

La Fig. 25 muestra un diagrama de ATP intra-/extracelular de células adherentes. Las células adherentes derivadas de procedimientos de aislamiento enzimático o no enzimático se examinaron para la concentración de ATP intra-

/extracelular. Las células aisladas según la invención mostraron una concentración de ATP intra-/extracelular significativamente más alta en comparación con el procedimiento de aislamiento enzimático y con los procedimientos de aislamiento no enzimáticos de agitación y corte (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; $n=5$);

Las Figs. 26a y 26b ilustran el potencial de proliferación de las células adherentes. Las células adherentes derivadas de procedimientos de aislamiento enzimático y no enzimático fueron examinadas después de 3 y 7 días en medios de expansión por microscopía óptica (Fig. 26a) y después de 7, 14 y 21 días en medios de expansión para determinar su potencial de proliferación por nivel de duplicación de la población (NDP) (Fig. 26b). Las células derivadas de todos los procedimientos de aislamiento mostraron una morfología de las células en forma fusiforme en el día 7. Barra de tamaño = 100 μm (Fig. 26a). Las células aisladas después del procesamiento según la invención mostraron NDP similares en comparación con el procedimiento de aislamiento enzimático o con los procedimientos de aislamiento no enzimático de agitación y corte (Fig. 26b) ($n=5$);

La Fig. 27a-f muestra diagramas que comparan el inmunofenotipo de células recién aisladas. Se examinaron las células recién aisladas derivadas del procedimiento de aislamiento enzimático (0,2 U/ml de collagenasa) y el aislamiento no enzimático según la invención para determinar la composición celular. Si bien no hubo diferencia en el marcador de células madre mesenquimales CD73 (Fig. 27a), CD90 (Fig. 27b) y CD105 (Fig. 27c), las células progenitoras endoteliales (CD45-/CD31+/CD34+) (Fig. 27d) y las células similares a pericitos (CD45-/CD31-/146+) (Fig. 27e) se redujeron ligeramente cuando se utilizó la invención en comparación con el aislamiento enzimático. El número de CMA-SA (45-/31-/146-/34+) fue mejorado cuando se utilizó la invención en comparación con el aislamiento enzimático (Fig. 27f). ($n=3-4$);

La Fig. 28a-d muestra diagramas que comparan el inmunofenotipo de células adherentes. Se examinaron las células adherentes derivadas con la invención o el procedimiento de aislamiento enzimático (0,2 U/ml de collagenasa) para determinar la composición celular. Si bien no hubo diferencia en el marcador de células madre mesenquimales CD73, CD90 y CD105, así como el marcador endotelial/pericítico CD146, un aumento en el marcador hematopoyético CD45 y en los marcadores endoteliales CD31 y CD34 fue visible con la invención (Fig. 28a). Las células progenitoras endoteliales (CD45-/CD31+/CD34+) fueron significativamente mejoradas con la invención en comparación con el aislamiento enzimático (Fig. 28b). Asimismo, el número de células similares a pericitos (CD45-/CD31-/CD146+) fue afectado positivamente por la invención (Fig. 28c). El número de CMA-SA (CD45-/CD31-/146-/34+) era todavía alto después de 6 días en cultivo con la invención pero menor que con el aislamiento enzimático (Fig. 28d). (** $p < 0,01$. $n=3$);

La Fig. 29 muestra un diagrama que compara la citotoxicidad de las células recién aisladas (liberación de LDH). La muerte celular se evaluó mediante la liberación de LDH después de 24 horas en medio de expansión. Las células derivadas utilizando la invención y el procedimiento de aislamiento enzimático (0,2 U/ml de collagenasa) fueron comparadas con un control utilizando Tritón X-100 en el que murió el 100 % de las células. Las células derivadas del procedimiento inventivo mostraron una liberación de LDH significativamente menor en comparación con el procedimiento de aislamiento enzimático. (** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$. $n=3$);

Las Figs. 30a y 30b ilustran una comparación del potencial de diferenciación osteogénica de las células adherentes analizadas con tinción de rojo alizarina (Fig. 30a) y cuantificación (Fig. 30b). Las células adherentes derivadas por la invención, los procedimientos de aislamiento enzimático y no enzimático se examinaron después de 1 semana en medio de expansión y 3 semanas más en medio de diferenciación osteogénica por su potencial de diferenciación osteogénica teñido con rojo alizarina para la mineralización y calcificación de la matriz. La tinción con rojo alizarina demostró menos mineralización para las células aisladas con el procedimiento de aislamiento enzimático y los procedimientos de aislamiento no enzimático de agitación y corte, pero una tinción intensa para las células derivadas de la invención. Barra de tamaño = 100 μm (Fig. 30a). El análisis cuantitativo reveló que las células aisladas con la invención mostraron una extinción de rojo alizarina significativamente mayor en comparación con las células obtenidas por el procedimiento de aislamiento enzimático y los procedimientos de aislamiento no enzimático de corte y agitación (Fig. 30b). (Ctrl.: células en medios de control sin factores de crecimiento ni estímulos, dif.: células en medios de diferenciación osteogénica. * $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$. $n=5$);

La Fig. 31 muestra un diagrama del potencial de diferenciación osteogénica de las células adherentes analizadas con fosfatasa alcalina (ALP). Las células adherentes derivadas con la invención, los procedimientos de aislamiento enzimático y no enzimático se examinaron después de 1 semana en medio de expansión y 3 semanas más en medio de diferenciación osteogénica por su potencial de diferenciación osteogénica teñido con ALP que se expresa en osteoblastos activos. Las células aisladas que utilizan la invención mostraron una actividad de ALP significativamente más alta en comparación con todos los demás procedimientos. (Ctrl.: células en medios de control sin factores de crecimiento ni estímulos, dif.: células en medios de diferenciación osteogénica. * $p < 0,05$. $n=5$);

Las Figs. 32a y 32b ilustran una comparación del potencial de diferenciación adipogénica de las células adherentes analizadas con tinción de rojo aceite O (Fig. 32a) y cuantificación (Fig. 32b). Las células adherentes derivadas con la invención, los procedimientos de aislamiento enzimático y no enzimático se examinaron después de 1 semana en medio de expansión y 3 semanas más en medio de diferenciación adipogénica por su potencial de diferenciación adipogénica teñido con rojo aceite O para la formación de gotas de lípidos. La tinción con rojo aceite O demostró menos formación de gotas de lípidos para las células aisladas con el procedimiento de aislamiento enzimático y los procedimientos de aislamiento no enzimático de agitación y corte, pero una formación de gotas de lípidos intensa para las células derivadas por la invención. Barra de tamaño = 100 μm (a). El análisis cuantitativo reveló que las células aisladas con la invención mostraron una extinción de rojo aceite O significativamente mayor en comparación con las células obtenidas por el procedimiento de aislamiento enzimático y los procedimientos de aislamiento no enzimático de corte y agitación (Fig. 32b). (Ctrl.: células en medios de control sin factores de

crecimiento ni estímulos, dif.: células en medios de diferenciación adipogénica. $^{**}p < 0,01$, $n=5$);

Las Figs. 33a y 33b ilustran una comparación del potencial de diferenciación condrogénica de los sedimentos de micromasa 3D analizados con la tinción de azul alcian y colágeno tipo II (Fig. 33a) y el aumento del tamaño de los sedimentos con el tiempo (Fig. 33b). Las células adherentes derivadas con la invención, los procedimientos de aislamiento enzimático y no enzimático se transfirieron después de 1 semana en medios de expansión como sedimentos de micromasa 3D durante 5 semanas más en medios de diferenciación condrogénica. Los sedimentos de micromasa 3D se midieron cada semana para su área de sección transversal y después de 5 semanas se tiñeron con azul alcian y colágeno tipo II por su potencial de diferenciación condrogénica. La tinción con azul alcian y colágeno tipo II demostraron una tinción débil o ausente para las células aisladas con el procedimiento de aislamiento enzimático y los procedimientos de aislamiento no enzimático de agitación y corte, pero una tinción intensa para las células derivadas con la invención. Barra de tamaño = 100 μm (Fig. 33a). Las células obtenidas con la invención mostraron un crecimiento más rápido del tamaño de los sedimentos en los medios de diferenciación condrogénica en comparación con todos los demás procedimientos de aislamiento (Fig. 33b). Los asteriscos indican una diferencia significativa entre la invención y la colagenasa, Los signos de adición indican una diferencia significativa entre la invención y la agitación y las almohadillas indican una diferencia significativa entre la invención y el corte. ($^{*}p < 0,05$; $^{**}p < 0,01$; $^{***}p < 0,001$; $^{****}p < 0,0001$. $n=4$);

La Fig. 34 ilustra el potencial de vascularización de células recién aisladas analizadas en matrices de fibrina en 3D. Las células recién aisladas derivadas del aislamiento enzimático y con la invención se mezclaron con fibrinógeno y trombina para la formación de coágulos de fibrina. Después de 2 semanas en medios de expansión incluyendo la aprotinina, se analizó su potencial de vascularización con el marcador endotelial CD31 (verde). La tinción demostró el desarrollo de una morfología tubular para las células derivadas del aislamiento enzimático y con la invención. Barra de tamaño = 200 μm (fila superior), 100 μm (fila inferior). ($n=1$);

La Fig. 35 muestra el rendimiento celular de células/microtejidos terapéuticos recién aislados a partir de 100 ml de material de liposucción, en el que el microtejido obtenido con el procedimiento de aislamiento enzimático mostró un rendimiento celular significativamente mayor en comparación con las células aisladas con el procedimiento inventivo y variaciones (es decir variantes 1-4 discutidas más adelante) de ello ($^{*}p < 0,001$. $n=5-8$);

La Fig. 36 muestra la viabilidad celular de células/microtejidos terapéuticos recién aislados a partir de 100 ml de material de liposucción, en el que el porcentaje de células vivas recién aisladas derivadas de procedimientos de aislamiento enzimático o no enzimático fue examinado por tinción por fluorescencia de DAPI. No hubo diferencias significativas en la viabilidad celular entre el procedimiento enzimático aplicado y el procedimiento inventivo y las variaciones (es decir, variantes 1-4 discutidas más adelante) de ello. ($n=5-10$);

La Fig. 37 muestra el resultado de un análisis cuantitativo de un ensayo de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (UFC-F) de células recién aisladas. Las células recién aisladas derivadas del procedimiento de aislamiento enzimático y el procedimiento de la invención se sembraron en un número definido en cada pocillo de una placa de 6 pocillos y después de 14 días de cultivo, las colonias formadas se tiñeron con hematoxilina/eosina. Las células aisladas según la invención mostraron un mayor potencial para formar colonias en comparación con las células obtenidas por el procedimiento de aislamiento enzimático ($n=9-16$);

La Fig. 38a-c muestra diagramas que comparan el inmunofenotipo de células recién aisladas. Se examinaron las células recién aisladas derivadas del procedimiento de aislamiento enzimático (0,2 U/ml de colagenasa) y el aislamiento no enzimático según la invención para determinar la composición celular. Si bien no hubo diferencia en el número de células progenitoras endoteliales (CD45-/CD31+/CD34+) (Fig. 34a), el número de células similares a pericitos (Fig. 34b) se redujo ligeramente cuando se utilizó la invención en comparación con el aislamiento enzimático. El número de CMA-SA fue mejorado aunque no significativo cuando se utilizó la invención en comparación con el aislamiento enzimático (Fig. 34c). ($n=4$);

La Fig. 39 muestra un diagrama que compara el potencial de diferenciación osteogénica de las células adherentes analizadas con tinción de rojo alizarina. Las células adherentes derivadas por la invención, los procedimientos de aislamiento enzimático y no enzimático se examinaron después de 1 semana en medio de expansión y 3 semanas más en medio de diferenciación osteogénica por su potencial de diferenciación osteogénica teñido con rojo alizarina para la mineralización y calcificación de la matriz. Las células aisladas con la invención mostraron una extinción con rojo alizarina significativamente mayor en comparación con las células obtenidas por el procedimiento de aislamiento enzimático. (Ctrl.: células en medios de control sin factores de crecimiento ni estímulos, dif.: células en medios de diferenciación osteogénica. $^{****}p < 0,0001$. $n=7$);

La Fig. 40 muestra un diagrama que compara el potencial de diferenciación osteogénica de las células adherentes analizadas con fosfatasa alcalina (ALP). Las células adherentes derivadas con la invención y los procedimientos de aislamiento enzimático se examinaron después de 1 semana en medio de expansión y 3 semanas más en medio de diferenciación osteogénica por su potencial de diferenciación osteogénica teñido con ALP que se expresa en osteoblastos activos. Las células aisladas con la invención mostraron una actividad de ALP más alta en comparación con el procedimiento enzimático. (Ctrl.: células en medios de control sin factores de crecimiento ni estímulos, dif.: células en medios de diferenciación osteogénica. ($n=5-8$);

La Fig. 41 muestra un diagrama que compara el potencial de diferenciación adipogénica de las células adherentes analizadas con tinción de rojo aceite O. Las células adherentes derivadas con la invención, los procedimientos de aislamiento enzimático y no enzimático se examinaron después de 1 semana en medio de expansión y 3 semanas más en medio de diferenciación adipogénica por su potencial de diferenciación adipogénica teñido con rojo aceite O para la formación de gotas de lípidos. Las células aisladas con la invención mostraron una extinción con rojo aceite O significativamente mayor en comparación con las células obtenidas por el procedimiento de aislamiento enzimático. (Ctrl.: células en medios de control sin factores de crecimiento ni estímulos, dif.: células en medios de

diferenciación adipogénica. $**p < 0,01$. $n=8$);

Las Figs. 42a y 42b muestran el rendimiento celular de células/microtejidos terapéuticos recién aislados a partir de 100 ml de material de liposucción, en el que el procedimiento de la invención muestra un rendimiento celular más alto en comparación con las células aisladas con 1, 3, 6 y 11 filas de álabes de la invención. La Fig. 42b incluye las variantes 1-4 (discutidas más adelante) en la comparación de la Fig. 42a. ($n=2-6$);

Las Figs. 43a y 43b muestran la viabilidad celular de células/microtejidos terapéuticos recién aislados a partir de 100 ml de material de liposucción, en el que el porcentaje de células vivas recién aisladas derivadas de procedimientos de aislamiento no enzimático fue examinado por tinción por fluorescencia de DAPI. No hubo diferencias significativas en la viabilidad celular entre el procedimiento de la invención aplicado y las células aisladas con 1, 3, 6 y 11 filas de álabes de la invención. La Fig. 43b incluye las variantes 1-4 (discutidas más adelante) en la comparación de la Fig. 43a. ($n=2-6$);

Discusión de la Fig. 1-7 y 21

La Fig. 1 muestra un dispositivo de procesamiento 1 que comprende un dispositivo de molienda 2 y una unidad de accionamiento 3. El dispositivo de molienda está configurado para la preparación de células terapéuticas a partir del tejido adiposo. El dispositivo de molienda 2 comprende una carcasa 4 con una entrada 5 y una salida 6. La carcasa 4 tiene una sección ahusada 7 cerca de la entrada 5. La sección ahusada 7 conduce a una sección cilíndrica 8 de la carcasa 4, de la cual la salida 6 se extiende radialmente. La carcasa 4 define un volumen operativo 9 en su interior (cf. la Fig. 5), que tiene una forma parcialmente ahusada y parcialmente cilíndrica según las secciones respectivas 7, 8 de la carcasa 4. El dispositivo de molienda 2 comprende además un rotor 10. El rotor 10 está adaptado para ser recibido de forma giratoria dentro del volumen operativo 9 de la carcasa 4. El rotor 10 tiene un pasador del eje 11 en su extremo estrecho 12 para soportar el rotor 10 dentro de la carcasa 4 y un disco acoplador 13 en su extremo ancho 14. Cuando se recibe en el volumen operativo 9, el extremo estrecho 12 se proporciona cerca de la salida 6 mientras que el extremo ancho 14 se proporciona cerca de la entrada 5 de la carcasa 4. En funcionamiento, el pasador del eje 11 se recibe en una rebaje de cojinete 15 en el interior de una placa final 16 de la carcasa 4 (véase la Fig. 5) y el disco acoplador 13 está esencialmente a un mismo nivel que una abertura 17 de la carcasa en el lado opuesto a la placa final 16. La longitud axial del pasador del eje 11 es, por ejemplo, de 0,9 mm. El diámetro del disco acoplador 13 es, p. ej., de 33 mm con una altura total de 7 mm. El rotor 10 es pivotable respecto a la carcasa 4 alrededor de un eje de rotación 18. El rotor 10 comprende 28 (veintiocho) filas de álabes 19 en una disposición espaciada con respecto al eje de rotación 18 (véase la Fig. 3). La longitud total del rotor en dirección axial (es decir, paralela al eje de rotación 18) es de aproximadamente 186 mm. La entrada 5 y la salida 6 se desplazan en una dirección paralela al eje de rotación 18 del rotor 10.

La primera fila de álabes 20 cuando viene de la entrada en el extremo ancho 14 del rotor 10 está en contacto con el disco acoplador 13. Comprende cuatro álabes que se extienden cada uno radialmente hacia el exterior desde un árbol central alargado 21 del rotor 10 y con un plano medio esencialmente paralelo al eje de rotación 18, es decir, con los bordes exteriores dispuestos cilíndricamente alrededor del árbol 21. Los álabes están dispuestos de forma circunferencial respecto al eje de rotación 18 en diferentes ángulos azimutales, es decir, a 0° , 90° , 180° y 270° (véase la Fig. 4). El diámetro del árbol 21 es, p. ej., de 7 mm y el ancho de la primera fila de álabes 20 es, por ejemplo, de 7,5 mm. Los cuatro álabes de la primera fila de álabes 20 están comprendidos cada uno por cuatro dientes radialmente espaciados 22, que se extienden esencialmente en paralelo al eje de rotación 18. La anchura de los dientes 22 en dirección radial varía entre 1,4 y 1,8 mm.

Las segundas, terceras y cuartas filas de álabes 23, tienen cada una cuatro álabes dispuestos circunferencialmente que son esencialmente paralelos a los álabes de la primera fila de álabes 20. Los extremos exteriores radiales de los álabes de la segunda, tercera y cuarta fila de álabes 23 están esencialmente al mismo nivel que la pared interior de la sección ahusada 7 de la carcasa 4, es decir, dichos bordes exteriores radiales están inclinados con respecto al eje de rotación 18 del rotor 10. En otras palabras, los bordes exteriores están dispuestos de forma cónica respecto a la dirección axial. Las primeras cuatro filas de álabes 20, 23 están separados axialmente por huecos 24, que son más pequeños que el ancho de los álabes de las respectivas filas de álabes 20, 23 en dirección axial. Por ejemplo, la anchura de los álabes de la segunda, tercera y cuarta filas 23 puede ser de 5 mm y la anchura de los huecos 24 entre ellas puede ser de 1,7 mm. Los álabes de las primeras cuatro filas de álabes 20, 23 forman en conjunto un primer grupo 25 de álabes. Los álabes del primer grupo 25 se utilizan principalmente para la homogeneización del tejido introducido a través de la entrada 5 y para poner el tejido en rotación.

Los álabes de la quinta fila y hasta la 27ª fila de álabes forman un segundo grupo 26 de álabes. Los álabes de este segundo grupo 26 están orientados normalmente al eje de rotación 18, de modo que el eje de rotación 18 es esencialmente perpendicular al plano medio de los álabes, es decir, el plano medio es paralelo al plano de movimiento de los álabes. Los álabes del segundo grupo 26 tienen una sección transversal aproximadamente elíptica y son ahusados en dirección radial. Los álabes tienen su anchura máxima perpendicular al plano medio en el extremo conectado al árbol 21. Esta anchura máxima es de aproximadamente 1,3 mm en comparación con una anchura mínima de 0,4 mm en el extremo radialmente exterior del álabes. La distancia de los álabes del segundo grupo 26 es de aproximadamente 6 mm, dando como resultado una anchura de entre 4 y 5 mm de los huecos 27 entre los álabes.

En el extremo estrecho 12 del rotor 10, se conecta una fila de álabes final 28 al árbol 21. Los cuatro álabes de esta fila de álabes final 28 están orientados con sus planos medios paralelos al eje de rotación 18, similar a la del primer

grupo 25 de álabes. Esta orientación promueve la expulsión de las células procesadas y el tejido a través de la salida 6 adyacente a dicha fila de álabes final 28 por la fuerza centrífuga. La longitud de los álabes del segundo grupo 26 y la fila de álabes final 28 medida desde el árbol 21 en dirección radial es de aproximadamente 6,3 mm, de modo que el diámetro total del rotor en esta región es de aproximadamente 19,5 mm.

- 5 El disco acoplador 13 del rotor 10 tiene un rebaje en forma de anillo 29 en su superficie exterior, es decir, que está alejado del árbol 21 (s. Fig. 3 y 4). El rebaje con forma de anillo 29 está configurado para recibir un anillo magnético 30, que forma parte de un acoplamiento magnético del rotor 10 a la unidad de accionamiento 3 (s. Fig. 1). El anillo magnético 30 se mantiene en su lugar por una cubierta de disco 31 fijada al disco acoplador 13 y sella el rebaje 29. El disco acoplador 13 tiene además un rebaje central 32 para recibir un pasador del eje 33 de una arandela de estanqueidad 34 a través de una abertura central en la cubierta del disco 31. La arandela de estanqueidad 34 está adherida y fijada a la carcasa 4 para confinar y sellar el volumen operativo 9. Esta construcción asegura un sistema cerrado estéril. El pasador del eje 33 de la arandela de estanqueidad 34 y el rebaje de cojinete 15 de la carcasa 4 proporcionan en conjunto el cojinete pivote en ambos extremos del rotor 10. Por consiguiente, en el presente ejemplo, el dispositivo de molienda 2 está formado por la carcasa 4, el rotor 10 y la arandela de estanqueidad 34, opcionalmente junto con el anillo magnético 30 y la cubierta de disco 31 para proporcionar un acoplamiento adecuado para accionar el rotor 10.

- En el exterior de la arandela de estanqueidad 34, es decir, en el lado opuesto del volumen operativo 9, el dispositivo de molienda 2 está conectado a la unidad de accionamiento 3. Específicamente, la carcasa 4 se fija a una carcasa de accionamiento 35, que encierra un accionamiento 36 formado, p. ej., por un motor eléctrico. El eje impulsor 37 del accionamiento 36 está fijado a un segundo anillo magnético 38, que se dispone de forma opuesta al anillo magnético 30 del rotor 10 en dirección axial. Los anillos magnéticos 30, 38 están configurados para proporcionar un acoplamiento magnético a través de la arandela de estanqueidad 34 y la cubierta de disco 31, en el que el acoplamiento magnético proporciona una transmisión de par de torsión aplicada por el accionamiento 36 al rotor 10. Con el fin de evitar que componentes líquidos del tejido procesado entren en la carcasa de accionamiento 35, un anillo de junta adicional 39 está dispuesto entre la arandela de estanqueidad 34 y la carcasa de accionamiento 35. La parte posterior de la carcasa de accionamiento 35 alejada del dispositivo de molienda 2 está cerrada por una tapa de extremo 40 fijada a la carcasa de accionamiento 35.

El dispositivo de molienda 2, como se ha descrito anteriormente, forma de manera eficaz un cartucho de molienda que está fijado de manera extraíble a la unidad de accionamiento 3 por medios de fijación liberables 41, tales como tornillos.

- 30 En la Fig. 6, la disposición de la entrada 7 y la salida 6 con respecto al eje de rotación 18 es evidente. Específicamente, la entrada 5 se proporciona en una disposición parcialmente tangencial, es decir, desplazada del centro de la carcasa 4 y el eje de rotación 18, y de modo que guíe el tejido introducido en una trayectoria tangencial hacia la primera fila 20 de álabes del rotor 10. La salida, por otra parte, está centrada con respecto al volumen operativo 9 de la carcasa 4 y se extiende radialmente hacia el exterior desde el eje de rotación 18. Esta disposición es más eficaz para explotar las fuerzas centrífugas que actúan sobre el tejido y las células procesadas debido a la rotación aplicada por la fila final 28 de álabes.

- La Fig. 7 muestra la carcasa 4 junto con el rotor 10 recibido en el volumen operativo 9 de la carcasa 4. Como se desprende de este punto de vista, los bordes exteriores de los álabes de todas las filas del rotor 10 están esencialmente al mismo nivel que la pared interior de la carcasa 4 que delimita el volumen operativo 9, de tal manera que no existe una trayectoria para que el tejido evite el contacto con los álabes. La posición y anchura de la fila de álabes final 28 se adapta a la posición y anchura de la salida 6 de tal manera que la abertura de la salida 6 se elimina básicamente por los álabes de la fila de álabes final 28.

- La realización preferida anterior no es de ninguna manera limitante. El experto en la materia anticipará con facilidad a partir de la descripción anterior que los álabes pueden tener diferentes formas y disposiciones, tal como p. ej., se puede utilizar una sección transversal esencialmente constante o una disposición curvada con respecto a una dirección radial, y un número y secuencia diferentes de álabes con una disposición normal y/o inclinada paralela con respecto a la dirección axial.

- La Fig. 21 muestra un conjunto 42 para aplicaciones de liposucción. El conjunto 42 comprende un dispositivo de molienda 2 (solo se muestra parcialmente) y una cánula 43. La cánula 43 está conectada a una entrada 5 del dispositivo de molienda 2 por un tubo 44. El tubo 44 puede alojar una bomba de rodillos o una bomba peristáltica (no se muestra). La cánula 43 se ilustra esquemáticamente con una aguja 45 para su uso en liposucción.

- Cuatro variantes adicionales de la variante original (variante 0, también indicada como "invención", aunque sin limitación de la presente invención a esta variante) discutidas anteriormente se han probado y se discutirán a continuación: La variante 1 de la invención tiene un mayor diámetro de árbol y álabes más cortos que la variante original: el diámetro del árbol 21 es de aproximadamente 13 mm (simplificación de fundición del rotor en comparación con la primera realización) y la longitud de los álabes del segundo grupo 26 y de la fila de álabes final 28 medida del árbol 21 en una dirección radial es de aproximadamente 3 mm, de modo que el diámetro total del rotor en esta región es de aproximadamente 19 mm. La variante 2 tiene la misma especificación que la variante 1, pero las otras filas de álabes se desplazan 45 grados alrededor del eje de rotación del rotor. La variante 3 tiene un mayor diámetro del árbol

y la misma longitud de álabes que la variante original: el diámetro del árbol 21 es de aproximadamente 13 mm y todos los álabes tienen una longitud similar que es de aproximadamente 6 mm medida del árbol 21 en dirección radial, de modo que el diámetro total del rotor es aproximadamente constante en toda la longitud y equivale a 25 mm. La variante 4 tiene la misma especificación que la variante 3, pero las otras filas de álabes se desplazan 45 grados alrededor del eje de rotación del rotor. El volumen muerto de la variante original es de aproximadamente 71 ml, el volumen muerto de las variantes 1 y 2 es de aproximadamente 55 ml (debido al mayor volumen ocupado por el árbol) y el volumen muerto de las variantes 3 y 4 es de aproximadamente 136 ml (debido al mayor volumen operativo en el interior de la carcasa).

Observaciones generales

Con el fin de evaluar el rendimiento del presente procedimiento y dispositivo, un estudio comparativo ha llevado a cabo la comparación de la calidad de las células resultantes del presente procedimiento y uso del presente dispositivo con células obtenidas que utilizan procedimientos y dispositivos según la técnica anterior. Las etapas descritas a continuación con más detalle se describen para la ilustración del estudio comparativo y para la comprensión de los resultados presentados. Estas etapas no son limitantes para el procedimiento de la invención. Con el fin de obtener células utilizables en la práctica, basta con centrifugar el tejido procesado extraído del dispositivo de molienda según la invención.

La recogida del tejido adiposo humano fue aprobada por el comité de ética local con el consentimiento del paciente. El tejido adiposo subcutáneo se obtuvo durante los procedimientos de liposucción ambulatoria rutinaria bajo anestesia de tumescencia local. 100 ml de tejido adiposo seguido por 100 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS; Lonza, Austria) fueron transportados a través de un dispositivo de molienda 2 de un solo uso como se describe en relación con las Figuras 1 a 7. La suspensión de tejido adiposo homogéneo, las células separadas y el PBS se extrajeron de la salida 6 del dispositivo de molienda 2 y se recogieron en un recipiente estéril.

Durante el aislamiento celular, todos los procedimientos se realizaron en un banco de trabajo estéril. El tejido adiposo homogeneizado obtenido utilizando el presente procedimiento se transfirió a tubos estériles de 50 ml. Tras la centrifugación a 1200 g durante 7 min, el sedimento celular se incubó con 100 ml de tampón de lisis de eritrocitos (cloruro de amonio 154 mM (Sigma, Austria), bicarbonato potásico 10 mM (Sigma), ácido etilendiaminotetraacético 0,1 mM (EDTA; Biochrom, Austria) en agua dest durante 5 min a 37 °C para eliminar los glóbulos rojos. El sobrenadante se aspiró después de la centrifugación durante 5 min a 500 g. El sedimento se lavó con PBS y se filtró a través de un tamizador celular de 100 µm (Falcon, Austria). Después de otra etapa de centrifugación a 300 g durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y las células aisladas se cultivaron en medio de crecimiento endotelial (EGM-2; Lonza) a 37 °C, 5 % de CO₂, y 95 % de humedad del aire o se volvieron a suspender en EGM-2 para otros análisis.

Para comparación, se modificó un aislamiento celular no enzimático utilizando el procedimiento de agitación a partir del documento 2014/0017783 A1 (Gimble, J.M., y col., Non-Enzymatic Method for Isolating Human Adipose-Derived Stromal Stem Cells. 2014, documento US 20140017783 A1 también Shah, F.S., y col., A non-enzymatic method for isolating human adipose tissue-derived stromal stem cells. Cytotherapy, 2013. 15(8): págs. 979-85). 100 ml de material liposucción se transfirieron a una botella de 250 ml y se lavó ampliamente con 50 ml de PBS por agitación manual de la botella. Este procedimiento se repitió tres veces, cada vez con 50 ml de PBS. Después, el lipoaspirado procesado y PBS se transfirieron a tubos de 50 ml y se trataron como se ha descrito anteriormente para el tejido adiposo homogeneizado obtenido utilizando el procedimiento según la invención.

Además, el aislamiento celular no enzimático que utiliza el procedimiento de corte se ha llevado a cabo para comparación Basándose en el procedimiento de Adipofilling (Capurro, S., Adipofilling. 2007; disponible en www.adipofilling.com), 100 ml de material de liposucción se transfirieron a un vaso de precipitados y se cortó con una máquina mezcladora manual durante 2 min. Después, la máquina mezcladora manual se lavó con 50 ml de PBS, que se recogió en el mismo vaso de precipitados. El lipoaspirado procesado se transfirió a tubos de 50 ml y se trató como se ha descrito anteriormente para el tejido adiposo homogeneizado obtenido utilizando el procedimiento según la invención.

El aislamiento enzimático de las células se realizó conforme lo modificado por Wolbank y col. (Wolbank, S., y col., Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. Tissue Eng, 2007. 13(6): págs. 1173-83). Brevemente, 100 ml de material liposucción se lavaron con un volumen idéntico de PBS para eliminar la sangre y la solución de tumescencia. Después, el tejido se digirió con 100 ml de collagenasa NB4 (Serva, Austria) con una concentración de 0,2 U/ml disuelta en PBS que contenía Ca²⁺/Mg²⁺ y ácido N-2-hidroxi-etil-piperazina-N0-2-etansulfónico 25 mM (HEPES; Sigma) a 37 °C con agitación moderada (180 rpm) durante 1 h. El tejido digerido se transfirió a tubos de 50 ml y se trató como se ha descrito anteriormente para el tejido adiposo homogeneizado obtenido utilizando el procedimiento según la invención.

Después de sembrar las células en la superficie plástica en medios de expansión (EGM-2), la fracción de células adherentes que incluye CMA pueden crecer descomunemente como monocapa adherente y se cultivan hasta alcanzar un estado subconfluyente antes del pase. Los medios se cambiaron cada 3 a 4 días. Para un subcultivo, se aspiró el medio de EGM-2, las células se lavaron con PBS y se incubaron con 1x tripsina/EDTA a 37 °C. Después de 2-5 min y un ligero golpeteo del frasco de cultivo, las células se desprendieron y la actividad de la tripsina se detuvo

por adición de medios con suero bovino fetal al 10 % (SBF; PAA, Austria). Las células disociadas se recogieron en un tubo y se centrifugaron. A partir de ahí, el sedimento se resuspendió en un medio de EGM-2 y las células se cuantificaron con exclusión de azul de tripano en un contador de células (TC-20, Biorad, Austria). Se utilizaron células adherentes del pase 0 para ATP, análisis por citometría de flujo y potencial de diferenciación, mientras que las células recién aisladas se utilizaron para los otros experimentos.

Discusión de las Figs. 8-20

El número y la viabilidad de las células se determinó utilizando la tinción por fluorescencia de naranja de acridina/DAPI y se cuantificó en un contador celular (NucleoCounter® NC-200™, Chemometec, Dinamarca) con microscopio de fluorescencia integrado. Puesto que la composición celular heterogénea consiste también en células agregadas a la matriz extracelular restantes, se eligió el protocolo de "Viabilidad y Recuento Celular - Ensayo de Células Agregadas". Cada muestra se transfirió a un VIA1-Cassette™, que está recubierta con naranja de acridina y DAPI y se realizaron dos mediciones: Una con solución de lisis celular para teñir todos los núcleos celulares de la muestra y otra sin solución de lisis para teñir sólo células no viables.

Se sembró un número definido de células (4, 20, 100, 500, 2500, 12500) en cada pocillo de una placa de 6 pocillos y se cultivaron en EGM-2 durante 14 días, incluyendo un cambio de medio en el día 7. Después de 14 días de cultivo, las células individuales han formado colonias. Las células se fijaron con un 4 % de formaldehído y se tiñeron con hematoxilina. Después, las células fueron lavadas con agua del grifo y teñidas con solución de eosina. Se calculó el porcentaje de células que formaron colonias visibles (en el pocillo con 500 células sembradas) y se comparó con el total de células sembradas.

La cantidad de ATP intra-/extracelular es un indicador de la producción de energía de las células. Para determinar la concentración de ATP intra-/extracelular, se utilizó un ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega, Austria) y se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante. Las células se sembraron a una densidad de 1×10^4 células por pocillo en una placa de 96 pocillos negro (Greiner, Austria) en medios de EGM-2 de 100 µl. Después de 2 h, Se añadieron 100 µl de reactivo CellTiter-Glo® a cada pocillo y la placa se agitó suavemente en un agitador durante 2 min. Después se incubó la placa durante 10 min en la oscuridad. La combinación de ATP intracelular y extracelular puede ser medida ya que el reactivo CellTiter-Glo® incluye un tampón de lisis celular. La señal luminiscente se detectó con un luminómetro (Tecan, Austria) a un tiempo de exposición de 2000 ms y se correlacionó con una curva convencional de ATP.

El potencial de proliferación se analizó determinando el nivel de duplicación de la población (NDP). Se sembraron células recién aisladas a una densidad de 5×10^5 células por frasco de cultivo T-25 y se cultivaron en medio EGM-2. Los medios se cambiaron cada 3 a 4 días. Cuando las células alcanzaron un estado de subconfluencia, se realizaron pases y el número de células se determinó como se ha descrito anteriormente. Para un análisis adicional de NDP, se sembraron CMA a una densidad de 5×10^4 células por frasco de cultivo T-25 y se cultivaron hasta el pase 3. El número de células se determinó después de cada pase.

Se caracterizaron las células recién aisladas y adherentes desde el día 6 de cultivo utilizando los siguientes anticuerpos CD73-FITC (eBiosciences, Austria), CD90-PE (eBiosciences), CD105-V450 Horizon (BD, Austria), CD45-V500 Horizon (BD), CD31-FITC (eBiosciences), CD34-APC (BD) y CD146-PerCP (R&D, Austria), así como la combinación de CD45, CD31, CD34 y CD146 para analizar subpoblaciones específicas: células progenitoras endoteliales (CD45-/CD31+/CD34+), células similares a pericitos (CD45-/CD31-/CD146+), y CMA supra-adventiciales (CMA-SA) (CD45-/CD31-/CD146-/CD34+).

Para la tinción, Se incubaron $2,5 \times 10^5$ células en 50 µl de PBS con un 1 % de SBF con 5 µl de anticuerpos primarios marcados a temperatura ambiente durante 15 min en la oscuridad. Las células se lavaron con 1,5 ml de Cell Wash (BD) y se centrifugaron durante 5 min a 400 g. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular se resuspendió en 300 µl de 1 x Cell Fix (BD; diluido 1:10 con agua dest). Las muestras se almacenaron a 4 °C en la oscuridad hasta el análisis en un FACSaria II (BD). Se determinó el porcentaje de células positivas marcadoras, en comparación con un control de isotipo no específico.

Para la cuantificación de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) se analizaron los sobrenadantes celulares mediante el kit de detección de citotoxicidad (Roche, Austria). Se sembraron células recién aisladas no enzimáticas (obtenidas mediante la invención) y enzimáticas (0,2 U/ml de colagenasa) a una densidad de 2×10^4 en una placa de 96 pocillos en 200 µl de EGM-2 y se incubaron durante 24 h. Se utilizaron células aisladas enzimáticas sembradas en 100 µl de EGM-2 y 100 µl de Tritón X-100 como control de células muertas al 100 %. Después de una incubación de 24 h, se transfirieron 100 µl de cada sobrenadante a un nuevo pocillo y se agregaron 100 µl de mezcla de reacción durante 0,5 h. La absorbancia se midió con un luminómetro (Tecan, Austria) a 490 nm y después de la sustracción de un valor de referencia a 650 nm, se normalizó al control positivo con Tritón X-100, que lisa las células.

Para la diferenciación osteogénica, las células se sembraron a una densidad de 2×10^3 células por pocillo en una placa de 24 pocillos en medio de EGM-2 y se incubaron durante la noche. Al día siguiente, el medio se cambió a un medio de diferenciación osteogénica DMEM-glucosa baja (Lonza) que contiene 10 % de SBF, L-glutamina 2 mM (PAA), 100 U/ml de pen/estrep (Lonza), dexametasona 10 nM (Sigma), 150 µM de ascorbato-fosfato (Sigma), β-glicerofosfato 10

mM (StemCell Technologies, Alemania) y dihidroxi-vitamina D3 10 nM (Sigma) o medios de control que consisten en DMEM:F12/L-glutamina (Lonza) con 10 % de SBF y 100 U/ml de pen/estrep. Los medios se cambiaron cada 3 a 4 días.

- 5 Después de 21 días, se analizó la diferenciación osteogénica con tinción y cuantificación con rojo alizarina, así como la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) intracelular.

10 Para la tinción con rojo alizarina de estructuras calcificadas, las células se lavaron con PBS y se fijaron durante 1 h con etanol al 70 % a -20 °C. Después de enjuagar las células fijas con agua dest, las células se tiñeron con una solución de rojo alizarina 40 mM (pH 4,2; Merck, Austria) durante 15 min. Las células se lavaron con PBS y se tomaron imágenes representativas bajo el microscopio óptico. Para el análisis cuantitativo de la tinción con rojo alizarina, se descartó el sobrenadante y se incubaron las células con 500 µl de metanol al 20 % y ácido acético al 10 % (diluido en agua dest) durante 15 min. Después de la resuspensión, la mezcla de células y metanol/ácido acético se transfirió a una placa transparente de 96 pocillos (100 µl por pocillo). La absorbancia se midió a 450 nm con un luminómetro.

15 El segundo procedimiento para analizar la diferenciación osteogénica es la detección de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) intracelular, que se encuentra en la superficie de células de osteoblastos y ha demostrado ser un indicador bioquímico de la maduración, mineralización ósea y rotación ósea. En primer lugar, se descartó el medio osteogénico y se incubaron las células con 100 µl de PBS durante 1 h a -20 °C. Después, las células se lisaron durante 1 h mediante la adición de 100 µl de PBS con un contenido de Tritón X-100 (Sigma) del 0,5 %. Para la detección cuantitativa de la actividad de ALP, se añadieron 100 µl de solución de sustrato (4-nitrofenilfosfato) en cada pocillo y se incubó durante 1 h en la oscuridad. Por último, la solución se transfirió a una placa transparente de 96 pocillos (100 µl por pocillo) y se midió la absorbancia a 405 nm junto con una longitud de onda de referencia de 620 nm en un luminómetro. Creando una curva convencional con concentraciones conocidas de p-nitrofenol diluidas en solución de interrupción (0,5 % de Tritón X-100 diluido en PBS 1:2) y midiendo la absorción correspondiente, puede calcularse la actividad de ALP de las muestras.

25 Para la diferenciación adipogénica, las células se sembraron a una densidad de $1,4 \times 10^4$ células por pocillo en una placa de 24 pocillos en medio de EGM-2 y se incubaron durante la noche. Al día siguiente, el medio se cambió a un medio de diferenciación adipogénica DMEM-glucosa alta (Lonza) que contiene 10 % de SBF, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de pen/estrep, 1 µM de dexametasona, 3-isobutil-1-metilxantina 0,5 mM (IBMX; Sigma), 10 µg/ml de insulina (Sigma) y 100 µM de indometacina (Sigma) o medios de control que consisten en DMEM:F12/L-glutamina con 10 % de SBF y 100 U/ml de pen/estrep. Los medios se cambiaron cada 3 a 4 días.

30 Después de 21 días, se analizó la diferenciación adipogénica con tinción y cuantificación con rojo aceite O. Se preparó una solución madre de rojo aceite O al disolver 0,3 g de rojo aceite O (Sigma) en 100 ml de isopropanol (Merck, Alemania) a 50-60 °C. Para la solución de trabajo, la solución madre filtrada se diluyó en agua dest 3:2. Después de 30 min, la solución de trabajo se filtró de nuevo inmediatamente antes de su uso. Las células se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído al 4 % durante 1 hora. Después del lavado con agua dest, las células se enjuagaron con etanol al 70 % durante 2 min y se tiñeron durante 5-15 min con la solución de trabajo rojo aceite O. A continuación, se lavaron las células con agua dest y se contratiñeron durante 1-3 min con la solución de hematoxilina de Mayer. Por último, las células fueron lavadas con agua del grifo y evaluadas con microscopio óptico. Para el análisis cuantitativo de la tinción con rojo aceite O, el sobrenadante se descartó y se añadieron 500 µl de isopropanol en cada pocillo. Tras la resuspensión, la mezcla de células e isopropanol se transfirió a una placa transparente de 96 pocillos (100 µl por pocillo). La absorbancia se midió a 510 nm con un luminómetro.

45 Para la diferenciación condrogénica y cultivos de sedimentos de micromasa 3D, se centrifugaron 3×10^5 CMA en medio de diferenciación condrogénica (hMSC Chondro BulletKit (Lonza) que contenía 10 ng/ml de BMP-6 (R&D) y 10 ng/ml de TGF-β3 (Lonza) en microtubos de tapa roscada. Los tubos se colocaron en una incubadora a 37 °C, 5 % de CO₂, y 95 % de humedad con la tapa ligeramente abierta para el intercambio de gases. Después de 2 días, los sedimentos fueron transferidos a placas de fondo en U de 96 pocillos (Greiner) con material reciente. Los medios se cambiaron cada 2 a 3 días. Los cultivos de sedimentos de micromasa 3D incubados durante 35 días en medios de diferenciación condrogénica se midieron una vez a la semana para su área de sección transversal. Después de 35 días de diferenciación, los sedimentos de micromasa se fijaron en formalina tamponada con fosfato al 4 % durante la noche para el análisis histológico. Al día siguiente, los sedimentos se lavaron en 1x PBS y se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol. Después de enjuagar los sedimentos en xilol e infiltración con parafina, las secciones desparafinizadas se tiñeron con azul alcian durante 30 min y se contratiñeron durante 2 min con hematoxilina de Mayer. Para la tinción con colágeno tipo II, las secciones se trataron con pepsina durante 10 min a 37 °C (AP-9007 RTU, Thermo Scientific, Austria). La peroxidasa endógena fue inactivada con un 3 % de H₂O₂ recién preparado durante 10 min a temperatura ambiente, seguido de 2,5 % de suero de caballo normal (Vector RTU) para bloquear la unión inespecífica. Las secciones se incubaron 1 h con monoclonal anticógeno tipo II (MS-306 P0 Thermo Scientific) a 1:100. Después del lavado con TBS, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-ratón DAKO EnVision+ System polímero marcado con PR, Dako, Austria) durante 30 min y se enjuagaron en TBS de nuevo. Las uniones se visualizaron utilizando Nova Red (SK4800 Vector Labs, Austria) durante 6 min. La contratinción se realizó con hematoxilina de Mayer durante 2 min.

60 Para la determinación del potencial de vascularización de las células derivadas de tejido adiposo se realizó un cultivo

de coágulos de fibrina según Holnthoner y col. (Holnthoner, W., y col. 2015 como se ha citado anteriormente), 4×10^5 células se mezclaron con el fibrinógeno (Baxter, Austria; 2,5 mg/ml) y trombina (Baxter, 0,2 U/ml) para la formación de coágulos y pipetearon en cubreobjetos en placas de 12 pocillos. Se polimerizaron los coágulos a 37 °C durante 30 minutos y se cultivaron durante 2 semanas en EGM-2 que contenía aprotinina (Baxter, 100 KIU/ml). Los medios se cambiaron cada 3-4 días. Después del cultivo, se fijaron los coágulos con un 4 % de PFA, se lavaron con PBS e incubaron con un anticuerpo CD31 monoclonal de ratón antihumano conjugado con FITC (BD Biosciences; 1:50 dilución en PBS/1 % de SBF) durante 12 horas en la oscuridad. Se lavaron nuevamente los coágulos con PBS y se tomaron imágenes en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert 200 M.

Los datos se presentan como media $\pm$ desviación típica y el análisis estadístico se realizó utilizando PRISM6 (GraphPad, San Diego, CA, EE.UU.), y la prueba post hoc de Tukey con ANOVA unidireccional. El análisis estadístico del tamaño de los sedimentos se realizó utilizando la prueba post hoc de Tukey con ANOVA bidireccional. La citometría de flujo y el análisis estadístico del ensayo UFC-F se realizaron utilizando la prueba t no pareada. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron como significativos.

El rendimiento celular de las células recién aisladas fue significativamente mayor después del aislamiento enzimático con $4,8 \pm 3,1 \times 10^7$ células derivadas de 100 ml de lipoaspirado en comparación con todos los procedimientos de aislamiento no enzimático (Fig. 8). El procedimiento según la presente invención resultó en un rendimiento celular de $7,4 \pm 2,6 \times 10^6$ células, mientras que el procedimiento de agitación y corte alcanzó números de células inferiores de $1,2 \pm 0,6 \times 10^6$ y $2,1 \pm 1,2 \times 10^6$, respectivamente. Sin embargo, la viabilidad celular de las células recién aisladas fue similar en todos los procedimientos de aislamiento enzimático y no enzimático aplicados; que va de $68,8 \pm 11,0$ % (corte), $75,4 \pm 7,6$ % (agitación), $78,0 \pm 4,2$ % (colagenasa) a $79,0 \pm 7,5$ % (presente invención) de células vivas en comparación con el número total de células (Fig. 9).

Las células recién aisladas derivadas del aislamiento enzimático y según la invención fueron sembradas en concentraciones crecientes (4, 20, 100, 500, 2500, 12500 células/pocillo) en una placa de 6 pocillos y cultivadas en medios de proliferación. Después de 2 semanas, se analizó la capacidad de formación de colonias de las células tiñéndolas con hematoxilina/eosina (Fig. 10a) y calculando el porcentaje de células que formaron colonias en comparación con el total de células sembradas. El análisis cuantitativo reveló una frecuencia de $1,8 \pm 0,52$ % para las células aisladas según la invención en comparación con $1,3 \pm 0,43$ % para las células obtenidas por el procedimiento de aislamiento enzimático (Fig. 10b).

Como la producción de ATP es un indicador de la producción de energía de las células, se analizó la concentración de ATP intra-/extracelular de la fracción celular adherente. De forma interesante, la concentración de ATP fue significativamente mayor en las células obtenidas utilizando la presente invención (1780 ± 360 nmol/l) en comparación con los procedimientos de aislamiento no enzimático de agitación (1237 ± 35 nmol/l) y corte (1114 ± 69 nmol/l) así como con el procedimiento de aislamiento enzimático (852 ± 298 nmol/l) (Fig. 11).

Las células aisladas derivadas de todos los procedimientos de aislamiento celular mostraron una morfología característica de las células en forma fusiforme de CMA en el día 7 (Fig. 12a).

El potencial de proliferación de las células aisladas se analizó a lo largo de 3 semanas (día 7, 14, 21) calculando el nivel de duplicación de la población (NDP) (Fig. 12b). Las células aisladas según la invención mostraron NDP similares en comparación con el procedimiento de aislamiento enzimático o con los procedimientos de aislamiento no enzimático de agitación y corte.

Para determinar el impacto de los diferentes procedimientos de aislamiento sobre la composición celular de las células derivadas de tejido adiposo, se investigó el inmunofenotipo de la fracción celular recién aislada y adherente derivada del procedimiento según la invención y el aislamiento enzimático mediante análisis de citometría de flujo. Si bien no hubo diferencia en el marcador de células madre mesenquimales CD73 ($47,7 \pm 3,1$ % vs $46,2 \pm 19,9$ %), CD90 ($70,6 \pm 7,8$ % vs $76,0 \pm 5,9$ %) y CD105 ($34,5 \pm 19,3$ % vs $32,2 \pm 24,3$ %), (Fig. 13a, 13b y 13c), el análisis de subpoblaciones específicas mostró una pequeña disminución de CPE (CD45-/CD31+/CD34+) ($15,6 \pm 12,1$ % vs $20,7 \pm 1,7$ %) y subpoblaciones periciticas (CD45-/CD31-/CD146+) ($13,1 \pm 11,1$ % vs $24,8 \pm 2,9$ %) al utilizar la invención en comparación con el aislamiento enzimático (Fig. 13d y 13e). Por el contrario, el procedimiento y dispositivo inventivo mejoraron el número de CMA-SA (CD45-/CD31-/CD146-/CD34+) en comparación con el aislamiento enzimático ($52,3 \pm 4,3$ % vs $28,9 \pm 2,4$ %) (Fig. 13f).

En cuanto al inmunofenotipo de células adherentes, casi no hubo diferencia entre las células derivadas según la invención y el aislamiento enzimático en el marcador de células madre mesenquimales CD73 ($88,4 \pm 11,8$ % vs $92,4 \pm 13,9$ %), CD90 ($94,2 \pm 9,3$ % vs $89,4 \pm 10,3$ %), CD105 ($89,4 \pm 12,3$ % vs $88,9 \pm 20,0$ %) y el marcador endotelial/pericitico CD146 ($10,5 \pm 13,1$ % vs $9,5 \pm 1,3$ %). Por el contrario, las células derivadas con la invención mostraron un aumento en el marcador hematopoyético CD45 ($5,7 \pm 6,0$ % vs $1,2 \pm 1,2$ %), marcador endotelial CD31 ($11,8 \pm 12,1$ % vs $5,6 \pm 5,8$ %) y CD34 ($8,5 \pm 9,9$ % vs $3,9 \pm 4,1$ %) (Fig. 14a). En consistencia con esto, el procedimiento y dispositivo inventivo parecen promover el linaje endotelial ya que hubo un claro aumento en la subpoblación de CPE (CD45-/CD31+/CD34+) ($22,8 \pm 7,3$ % vs $0,3 \pm 0,1$ %) después de 6 días en cultivo en comparación con el aislamiento enzimático (Fig. 14b). Asimismo, el número de células similares a pericitos (CD45-/CD31-/CD146+) fue aumentado con la invención ($20,3 \pm 14,1$ % vs $8,4 \pm 3,9$ %) (Fig. 14c) y el número de CMA-SA

(CD45-/CD31-/CD146-/CD34+) se incrementó después de 6 días en cultivo, aunque fue más bajo en comparación con el aislamiento enzimático ($16,0 \pm 4,8 \%$ vs $23,8 \pm 9,1 \%$) (Fig. 14d).

Puesto que la liberación de LDH en las células es un indicador de citotoxicidad, las células FVE derivadas del procedimiento de aislamiento enzimático ($0,2$ de U/ml de colagenasa) y no enzimático después de emplear la invención fueron normalizadas a un control utilizando Tritón X-100, en el que murieron el 100% de las células FVE. Las células aisladas con la invención expresaron una liberación de LDH significativamente inferior ($26,6 \pm 0,7 \%$) en comparación con las células aisladas de colagenasa ($39,1 \pm 2,7 \%$) y la condición de control Tritón X-100 (100%) (Fig. 15).

Las FVE adherentes derivadas con la invención, los procedimientos de aislamiento no enzimático de agitación y corte y el procedimiento de aislamiento enzimático ($0,2$ U/ml de colagenasa) se examinaron por inducción con medios de diferenciación para determinar su potencial de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica.

Después de 3 semanas de incubación con medios osteogénicos, las células se analizaron para su potencial de diferenciación osteogénica por tinción con rojo alizarina, que indica mineralización y calcificación de la matriz, y la medición de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) intracelular, que se expresa en osteoblastos activos. La tinción con rojo alizarina demostró menos mineralización para las células aisladas con el procedimiento de aislamiento enzimático y los procedimientos de aislamiento no enzimático de agitación y corte; pero una fuerte mineralización después de utilizar la invención (Fig. 16a).

Estas observaciones se confirmaron mediante el análisis cuantitativo de la tinción con rojo alizarina que muestra una extinción con rojo alizarina significativamente más alta para las células aisladas utilizando la invención ($2,6 \pm 0,4$) en comparación con el procedimiento de aislamiento enzimático ($1,1 \pm 0,5$) y con los procedimientos de aislamiento no enzimático de corte ($0,5 \pm 0,4$) y agitación ($1,5 \pm 0,9$) (Fig. 16b). Similar a la tinción con rojo alizarina, la actividad de ALP fue significativamente superior para las células aisladas después de utilizar la invención ($366 \pm 248 \mu\text{mol/l}$) en comparación con las células aisladas con el procedimiento de aislamiento enzimático ($148 \pm 59 \mu\text{mol/l}$) y los procedimientos de aislamiento no enzimático de agitación ($141 \pm 70 \mu\text{mol/l}$) y corte ($142 \pm 108 \mu\text{mol/l}$) (Fig. 17).

El potencial de diferenciación adipogénica de las células aisladas se analizó después de 3 semanas de incubación con medio de diferenciación adipogénica por tinción con rojo aceite O, que es un indicador para la formación de gotas de lípidos. La tinción con rojo aceite O demostró una formación de gotas de lípidos más fuerte para las células aisladas utilizando la invención en comparación con el procedimiento de aislamiento enzimático y los procedimientos de aislamiento no enzimático de agitación y corte (Fig. 18a). El análisis cuantitativo de la tinción confirmó el potencial de diferenciación adipogénica más fuerte de células aisladas utilizando la invención al mostrar una extinción de rojo aceite O significativamente mayor ($0,8 \pm 0,2$) en comparación con el procedimiento de aislamiento enzimático ($0,4 \pm 0,2$) y con los procedimientos de aislamiento no enzimático de corte ($0,4 \pm 0,2$) y agitación ($0,4 \pm 0,2$) (Fig. 18b).

Para analizar el potencial de diferenciación condrogénica, los sedimentos de micromasa 3D se formaron e incubaron durante 5 semanas en medio de diferenciación condrogénica. Los sedimentos de micromasa 3D se investigaron cada semana para su área de sección transversal y después de 5 semanas se tiñeron con azul alcian y colágeno tipo II, que son ambos indicadores para la diferenciación condrogénica. El análisis histológico mostró una tinción débil o ausente de azul alcian y colágeno tipo II para células aisladas con el procedimiento de aislamiento enzimático y los procedimientos de aislamiento no enzimático de agitación y corte. Sin embargo, los sedimentos de micromasa 3D formados por células aisladas utilizando la invención demostraron tinciones intensas para azul alcian y colágeno tipo II (Fig. 19a). Además, las células derivadas con la invención mostraron un crecimiento más rápido de los sedimentos de micromasa 3D, ya que el tamaño de los sedimentos se mejoró claramente en comparación con todos los demás procedimientos de aislamiento, aunque el aumento no alcanzó significación estadística (Fig. 19b).

Las células recién aisladas se examinaron en matrices de fibrina 3D para su potencial de vascularización. Después de 2 semanas de incubación en medio de expansión incluyendo la aprotinina, que evita la degradación del coágulo de fibrina, los geles se tiñeron con el marcador endotelial CD31. La tinción demostró que las células derivadas del aislamiento enzimático y según la invención desarrollaron una morfología tubular (Fig. 20) que indica vasculogénesis *in vitro*.

Aislar las células de tejido adiposo, se utilizan enzimas tales como colagenasa, que se acompaña de altos costos, puede plantear problemas con las autoridades reguladoras (véase, EudraLex, Clinical trial guidelines. 2010 Volumen 10; Aarya Hari, S.G., Production of Good Manufacturing Practice Grade Equine Adiposederived Mesenchymal Stem Cells for Therapeutic Use. Journal of Stem Cell Research & Therapy, 2013. 03(05): págs. 2157-7633; Sensebe, L., Beyond genetic stability of mesenchymal stromal cells. Cytotherapy, 2013. 15(11): págs. 1307-8; EudraLex, Good manufacturing practice (GMP) 2015 Volumen 4) and potentially impacts cell efficacy (Busser, H., y col., Isolation of adipose derived stromal cells without enzymatic treatment: expansion, phenotypical and functional characterization. Stem Cells Dev, 2014; Seaman, S.A., y col., Differential Effects of Processing Time and Duration of Collagenase Digestion on Human and Murine Fat Grafts. Plast Reconstr Surg, 2015. 136(2): págs. 189e-199e). Como alternativa, con el fin de evitar las enzimas, los sistemas de aislamiento que utilizan fuerzas físicas están disponibles. Estos sistemas no incluyen la digestión enzimática, sino células libres del tejido adiposo procesado por fuerzas mecánicas.

La presente invención propone un nuevo procedimiento cerrado no enzimático para homogeneizar el tejido adiposo

enriquecido con células terapéuticas para la reconstrucción, reparación y reemplazo en medicina regenerativa. Con la ayuda de un sistema de bombeo controlable, el tejido adiposo recogido se transporta en línea a álaves/paletas especiales, homogeneizados y después se recogen en un recipiente para la separación y el uso directo o crioalmacenamiento. Los análisis de las células derivadas con el procedimiento y dispositivo inventivo demostraron propiedades y funcionalidades celulares mejoradas.

Se demuestra que el procedimiento inventivo no enzimático proporciona tejido adiposo enriquecido con células terapéuticas. Estas células exhiben una concentración de ATP intra- y extracelular superior y se diferencian de manera más eficaz en el linaje adipogénico, osteogénico y condrogénico en comparación con los procedimientos convencionales de aislamiento enzimático (colagenasa) y no enzimático (agitación modificada por Shah, F.S., y col. 2013, como se ha citado anteriormente y Gimble, J.M., y col. 2014, como se ha citado anteriormente, y procedimiento de corte modificado por Capurro, S. 2007, como se ha citado anteriormente). Aunque el aislamiento no enzimático según la invención resultó en un rendimiento celular 3-5 veces superior al de los procedimientos de aislamiento no enzimático de agitación y corte, el rendimiento celular obtenido fue significativamente inferior en comparación con el procedimiento de aislamiento enzimático. Para superar inconvenientes como el rendimiento celular inferior para aplicaciones clínicas que pueden requerir un número elevado de células, se puede utilizar más material tisular, ya que el tejido adiposo está abundantemente disponible y el procedimiento y dispositivo inventivos tienen una alta tasa de rendimiento de hasta 100 ml de lipoaspirado por minuto. Con el procedimiento de agitación, se aislaron $2,5 \times 10^6$ células por 100 ml de tejido adiposo que es consistente con el procedimiento de agitación publicado (Gimble, J.M., y col. 2014, como se ha citado anteriormente). Otros grupos notificaron rendimientos celulares increíblemente altos de $1,8 \times 10^{12}$ células estromales "por muestra" de tejido adiposo (Agha-Mohammadi, S., Non-Enzymatic Method for Harvesting Adipose-Derived Stromal Cells and Adipose-Derived Stem Cells from Fat and Lipo-Aspirate. 2013, documento US 20130034524 A1), desafortunadamente ni el procedimiento, ni el tamaño de la muestra, ni la identidad de la población celular resultante están claramente definidos. Asimismo, se observaron rendimientos celulares de aproximadamente 2-10 millones de células/gramo de tejido adiposo sin una identidad claramente definida (Bright, R., y col., Isolation of stem cells from adipose tissue by ultrasonic cavitation, and methods of use. 2014, documento WO 2014000031 A1). La identidad celular de las células producidas es de importancia crítica para su potencial terapéutico. Los procedimientos para la cuantificación de células utilizados por diferentes grupos de trabajo difieren o no están claros. Entre los posibles impactos sobre el número de células se encuentran los números de eritrocitos dentro de la FVE, que no pueden considerarse células terapéuticas. Casi todos los procedimientos de aislamiento no enzimáticos no utilizan una etapa de lisis de eritrocitos para eliminar los eritrocitos que son reconocidos por muchos contadores de células como células viables (con un tamaño de célula de aproximadamente 4 μm). El rendimiento celular analizado después de utilizar la invención representa las células después de la lisis de eritrocitos, que se aplica por lo general durante el aislamiento enzimático convencional. Se incluyó esta etapa para una comparación adecuada con un protocolo de aislamiento enzimático convencional. Por desgracia, dentro de la mayoría de los sistemas mencionados anteriormente no se describe ninguna comparación con un procedimiento de aislamiento enzimático convencional. El rendimiento celular de los procedimientos de aislamiento no enzimático utilizados es 10 veces menor que con el aislamiento enzimático utilizando 0,2 U/ml de colagenasa. Pero las células aisladas con la invención muestran un potencial de proliferación similar y un potencial de formación de colonias similar o incluso superior en comparación con las células aisladas enzimáticamente. La frecuencia de progenitores estromales es superior a la esperada de >1 % de células (Bourin, P., y col., Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 2013. 15(6): págs. 641-8). Sin embargo, la presente invención trae consigo células con un 13 % de liberación de LDH reducida en comparación con las células aisladas enzimáticamente, que indica una citotoxicidad inferior de los aislados. Con más del 70 % de células vivas, tanto el aislamiento enzimático como el aislamiento con la presente invención proporcionan células que se encuentran dentro del intervalo de viabilidad esperado (según las directrices de IFATS) (Bourin, P., y col. 2013, como se ha citado anteriormente).

De forma interesante, el procedimiento y dispositivo inventivos proporcionan una mayor cantidad y variedad de poblaciones celulares específicas con eficacia terapéutica potencial, tal como células progenitoras endoteliales, células similares a pericitos y CMA-SA, que deben ser adecuadas para las distintas terapias celulares. Aunque hubo un número ligeramente reducido de CPE y células similares a pericitos en células recién aisladas después de aplicar el procedimiento propuesto actualmente en comparación con el aislamiento enzimático, el dispositivo inventivo parece proteger estas subpoblaciones que todavía estaban presentes después de 6 días de cultivo en una cantidad similar. La invención promueve el linaje endotelial ya que hubo un claro aumento del 203 % en la subpoblación de CPE (CD45-/CD31+/CD34+) en comparación con el aislamiento enzimático. También el número de células similares a pericitos (CD45-/CD31-/CD146+) fue afectado después de 6 días de cultivo a través del procedimiento inventivo con un aumento del 12 % en comparación con el aislamiento enzimático. Hallazgos similares también se muestran por Bianchi y col. (Bianchi, F., y col., A new nonenzymatic method and device to obtain a fat tissue derivative highly enriched in pericyte-like elements by mild mechanical forces from human lipoaspirates. *Cell Transplant*, 2013. 22(11): págs. 2063-77) con el dispositivo de aislamiento no enzimático Lipogems®, en el que las células expandidas obtenidas por crecimiento excesivo de los agrupamientos de Lipogems expresaron un alto número de marcadores similares a pericitos (CD146+) y células endoteliales vasculares (CD31+; CD34+). En comparación con Bianchi y col., las células aisladas con la presente invención mostraron después de 6 días en cultivo células endoteliales aún más altas y números de células similares a pericitos. Zimmerlin y col. (Zimmerlin, L., y col., Human adipose stromal vascular cell

delivery in a fibrin spray. Cytotherapy, 2013. 15(1): págs. 102-8) reveló con Lipivage™ cantidades mayores de CMA-SA (CD14-/CD33-/CD45-/glicoforina-A-/CD31-/CD146-/CD34+) que las que se obtuvieron con nuestro procedimiento, pero menos células progenitoras endoteliales (CD14-/CD33-/CD45-/glicoforina-A-/CD34+/CD31+) y células similares a pericitos (CD14-/CD33-/CD45-/glicoforina-A-/CD31-/CD146+) en comparación con nuestro procedimiento. Gimble y col., aislaron con su procedimiento no enzimático (Gimble, J.M., y col. 2014, como se ha citado anteriormente), niveles más bajos de células que expresan CD34 (endoteliales) y CD45 (hematopoyéticas) y niveles más altos de CD44 (mesenquimal) en la población de células aisladas. James y col., podían demostrar que los pericitos (CD45-, CD146+, CD34-) y las células adventiciales (CD45-, CD146-, CD34+) poseían un fuerte potencial osteogénico *in vivo* (James A. W., y col. 2012, como se ha citado anteriormente). Con la presente invención, podría mostrar que incluso el microtejido que contiene un alto número de células endoteliales exhibe un aumento sustancial en el potencial de diferenciación osteogénica analizado por rojo alizarina y fosfatasa alcalina. Además, estas células poseen además un fuerte potencial de diferenciación adipogénica (rojo aceite O) y condrogénica (azul alcian, colágeno tipo II) y son capaces de desarrollar la morfología similar a un tubo, que es un requisito previo para la neovascularización. Esto significa que hay subpoblaciones que tienen la capacidad de experimentar la diferenciación en los linajes mesodérmicos. La pregunta es, si la abundancia de las poblaciones especiales es importante o si más subpoblaciones están interactuando. No obstante, la aplicación del presente procedimiento y dispositivo permite obtener células terapéuticas con un elevado recambio de ATP.

Sin la necesidad de digestión enzimática o procesamiento de tejido adicional, el procedimiento y dispositivo inventivos presentan un procedimiento seguro con una tasa de rendimiento muy alta que resulta en un aislamiento simple dentro de un tiempo breve. El sistema proporciona el tejido adiposo homogeneizado enriquecido con células terapéuticas con propiedades definidas para aplicaciones clínicas autólogas.

Discusión de las Figs. 22-34

El número y la viabilidad de las células se determinó utilizando la tinción por fluorescencia de DAPI y se cuantificó en un contador celular (NucleoCounter® NC-200™, Chemometec, Dinamarca) con microscopio de fluorescencia integrado. Puesto que la composición celular heterogénea consiste también en células agregadas a la cadenas de la matriz extracelular restantes, se eligió el protocolo de "Viabilidad y Recuento Celular - Ensayo de Células Agregadas". Cada muestra se transfirió a un VIA1-Cassette™, que está recubierta con DAPI y se realizaron dos mediciones: Una con solución de lisis celular para teñir todos los núcleos celulares de la muestra y otra sin solución de lisis para teñir sólo células no viables.

Se sembró un número definido de células (4, 20, 100, 500, 2500, 12500) en cada pocillo de una placa de 6 pocillos y se cultivaron en EGM-2 durante 14 días, incluyendo un cambio de medio en el día 7. Después de 14 días de cultivo, las células individuales han formado colonias. Las células se fijaron con un 4 % de formaldehído y se tiñeron con hematoxilina. Después, las células fueron lavadas con agua del grifo y teñidas con solución de eosina. Se calculó el porcentaje de células que formaron colonias visibles (en el pocillo con 500 células sembradas) y se comparó con el total de células sembradas.

La cantidad de ATP intra-/extracelular es un indicador de la producción de energía de las células. Para determinar la concentración de ATP intra-/extracelular, se utilizó un ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega, Austria) y se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante. Las células se sembraron a una densidad de 1×10^4 células por pocillo en una placa de 96 pocillos negro (Greiner, Austria) en medios de EGM-2 de 100 µl. Después de 2 h, Se añadieron 100 µl de reactivo CellTiter-Glo® a cada pocillo y la placa se agitó suavemente en un agitador durante 2 min. Después se incubó la placa durante 10 min en la oscuridad. La combinación de ATP intracelular y extracelular puede ser medida ya que el reactivo CellTiter-Glo® incluye un tampón de lisis celular. La señal luminiscente se detectó con un luminómetro (Tecan, Austria) a un tiempo de exposición de 2000 ms y se correlacionó con una curva convencional de ATP.

El potencial de proliferación se analizó determinando el nivel de duplicación de la población (NDP). Se sembraron células recién aisladas a una densidad de 5×10^5 células por frasco de cultivo T-25 y se cultivaron en medio EGM-2. Los medios se cambiaron cada 3 a 4 días. Cuando las células alcanzaron un estado de subconfluencia, se realizaron pases y el número de células se determinó como se ha descrito anteriormente. Para un análisis adicional de NDP, se sembraron CMA a una densidad de 5×10^4 células por frasco de cultivo T-25 y se cultivaron hasta el pase 3. El número de células se determinó después de cada pase.

Se caracterizaron las células recién aisladas y adherentes desde el día 6 de cultivo utilizando los siguientes anticuerpos CD73-FITC (eBiosciences, Austria), CD90-PE (eBiosciences), CD105-V450 Horizon (BD, Austria), CD45-V500 Horizon (BD), CD31-FITC (eBiosciences), CD34-APC (BD) y CD146-PerCP (R&D, Austria), así como la combinación de CD45, CD31, CD34 y CD146 para analizar subpoblaciones específicas: células progenitoras endoteliales (CD45-/CD31+/CD34+), células similares a pericitos (CD45-/CD31-/CD146+), y CMA supra-adventiciales (CMA-SA) (CD45-/CD31-/CD146-/CD34+).

Para la tinción, Se incubaron $2,5 \times 10^5$ células en 50 µl de PBS con un 1 % de SBF con 5 µl de anticuerpos primarios marcados a temperatura ambiente durante 15 min en la oscuridad. Las células se lavaron con 1,5 ml de Cell Wash (BD) y se centrifugaron durante 5 min a 400 g. El sobrenadante se descartó y el sedimento celular se resuspendió en

300 µl de 1 x Cell Fix (BD; diluido 1:10 con aqua dest). Las muestras se almacenaron a 4 °C en la oscuridad hasta el análisis en un FACSria II (BD). Se determinó el porcentaje de células positivas marcadoras, en comparación con un control de isotipo no específico.

Para la cuantificación de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) se analizaron los sobrenadantes celulares mediante el kit de detección de citotoxicidad (Roche, Austria). Se sembraron células recién aisladas no enzimáticas (obtenidas mediante la invención) y enzimáticas (0,2 U/ml de colagenasa) a una densidad de 2×10^4 en una placa de 96 pocillos en 200 µl de EGM-2 y se incubaron durante 24 h. Se utilizaron células aisladas enzimáticas sembradas en 100 µl de EGM-2 y 100 µl de Tritón X-100 como control de células muertas al 100 %. Después de una incubación de 24 h, se transfirieron 100 µl de cada sobrenadante a un nuevo pocillo y se agregaron 100 µl de mezcla de reacción durante 0,5 h. La absorbancia se midió con un luminómetro (Tecan, Austria) a 490 nm y después de la sustracción de un valor de referencia a 650 nm, se normalizó al control positivo con Tritón X-100, que lisa las células.

Para la diferenciación osteogénica, las células se sembraron a una densidad de 2×10^3 células por pocillo en una placa de 24 pocillos en medio de EGM-2 y se incubaron durante la noche. Al día siguiente, el medio se cambió a un medio de diferenciación osteogénica DMEM-glucosa baja (Lonza) que contiene 10 % de SBF, L-glutamina 2 mM (PAA), 100 U/ml de pen/estrep (Lonza), dexametasona 10 nM (Sigma), 150 µM de ascorbato-2-fosfato (Sigma), β-glicerofosfato 10 mM (StemCell Technologies, Alemania) y dihidroxi-vitamina D3 10 nM (Sigma) o medios de control que consisten en DMEM:F12/L-glutamina (Lonza) con 10 % de SBF y 100 U/ml de pen/estrep. Los medios se cambiaron cada 3 a 4 días.

Después de 21 días, se analizó la diferenciación osteogénica con tinción y cuantificación con rojo alizarina, así como la determinación de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) intracelular.

Para la tinción con rojo alizarina de estructuras calcificadas, las células se lavaron con PBS y se fijaron durante 1 h con etanol al 70 % a -20 °C. Después de enjuagar las células fijas con aqua dest, las células se tiñeron con una solución de rojo alizarina 40 mM (pH 4,2; Merck, Austria) durante 15 min. Las células se lavaron con PBS y se tomaron imágenes representativas bajo el microscopio óptico. Para el análisis cuantitativo de la tinción con rojo alizarina, se descartó el sobrenadante y se incubaron las células con 500 µl de metanol al 20 % y ácido acético al 10 % (diluido en aqua dest) durante 15 min. Después de la resuspensión, la mezcla de células y metanol/ácido acético se transfirió a una placa transparente de 96 pocillos (100 µl por pocillo). La absorbancia se midió a 450 nm con un luminómetro.

El segundo procedimiento para analizar la diferenciación osteogénica es la detección de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) intracelular, que se encuentra en la superficie de células de osteoblastos y ha demostrado ser un indicador bioquímico de la maduración, mineralización ósea y rotación ósea. En primer lugar, se descartó el medio osteogénico y se incubaron las células con 100 µl de PBS durante 1 h a -20 °C. Después, las células se lisaron durante 1 h mediante la adición de 100 µl de PBS con un contenido de Tritón X-100 (Sigma) del 0,5 %. Para la detección cuantitativa de la actividad de ALP, se añadieron 100 µl de solución de sustrato (4-nitrofenilfosfato) en cada pocillo y se incubó durante 1 h en la oscuridad. Por último, la solución se transfirió a una placa transparente de 96 pocillos (100 µl por pocillo) y se midió la absorbancia a 405 nm junto con una longitud de onda de referencia de 620 nm en un luminómetro. Creando una curva convencional con concentraciones conocidas de p-nitrofenol diluidas en solución de interrupción (0,5 % de Tritón X-100 diluido en PBS 1:2) y midiendo la absorción correspondiente, puede calcularse la actividad de ALP de las muestras.

Para la diferenciación adipogénica, las células se sembraron a una densidad de $1,4 \times 10^4$ células por pocillo en una placa de 24 pocillos en medio de EGM-2 y se incubaron durante la noche. Al día siguiente, el medio se cambió a un medio de diferenciación adipogénica DMEM-glucosa alta (Lonza) que contiene 10 % de SBF, L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de pen/estrep, 1 µM de dexametasona, 3-isobutil-1-metilxantina 0,5 mM (IBMX; Sigma), 10 µg/ml de insulina (Sigma) y 100 µM de indometacina (Sigma) o medios de control que consisten en DMEM:F12/L-glutamina con 10 % de SBF y 100 U/ml de pen/estrep. Los medios se cambiaron cada 3 a 4 días.

Después de 21 días, se analizó la diferenciación adipogénica con tinción y cuantificación con rojo aceite O. Se preparó una solución madre de rojo aceite O al disolver 0,3 g de rojo aceite O (Sigma) en 100 ml de isopropanol (Merck, Alemania) a 50-60 °C. Para la solución de trabajo, la solución madre filtrada se diluyó en aqua dest 3:2. Después de 30 min, la solución de trabajo se filtró de nuevo inmediatamente antes de su uso. Las células se lavaron con PBS y se fijaron con formaldehído al 4 % durante 1 hora. Después del lavado con aqua dest, las células se enjuagaron con etanol al 70 % durante 2 min y se tiñeron durante 5-15 min con la solución de trabajo rojo aceite O. A continuación, se lavaron las células con aqua dest y se contratiñeron durante 1-3 min con la solución de hematoxilina de Mayer. Por último, las células fueron lavadas con agua del grifo y evaluadas con microscopio óptico. Para el análisis cuantitativo de la tinción con rojo aceite O, el sobrenadante se descartó y se añadieron 500 µl de isopropanol en cada pocillo. Tras la resuspensión, la mezcla de células e isopropanol se transfirió a una placa transparente de 96 pocillos (100 µl por pocillo). La absorbancia se midió a 510 nm con un luminómetro.

Para la diferenciación condrogénica y cultivos de sedimentos de micromasa 3D, se centrifugaron 3×10^5 CMA en medio de diferenciación condrogénica (hMSC Chondro BulletKit (Lonza) que contenía 10 ng/ml de BMP-6 (R&D) y 10 ng/ml de TGF-β3 (Lonza) en microtubos de tapa roscada. Los tubos se colocaron en una incubadora a 37 °C, 5 % de CO₂, y 95 % de humedad con la tapa ligeramente abierta para el intercambio de gases. Después de 2 días, los sedimentos

fueron transferidos a placas de fondo en U de 96 pocillos (Greiner) con material reciente. Los medios se cambiaron cada 2 a 3 días. Los cultivos de sedimentos de micromasa 3D incubados durante 35 días en medios de diferenciación condrogénica se midieron una vez a la semana para su área de sección transversal. Después de 35 días de diferenciación, los sedimentos de micromasa se fijaron en formalina tamponada con fosfato al 4 % durante la noche para el análisis histológico. Al día siguiente, los sedimentos se lavaron en 1x PBS y se deshidrataron en concentraciones crecientes de alcohol. Después de enjuagar los sedimentos en xilol e infiltración con parafina, las secciones desparafinizadas se tiñeron con azul alcian durante 30 min y se contratiñeron durante 2 min con hematoxilina de Mayer. Para la tinción con colágeno tipo II, las secciones se trataron con pepsina durante 10 min a 37 °C (AP-9007 RTU, Thermo Scientific, Austria). La peroxidasa endógena fue inactivada con un 3 % de H₂O₂ recién preparado durante 10 min a temperatura ambiente, seguido de 2,5 % de suero de caballo normal (Vector RTU) para bloquear la unión inespecífica. Las secciones se incubaron 1 h con monoclonal anticógeno tipo II (MS-306 P0 Thermo Scientific) a 1:100. Después del lavado con TBS, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario (anti-ratón DAKO EnVision+ System polímero marcado con PR, Dako, Austria) durante 30 min y se enjuagaron en TBS de nuevo. Las uniones se visualizaron utilizando Nova Red (SK4800 Vector Labs, Austria) durante 6 min. La contratinción se realizó con hematoxilina de Mayer durante 2 min.

Para la determinación del potencial de vascularización de las células derivadas de tejido adiposo se realizó un cultivo de coágulos de fibrina según Holnthoner y col. (Holnthoner, W., y col. 2015 como se ha citado anteriormente), 4x10⁵ células se mezclaron con el fibrinógeno (Baxter, Austria; 2,5 mg/ml) y trombina (Baxter, 0,2 U/ml) para la formación de coágulos y pipetearon en cubreobjetos en placas de 12 pocillos. Se polimerizaron los coágulos a 37 °C durante 30 minutos y se cultivaron durante 2 semanas en EGM-2 que contenía aprotinina (Baxter, 100 KIU/ml). Los medios se cambiaron cada 3-4 días. Después del cultivo, se fijaron los coágulos con un 4 % de PFA, se lavaron con PBS e incubaron con un anticuerpo CD31 monoclonal de ratón antihumano conjugado con FITC (BD Biosciences; 1:50 dilución en PBS/1 % de SBF) durante 12 horas en la oscuridad. Se lavaron nuevamente los coágulos con PBS y se tomaron imágenes en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiovert 200 M.

Los datos se presentan como media $\pm$ desviación típica y el análisis estadístico se realizó utilizando PRISM6 (GraphPad, San Diego, CA, EE.UU.), y la prueba post hoc de Tukey con ANOVA unidireccional. El análisis estadístico del tamaño de los sedimentos se realizó utilizando la prueba post hoc de Tukey con ANOVA bidireccional. La citometría de flujo y el análisis estadístico del ensayo UFC-F se realizaron utilizando la prueba t no pareada. Los valores de $P < 0,05$ se consideraron como significativos.

El rendimiento celular de las células recién aisladas fue significativamente mayor después del aislamiento enzimático con $4,8 \pm 3,1 \times 10^7$ células derivadas de 100 ml de lipoaspirado en comparación con todos los procedimientos de aislamiento no enzimático (Fig. 22). El procedimiento según la presente invención resultó en un rendimiento celular de $7,4 \pm 2,6 \times 10^6$ células, mientras que el procedimiento de agitación y corte alcanzó números de células inferiores de $1,2 \pm 0,6 \times 10^6$ y $2,1 \pm 1,2 \times 10^6$, respectivamente. Sin embargo, la viabilidad celular de las células recién aisladas fue similar en todos los procedimientos de aislamiento enzimático y no enzimático aplicados; que va de $68,8 \pm 11,0$ % (corte), $75,4 \pm 7,6$ % (agitación), $78,0 \pm 4,2$ % (colagenasa) a $79,0 \pm 7,5$ % (presente invención) de células vivas en comparación con el número total de células (Fig. 23).

Las células recién aisladas derivadas del aislamiento enzimático y según la invención fueron sembradas en concentraciones crecientes (4, 20, 100, 500, 2500, 12500 células/pocillo) en una placa de 6 pocillos y cultivadas en medios de proliferación. Después de 2 semanas, se analizó la capacidad de formación de colonias de las células tiñéndolas con hematoxilina/eosina (Fig. 24a) y calculando el porcentaje de células que formaron colonias en comparación con el total de células sembradas. El análisis cuantitativo reveló una frecuencia de $1,8 \pm 0,52$ % para las células aisladas según la invención en comparación con $1,4 \pm 0,43$ % para las células obtenidas por el procedimiento de aislamiento enzimático (Fig. 24b).

Como la producción de ATP es un indicador de la producción de energía de las células, se analizó la concentración de ATP intra-/extracelular de la fracción celular adherente. De forma interesante, la concentración de ATP fue significativamente mayor en las células obtenidas utilizando la presente invención (1780 ± 360 nmol/l) en comparación con los procedimientos de aislamiento no enzimático de agitación (1237 ± 35 nmol/l) y corte (1114 ± 69 nmol/l) así como con el procedimiento de aislamiento enzimático (852 ± 298 nmol/l) (Fig. 25).

Las células aisladas derivadas de todos los procedimientos de aislamiento celular mostraron una morfología característica de las células en forma fusiforme de CMA en el día 7 (Fig. 26a).

El potencial de proliferación de las células aisladas se analizó a lo largo de 3 semanas (día 7, 14, 21) calculando el nivel de duplicación de la población (NDP) (Fig. 26b). Las células aisladas según la invención mostraron NDP similares en comparación con el procedimiento de aislamiento enzimático o con los procedimientos de aislamiento no enzimático de agitación y corte.

Para determinar el impacto de los diferentes procedimientos de aislamiento sobre la composición celular de las células derivadas de tejido adiposo, se investigó el inmunofenotipo de la fracción celular recién aislada y adherente derivada del procedimiento según la invención y el aislamiento enzimático mediante análisis de citometría de flujo. Si bien no hubo diferencia en el marcador de células madre mesenquimales CD73 ($36,4 \pm 24,2$ % vs $47,7 \pm 3,0$ %), CD90 ($64,8$

$\pm 25,6 \%$ vs $70,6 \pm 7,8 \%$) y CD105 ($25,1 \pm 24,3 \%$ vs $34,4 \pm 19,2 \%$), (Fig. 27a, 27b y 27c), el análisis de subpoblaciones específicas mostró una pequeña disminución de CPE (CD45-/CD31+/CD34+) ($15,6 \pm 12,1 \%$ vs $20,7 \pm 1,7 \%$) y subpoblaciones periciticas (CD45-/CD31-/CD146+) ($13,1 \pm 11,1 \%$ vs $24,8 \pm 2,9 \%$) al utilizar la invención en comparación con el aislamiento enzimático (Fig. 27d y 27e). Por el contrario, el procedimiento y dispositivo inventivo mejoraron el número de CMA-SA (CD45-/CD31-/CD146-/CD34+) en comparación con el aislamiento enzimático ($38,1 \pm 20,4 \%$ vs $27,1 \pm 3,2 \%$) (Fig. 27f).

En cuanto al inmunofenotipo de células adherentes, casi no hubo diferencia entre las células derivadas según la invención y el aislamiento enzimático en el marcador de células madre mesenquimales CD73 ($88,4 \pm 11,8 \%$ vs $92,4 \pm 14,0 \%$), CD90 ($94,2 \pm 9,3 \%$ vs $89,4 \pm 10,3 \%$), CD105 ($89,4 \pm 12,4 \%$ vs $88,9 \pm 20,0 \%$) y el marcador endotelial/pericitico CD146 ($10,5 \pm 13,1 \%$ vs $9,5 \pm 1,3 \%$). Por el contrario, las células derivadas con la invención mostraron un aumento en el marcador hematopoyético CD45 ($5,7 \pm 6,0 \%$ vs $1,2 \pm 1,2 \%$), marcador endotelial CD31 ($11,8 \pm 12,1 \%$ vs $5,6 \pm 5,8 \%$) y CD34 ($8,5 \pm 9,9 \%$ vs $3,9 \pm 4,1 \%$) (Fig. 28a). En consistencia con esto, el procedimiento y dispositivo inventivos parecen promover el linaje endotelial ya que hubo un claro aumento en la subpoblación de CPE (CD45-/CD31+/CD34+) ($22,8 \pm 7,3 \%$ vs $0,3 \pm 0,1 \%$) después de 6 días en cultivo en comparación con el aislamiento enzimático (Fig. 28b). Asimismo, el número de células similares a pericitos (CD45-/CD31-/CD146+) fue aumentado con la invención ($22,3 \pm 14,1 \%$ vs $8,4 \pm 3,9 \%$) (Fig. 28c) y el número de CMA-SA (CD45-/CD31-/CD146-/CD34+) se incrementó después de 6 días en cultivo, aunque fue más bajo en comparación con el aislamiento enzimático ($16,0 \pm 4,8 \%$ vs $23,8 \pm 9,1 \%$) (Fig. 28d).

Puesto que la liberación de LDH en las células es un indicador de citotoxicidad, las células FVE derivadas del procedimiento de aislamiento enzimático ($0,2$ de U/ml de colagenasa) y no enzimático después de emplear la invención fueron normalizadas a un control utilizando Tritón X-100, en el que murieron el 100% de las células FVE. Las células aisladas con la invención expresaron una liberación de LDH significativamente inferior ($26,6 \pm 0,7 \%$) en comparación con las células aisladas de colagenasa ($39,1 \pm 2,7 \%$) y la condición de control Tritón X-100 (100%) (Fig. 29).

Las FVE adherentes derivadas con la invención, los procedimientos de aislamiento no enzimático de agitación y corte y el procedimiento de aislamiento enzimático ($0,2$ U/ml de colagenasa) se examinaron por inducción con medios de diferenciación para determinar su potencial de diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica.

Después de 3 semanas de incubación con medios osteogénicos, las células se analizaron para su potencial de diferenciación osteogénica por tinción con rojo alizarina, que indica mineralización y calcificación de la matriz, y la medición de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) intracelular, que se expresa en osteoblastos activos. La tinción con rojo alizarina demostró menos mineralización para las células aisladas con el procedimiento de aislamiento enzimático y los procedimientos de aislamiento no enzimático de agitación y corte; pero una fuerte mineralización después de utilizar la invención (Fig. 30a).

Estas observaciones se confirmaron mediante el análisis cuantitativo de la tinción con rojo alizarina que muestra una extinción con rojo alizarina significativamente más alta para las células aisladas utilizando la invención ($2,6 \pm 0,4$) en comparación con el procedimiento de aislamiento enzimático ($1,1 \pm 0,5$) y con los procedimientos de aislamiento no enzimático de corte ($0,5 \pm 0,4$) y agitación ($1,5 \pm 0,9$) (Fig. 30b). Similar a la tinción con rojo alizarina, la actividad de ALP fue significativamente superior para las células aisladas después de utilizar la invención ($366 \pm 248 \mu\text{mol/l}$) en comparación con las células aisladas con el procedimiento de aislamiento enzimático ($148 \pm 59 \mu\text{mol/l}$) y los procedimientos de aislamiento no enzimático de agitación ($141 \pm 70 \mu\text{mol/l}$) y corte ($142 \pm 108 \mu\text{mol/l}$) (Fig. 31).

El potencial de diferenciación adipogénica de las células aisladas se analizó después de 3 semanas de incubación con medio de diferenciación adipogénica por tinción con rojo aceite O, que es un indicador para la formación de gotas de lípidos. La tinción con rojo aceite O demostró una formación de gotas de lípidos más fuerte para las células aisladas utilizando la invención en comparación con el procedimiento de aislamiento enzimático y los procedimientos de aislamiento no enzimático de agitación y corte (Fig. 32a). El análisis cuantitativo de la tinción confirmó el potencial de diferenciación adipogénica más fuerte de células aisladas utilizando la invención al mostrar una extinción de rojo aceite O significativamente mayor ($0,8 \pm 0,2$) en comparación con el procedimiento de aislamiento enzimático ($0,4 \pm 0,2$) y con los procedimientos de aislamiento no enzimático de corte ($0,4 \pm 0,2$) y agitación ($0,4 \pm 0,2$) (Fig. 32b).

Para analizar el potencial de diferenciación condrogénica, los sedimentos de micromasa 3D se formaron e incubaron durante 5 semanas en medio de diferenciación condrogénica. Los sedimentos de micromasa 3D se investigaron cada semana para su área de sección transversal y después de 5 semanas se tiñeron con azul alcian y colágeno tipo II, que son ambos indicadores para la diferenciación condrogénica. El análisis histológico mostró una tinción débil o ausente con azul alcian y colágeno tipo II para células aisladas con el procedimiento de aislamiento enzimático y los procedimientos de aislamiento no enzimático de agitación y corte. Sin embargo, los sedimentos de micromasa 3D formados por células aisladas utilizando la invención demostraron tinciones intensas para azul alcian y colágeno tipo II (Fig. 33a). Además, las células derivadas con la invención mostraron un crecimiento más rápido de los sedimentos de micromasa 3D, ya que el tamaño de los sedimentos se mejoró significativamente en comparación con todos los demás procedimientos de aislamiento a partir de 21 días de diferenciación con $1,9 \pm 1,1 \text{ mm}^2$ en comparación con la agitación de $0,8 \pm 0,2 \text{ mm}^2$ y el corte de $0,4 \pm 0,1 \text{ mm}^2$. En el día 28, el tamaño del sedimento de la invención fue de $2,4 \pm 1,3 \text{ mm}^2$ en comparación con la agitación de $1,0 \pm 0,2 \text{ mm}^2$, corte $0,3 \pm 0,1 \text{ mm}^2$ y el procedimiento de aislamiento enzimático $0,9 \pm 0,3 \text{ mm}^2$. En el día 35, los sedimentos representan un tamaño de $2,7 \pm 1,4 \text{ mm}^2$ de la invención en

comparación con la agitación de $1,2 \pm 0,3 \text{ mm}^2$, corte $0,2 \pm 0,1 \text{ mm}^2$ y el procedimiento de aislamiento enzimático $1,1 \pm 0,5 \text{ mm}^2$ (Fig. 33b).

5 Las células recién aisladas se examinaron en matrices de fibrina 3D para su potencial de vascularización. Después de 2 semanas de incubación en medio de expansión incluyendo la aprotinina, que evita la degradación del coágulo de fibrina, los geles se tiñeron con el marcador endotelial CD31. La tinción demostró que las células derivadas del aislamiento enzimático y según la invención desarrollaron una morfología tubular (Fig. 34) que indica vasculogénesis *in vitro*.

Discusión de las Figs. 35-43

10 El rendimiento celular de las células recién aisladas fue significativamente mayor después del aislamiento enzimático con $5,3 \pm 3,6 \times 10^7$ células derivadas de 100 ml de lipoaspirado en comparación con la presente invención con $7,5 \pm 4,9 \times 10^6$ células y la variación 3 de la invención con $1,4 \pm 1,5 \times 10^7$ células (Fig. 35). El procedimiento según la variación 1, 2 y 4 de la invención resultó en un rendimiento celular de $2,4 \pm 2,1 \times 10^7$ células, $1,8 \pm 1,2 \times 10^7$ células y $1,8 \pm 1,6 \times 10^7$ células. Sin embargo, la viabilidad celular de las células recién aisladas fue similar en todos los procedimientos de aislamiento enzimático y no enzimático aplicados; que va de $79,0 \pm 2,5 \%$ (colagenasa), $85,4 \pm 3,8 \%$ (presente invención), $90,6 \pm 4,9 \%$ (variación 1 de la presente invención), $85,6 \pm 10,6 \%$ (variación 2 de la presente invención), $78,1 \pm 10,4 \%$ (variación 3 de la presente invención) a $82,7 \pm 15,5 \%$ (variación 4 de la presente invención) de células vivas en comparación con el número total de células (Fig. 36).

20 Las células recién aisladas derivadas del aislamiento enzimático y según la invención fueron sembradas en concentraciones crecientes (4, 20, 100, 500, 2500, 12500 células/pocillo) en una placa de 6 pocillos y cultivadas en medios de proliferación. Después de 2 semanas, se analizó la capacidad de formación de colonias de las células tiñéndolas con hematoxilina/eosina y calculando el porcentaje de células que formaron colonias en comparación con el total de células sembradas. El análisis cuantitativo reveló una frecuencia de $2,2 \pm 0,8 \%$ para las células aisladas según la invención en comparación con $1,7 \pm 0,7 \%$ para las células obtenidas por el procedimiento de aislamiento enzimático (Fig. 37).

25 Para determinar el impacto de los diferentes procedimientos de aislamiento sobre la composición celular de las células derivadas de tejido adiposo, se investigó el inmunofenotipo de las células recién aisladas derivadas del procedimiento según la invención y el aislamiento enzimático mediante análisis de citometría de flujo. El análisis de subpoblaciones específicas mostró una pequeña disminución de CPE (CD45-/CD31+/CD34+) ($11,8 \pm 12,3 \%$ vs $16,7 \pm 7,2 \%$) y subpoblaciones periciticas (CD45-/CD31-/CD146+) ($10,4 \pm 10,7 \%$ vs $20,7 \pm 7,6 \%$) al utilizar la invención en comparación con el aislamiento enzimático (Fig. 38a y 38b). Por el contrario, el procedimiento y dispositivo inventivo mejoraron el número de CMA-SA (CD45-/CD31-/CD146-/CD34+) en comparación con el aislamiento enzimático ($35,0 \pm 18,4 \%$ vs $27,2 \pm 2,8 \%$) (Fig. 38c).

35 Las FVE adherentes derivadas con la invención y el procedimiento de aislamiento enzimático ($0,2 \text{ U/ml}$ de colagenasa) se examinaron por inducción con medios de diferenciación para determinar su potencial de diferenciación osteogénica y adipogénica.

40 Después de 3 semanas de incubación con medios osteogénicos, las células se analizaron para su potencial de diferenciación osteogénica por tinción con rojo alizarina, que indica mineralización y calcificación de la matriz, y la medición de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALP) intracelular, que se expresa en osteoblastos activos. El análisis cuantitativo de la tinción con rojo alizarina muestra una extinción con rojo alizarina significativamente mayor para las células aisladas utilizando la invención ($2,6 \pm 0,4$) en comparación con el procedimiento de aislamiento enzimático ($1,2 \pm 0,6$) (Fig. 39). Similar a la tinción con rojo alizarina, la actividad de ALP fue significativamente superior para las células aisladas después de utilizar la invención ($366 \pm 248 \mu\text{mol/l}$) en comparación con las células aisladas con el procedimiento de aislamiento enzimático ($229 \pm 122 \mu\text{mol/l}$) (Fig. 40).

45 El potencial de diferenciación adipogénica de las células aisladas se analizó después de 3 semanas de incubación con medio de diferenciación adipogénica por tinción con rojo aceite O, que es un indicador para la formación de gotas de lípidos. El análisis cuantitativo de la tinción demostró el potencial de diferenciación adipogénica más fuerte de células aisladas utilizando la invención al mostrar una extinción de rojo aceite O significativamente mayor ($0,8 \pm 0,1$) en comparación con el procedimiento de aislamiento enzimático ($0,6 \pm 0,1$) (Fig. 41).

50 El rendimiento celular de las células recién aisladas se mejoró ligeramente después del procedimiento de la invención con $7,5 \pm 4,9 \times 10^6$ células derivadas de 100 ml de lipoaspirado en comparación con 1, 3, 6 y 11 filas de álabes del procedimiento de la invención que alcanzó números de células más bajos de $1,6 \pm 1,7 \times 10^6$, $2,2 \pm 0,8 \times 10^6$, $2,1 \pm 0,3 \times 10^6$ y $1,7 \pm 0,8 \times 10^6$, respectivamente (Fig. 42a y 42b).

55 Sin embargo, la viabilidad celular de las células recién aisladas no mostró significancia en todos los procedimientos de aislamiento no enzimático aplicados con $77,1 \pm 7,7 \%$ (1 fila de álabes de la invención), $75,3 \pm 5,7 \%$ (3 filas de álabes de la invención), $72,9 \pm 0,9 \%$ (6 filas de álabes de la invención), $78,4 \pm 8,8 \%$ (11 filas de álabes de la invención) a $85,4 \pm 3,8 \%$ (presente invención) de células vivas en comparación con el número total de células (Fig. 43a y 43b).

Aislar las células de tejido adiposo, se utilizan enzimas tales como colagenasa, que se acompaña de altos costos,

puede plantear problemas con las autoridades reguladoras (véase, EudraLex, Clinical trial guidelines. 2010 Volumen 10; Aarya Hari, S.G., Production of Good Manufacturing Practice Grade Equine Adiposederived Mesenchymal Stem Cells for Therapeutic Use. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*, 2013. 03(05): págs. 2157-7633; Sensebe, L., Beyond genetic stability of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 2013. 15(11): págs. 1307-8; EudraLex, Good manufacturing practice (GMP) 2015 Volumen 4) and potentially impacts cell efficacy (Busser, H., y col., Isolation of adipose derived stromal cells without enzymatic treatment: expansion, phenotypical and functional characterization. *Stem Cells Dev*, 2014; Seaman, S.A., y col., Differential Effects of Processing Time and Duration of Collagenase Digestion on Human and Murine Fat Grafts. *Plast Reconstr Surg*, 2015. 136(2): págs. 189e-199e). Como alternativa, con el fin de evitar las enzimas, los sistemas de aislamiento que utilizan fuerzas físicas están disponibles. Estos sistemas no incluyen la digestión enzimática, sino células libres del tejido adiposo procesado por fuerzas mecánicas.

La presente invención propone un nuevo procedimiento cerrado no enzimático para homogeneizar el tejido adiposo enriquecido con células terapéuticas para la reconstrucción, reparación y reemplazo en medicina regenerativa. Con la ayuda de un sistema de bombeo controlable, el tejido adiposo recogido se transporta en línea a álaves/paletas especiales, homogeneizados y después se recogen en un recipiente para la separación y el uso directo o criomacemamiento. Los análisis de las células derivadas con el procedimiento y dispositivo inventivo demostraron propiedades y funcionalidades celulares mejoradas.

Se demuestra que el procedimiento inventivo no enzimático proporciona tejido adiposo enriquecido con células terapéuticas. Estas células exhiben una concentración de ATP intra- y extracelular superior y se diferencian de manera más eficaz en el linaje adipogénico, osteogénico y condrogénico en comparación con los procedimientos convencionales de aislamiento enzimático (colagenasa) y no enzimático (agitación modificada por Shah, F.S., y col. 2013, como se ha citado anteriormente y Gimble, J.M., y col. 2014, como se ha citado anteriormente, y procedimiento de corte modificado por Capurro, S. 2007, como se ha citado anteriormente). Aunque el aislamiento no enzimático según la invención resultó en un rendimiento celular 4-6 veces superior al de los procedimientos de aislamiento no enzimático de agitación y corte, el rendimiento celular obtenido fue significativamente inferior en comparación con el procedimiento de aislamiento enzimático. Para superar inconvenientes como el rendimiento celular inferior para aplicaciones clínicas que pueden requerir un número elevado de células, se puede utilizar más material tisular, ya que el tejido adiposo está abundantemente disponible y el procedimiento y dispositivo inventivos tienen una alta tasa de rendimiento de hasta 100 ml de lipoaspirado por minuto. Con el procedimiento de agitación, se aislaron 2.5×10^6 células por 100 ml de tejido adiposo que es consistente con el procedimiento de agitación publicado (Gimble, J.M., y col. 2014, como se ha citado anteriormente). Otros grupos notificaron rendimientos celulares increíblemente altos de 1.8×10^{12} células estromales "por muestra" de tejido adiposo (Agha-Mohammadi, S., Non-Enzymatic Method for Harvesting Adipose-Derived Stromal Cells and Adipose-Derived Stem Cells from Fat and Lipo-Aspirate. 2013, documento US 20130034524 A1), desafortunadamente ni el procedimiento, ni el tamaño de la muestra, ni la identidad de la población celular resultante están claramente definidos. Asimismo, se observaron rendimientos celulares de aproximadamente 2-10 millones de células/gramo de tejido adiposo sin una identidad claramente definida (Bright, R., y col., Isolation of stem cells from adipose tissue by ultrasonic cavitation, and methods of use. 2014, documento WO 2014000031 A1). La identidad celular de las células producidas es de importancia crítica para su potencial terapéutico. Los procedimientos para la cuantificación de células utilizados por diferentes grupos de trabajo difieren o no están claros. Entre los posibles impactos sobre el número de células se encuentran los números de eritrocitos dentro de la FVE, que no pueden considerarse células terapéuticas. Antes de analizar el rendimiento celular, casi todos los procedimientos de aislamiento no enzimáticos no utilizan una etapa de lisis de eritrocitos para eliminar los eritrocitos que son reconocidos por muchos contadores de células como células viables (con un tamaño de célula de aproximadamente 4 μ m). Nuestro contador celular especializado no incluye eritrocitos ya que sólo reconoce células nucleadas. Además, las células agregadas dentro de la FVE pueden ser contadas con precisión gracias a un protocolo de 2 etapas que comprende una etapa de lisis, en la que se cuentan todas las células y una segunda etapa, en la que sólo se cuentan las células muertas. Nuestro rendimiento celular analizado después de utilizar la invención representa las células después de la lisis de eritrocitos, que se aplica por lo general durante el aislamiento enzimático convencional. Se incluyó esta etapa para una comparación adecuada con un protocolo de aislamiento enzimático convencional, pero no es necesario para el uso clínico. Por desgracia, dentro de la mayoría de los artículos mencionados anteriormente no se describe ninguna comparación con un procedimiento de aislamiento enzimático convencional. El rendimiento celular del procedimiento de la invención es 7 veces menor que con aislamiento enzimático, mientras que las variantes optimizadas (es decir, las variantes 1-4 discutidas anteriormente) del procedimiento de la invención proporcionan rendimientos celulares 3 veces más altos que el procedimiento de la invención. Las células aisladas con la invención muestran un potencial de proliferación similar y un potencial de formación de colonias similar o incluso superior en comparación con las células aisladas enzimáticamente. La frecuencia de progenitores estromales es superior a la esperada de >1 % de células (Bourin, P., y col., Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 2013. 15(6): págs. 641-8). Con más del 78 % de células vivas, tanto el aislamiento enzimático como el aislamiento con la presente invención proporcionan células que se encuentran dentro del intervalo de viabilidad esperado (según las directrices de IFATS) (Bourin, P., y col. 2013, como se ha citado anteriormente).

De forma interesante, el procedimiento y dispositivo inventivos proporcionan una mayor cantidad y variedad de

poblaciones celulares específicas con eficacia terapéutica potencial, tal como células progenitoras endoteliales, células similares a pericitos y CMA-SA, que deben ser adecuadas para las distintas terapias celulares. Aunque hubo un número ligeramente reducido de CPE y células similares a pericitos en células recién aisladas después de aplicar el procedimiento propuesto actualmente en comparación con el aislamiento enzimático, el dispositivo inventivo parece proteger estas subpoblaciones ya que su número se ha duplicado después de 6 días en cultivo. La invención promueve el linaje endotelial ya que hubo un claro aumento del 23 % en la subpoblación de CPE (CD45-/CD31+/CD34+) en comparación con el aislamiento enzimático. También el número de células similares a pericitos (CD45-/CD31-/CD146+) fue afectado después de 6 días de cultivo a través del procedimiento inventivo con un aumento del 14 % en comparación con el aislamiento enzimático. Hallazgos similares también se muestran por Bianchi y col. (Bianchi, F., y col., A new nonenzymatic method and device to obtain a fat tissue derivative highly enriched in pericyte-like elements by mild mechanical forces from human lipoaspirates. *Cell Transplant*, 2013. 22(11): págs. 2063-77) con el dispositivo de aislamiento no enzimático Lipogems®, en el que las células expandidas obtenidas por crecimiento excesivo de los agrupamientos de Lipogems expresaron un alto número de marcadores similares a pericitos (CD146+) y células endoteliales vasculares (CD31+; CD34+). En comparación con Bianchi y col., las células aisladas con la presente invención mostraron después de 6 días en cultivo números aún más altos de células progenitoras endoteliales y células similares a pericitos. Zimmerlin y col. (Zimmerlin, L., y col., Human adipose stromal vascular cell delivery in a fibrin spray. *Cytotherapy*, 2013. 15(1): págs. 102-8) reveló con Lipivage™ cantidades mayores de CMA-SA (CD14-/CD33-/CD45-/glicoforina-A-/CD31-/CD146-/CD34+) que las que se obtuvieron con nuestro procedimiento, pero menos células progenitoras endoteliales (CD14-/CD33-/CD45-/glicoforina-A-/CD34+/CD31+) y células similares a pericitos (CD14-/CD33-/CD45-/glicoforina-A-/CD31-/CD146+) en comparación con nuestro procedimiento. Gimble y col., aislaron con su procedimiento no enzimático (Gimble, J.M., y col. 2014, como se ha citado anteriormente), niveles más bajos de células que expresan CD34 (endoteliales) y CD45 (hematopoyéticas) y niveles más altos de CD44 (mesenquimal) en la población de células aisladas. James y col., podían demostrar que los pericitos (CD45-, CD146+, CD34-) y las células adventiciales (CD45-, CD146-, CD34+) poseían un fuerte potencial osteogénico *in vivo* (James A. W., y col. 2012, como se ha citado anteriormente). Con la presente invención, se podría mostrar que un alto número de células endoteliales exhibe un aumento sustancial en el potencial de diferenciación osteogénica analizado por rojo alizarina y fosfatasa alcalina. Además, estas células poseen además un fuerte potencial de diferenciación adipogénica (rojo aceite O) y condrogénica (azul alcian, colágeno tipo II) y son capaces de desarrollar una morfología similar a un tubo, que es un requisito previo para la neovascularización. Esto significa que hay subpoblaciones que tienen la capacidad de experimentar la diferenciación en los linajes mesodérmicos. La pregunta es, si la abundancia de las poblaciones especiales es importante o si más subpoblaciones están interactuando.

Sin la necesidad de digestión enzimática o procesamiento de tejido adicional, el procedimiento y dispositivo inventivos presentan un procedimiento seguro con una tasa de rendimiento muy alta que resulta en un aislamiento simple dentro de un tiempo breve. Este sistema proporciona tejido adiposo homogeneizado enriquecido con células terapéuticas con propiedades definidas para aplicaciones clínicas autólogas potenciales.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento no enzimático de preparación de células terapéuticas a partir de un tejido adiposo que comprende:
suministrar en continuo el tejido adiposo a un dispositivo de molienda (2);
procesamiento continuo controlado del tejido adiposo en el interior del dispositivo de molienda por separación
5 mecánica de las células o agregados celulares del tejido adiposo que se mueve por el dispositivo de molienda (2)
por medio de una multiplicidad de álabes (19), en el que los álabes (19) están dispuestos en una disposición
espaciada con respecto a la dirección general de flujo y los álabes (19) se mueven alrededor de un eje de rotación
(18), en el que el eje de rotación (18) es proporcionado esencialmente paralelo a dicha dirección general de flujo;
retirar en continuo el tejido procesado que comprende las células separadas del dispositivo de molienda (2).
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el caudal en el dispositivo de molienda (2) durante su
funcionamiento es de al menos 100 ml/min, preferentemente al menos 200 ml/min.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, que comprende: controlar la velocidad de rotación a una velocidad
constante predefinida, preferentemente entre 700-1100 rpm.
- 15 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, que comprende: la retirada en continuo del tejido
procesado que comprende las células separadas de agregados celulares del dispositivo de molienda (2) mediante la
aplicación de una aspiración en una salida (6) del dispositivo de molienda (2) y/o mediante la aplicación de una presión
en una entrada (5) del dispositivo de molienda (2).
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, en el que el dispositivo de molienda (2) es un
dispositivo de molienda (2) según una de las reivindicaciones 6 a 12.
- 20 6. Dispositivo de molienda (2) para la preparación de células terapéuticas a partir de un tejido adiposo que comprende:
una carcasa (4) que tiene una entrada (5) y una salida (6) y que define un volumen operativo (9) y
un rotor (10) recibido dentro del volumen operativo (9) y que puede pivotar con respecto a la carcasa (4) alrededor
de un eje de rotación (18),
caracterizado porque
25 el rotor (10) comprende al menos ocho filas de álabes (19) en una disposición espaciada con respecto al eje de
rotación (18) del rotor (10), en el que el volumen operativo definido por la carcasa corresponde al sólido de
revolución creado por una línea que conecta los radios de los álabes de cada fila subsiguiente del rotor girado
alrededor del eje de rotación del rotor, y **porque**
la entrada (5) y la salida (6) están dispuestas en extremos opuestos del rotor (10), esencialmente cerca de la
30 primera y última fila de álabes (19) respectivamente en una dirección de flujo.
7. Dispositivo de molienda (2) según la reivindicación 6, **caracterizado porque** el rotor (10) comprende entre 20 y 80
filas de álabes (19).
8. Dispositivo de molienda (2) según una de las reivindicaciones 6 o 7, **caracterizado porque** al menos ocho de las
filas de álabes (19), comprende cada una, dos, tres o cuatro álabes (19) dispuestos circunferencialmente con respecto
35 al eje de rotación (18) del rotor (10).
9. Dispositivo de molienda (2) según una de las reivindicaciones 6 a 8, **caracterizado porque** al menos uno de los
álabes (19) comprende dos o más dientes radialmente espaciados (22), que se extienden preferentemente en paralelo
al eje de rotación (18).
10. Dispositivo de molienda (2) según una de las reivindicaciones 6 a 9, **caracterizado porque** al menos una sección
40 del volumen operativo (9) tiene una forma ahusada con una sección transversal que disminuye en una dirección desde
la entrada (5) hasta la salida (6).
11. Dispositivo de molienda (2) según una de las reivindicaciones 6 a 10, **caracterizado porque** la carcasa (4) está
formada de uno o más componentes conectados entre sí en una disposición fija.
12. Dispositivo de molienda (2) según una de las reivindicaciones 6 a 11, **caracterizado porque** el dispositivo de
45 molienda (2) se proporciona como un cartucho de molienda.
13. Dispositivo de procesamiento (1) para la preparación de células terapéuticas a partir de un tejido adiposo que
comprende:
al menos un dispositivo de molienda (2) según una de las realizaciones 6 a 11, y
un accionamiento (36) conectado al rotor (10) del dispositivo de molienda (2) mediante un eje impulsor (37), en el
50 que el accionamiento (36) está formado preferentemente por un motor.
14. Dispositivo de procesamiento (1) según la reivindicación 13, **caracterizado porque** el dispositivo de molienda (2)
está formado por un cartucho de molienda según la realización 13, que se proporciona como parte consumible del

dispositivo de procesamiento (1).

15. Conjunto (42) para aplicaciones de liposucción que comprende:

un dispositivo de molienda (2) según una de las realizaciones 6 a 12, y
una cánula (43), que está conectada a la entrada (5) del dispositivo de molienda (2) por medio de un tubo (44) que
aloja también preferentemente una bomba de rodillos.

5

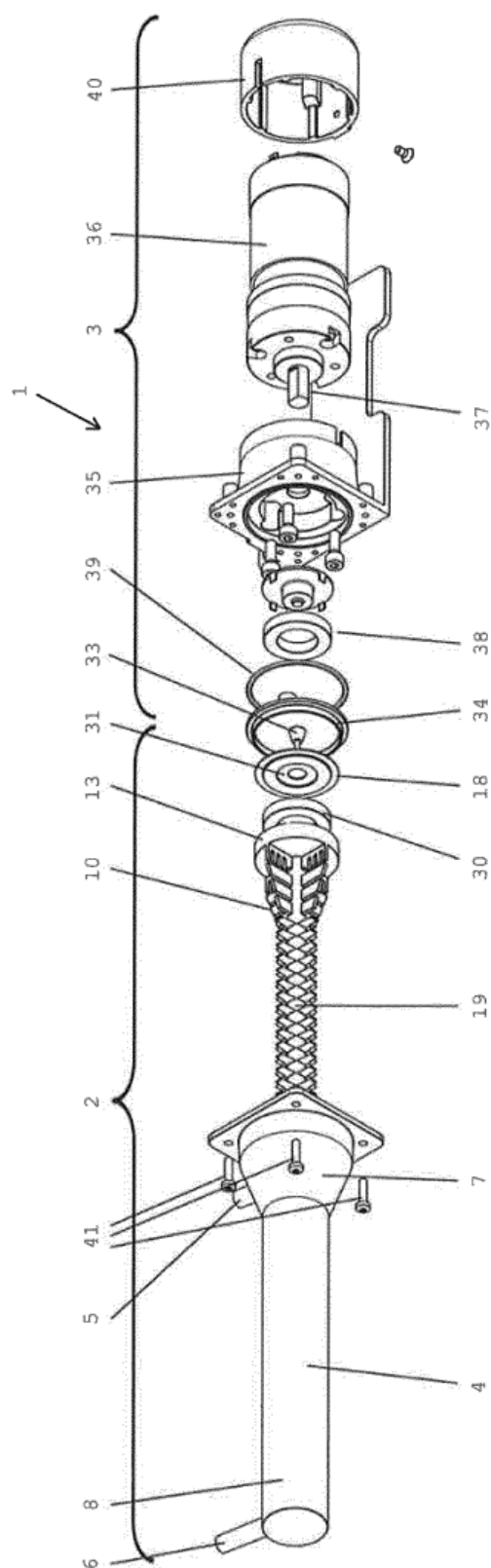
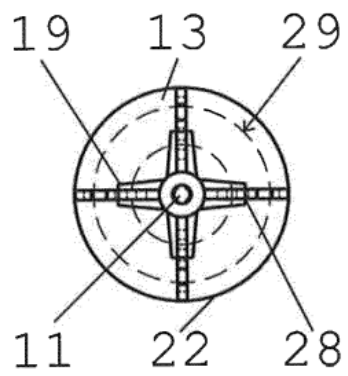
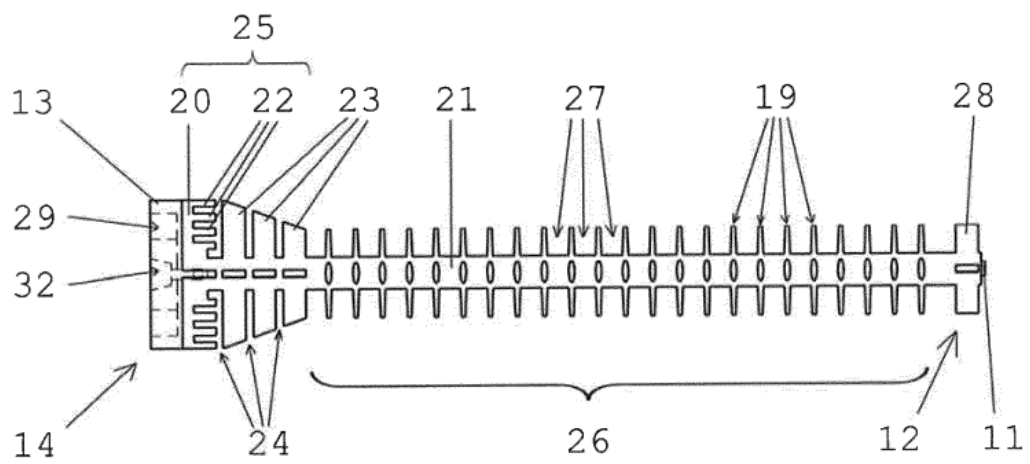
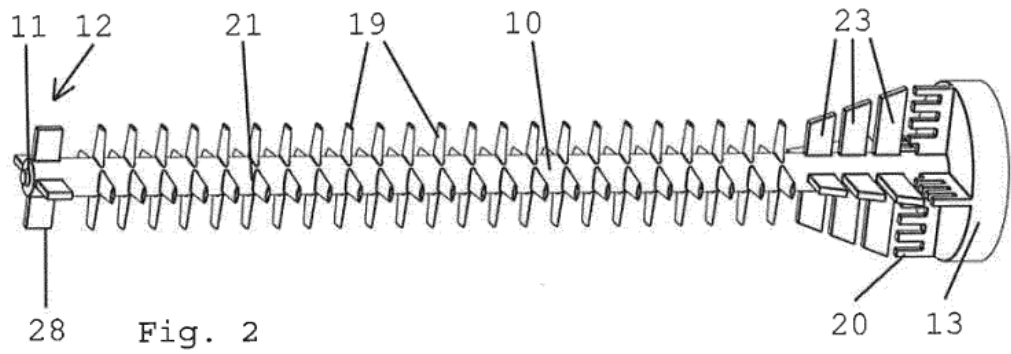
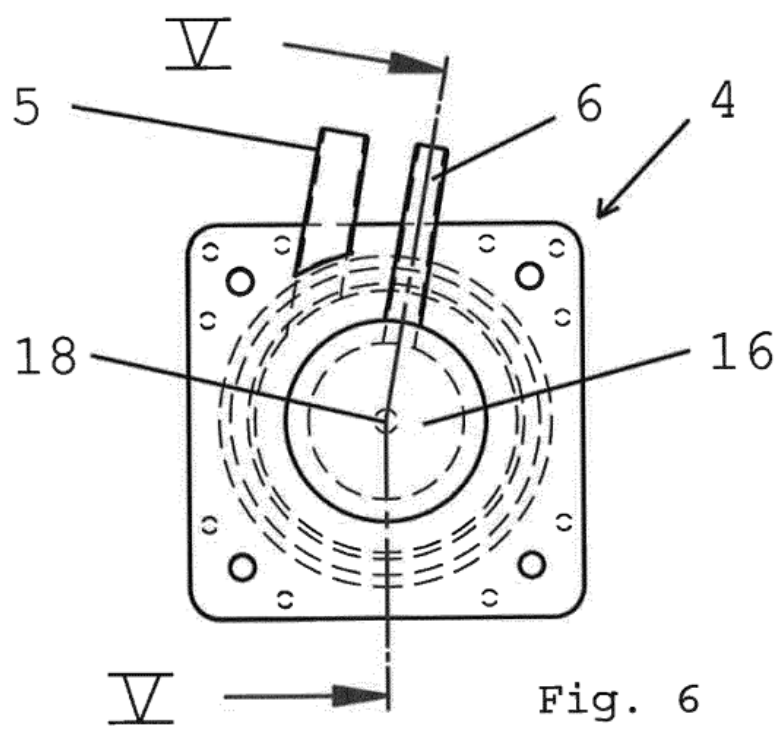
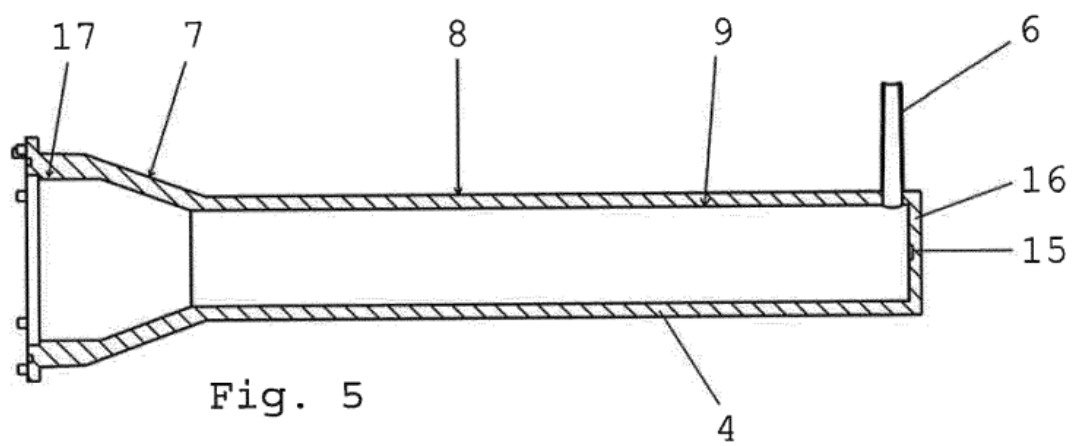
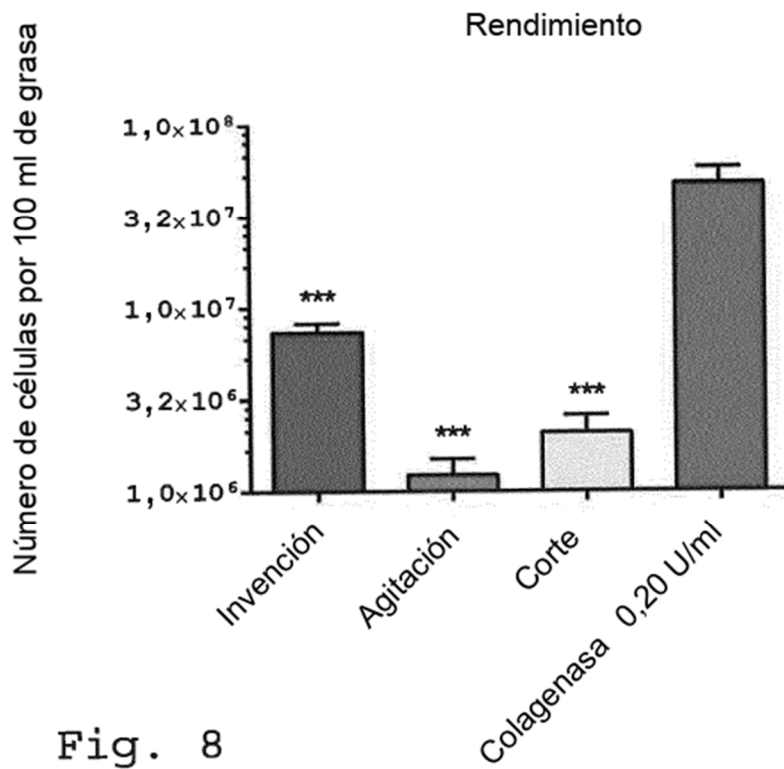
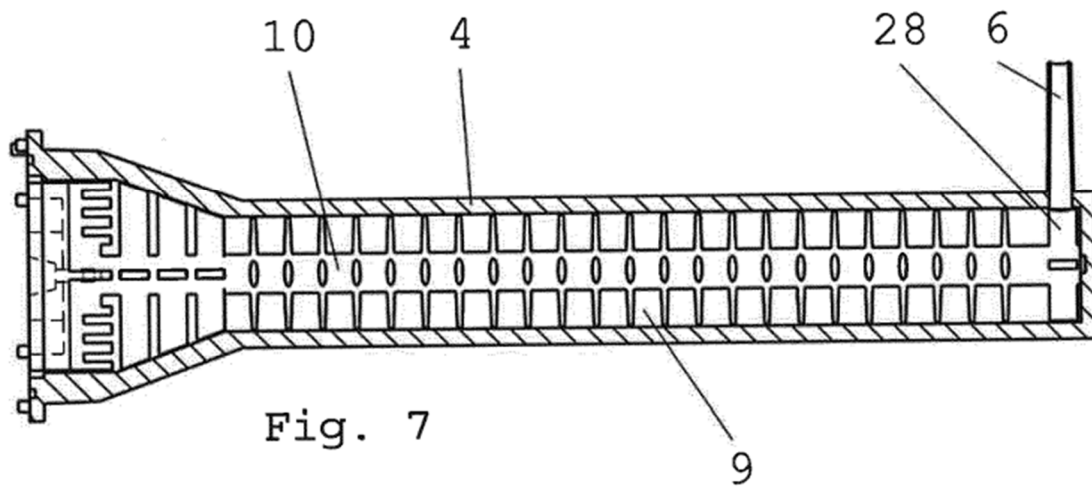


Fig. 1







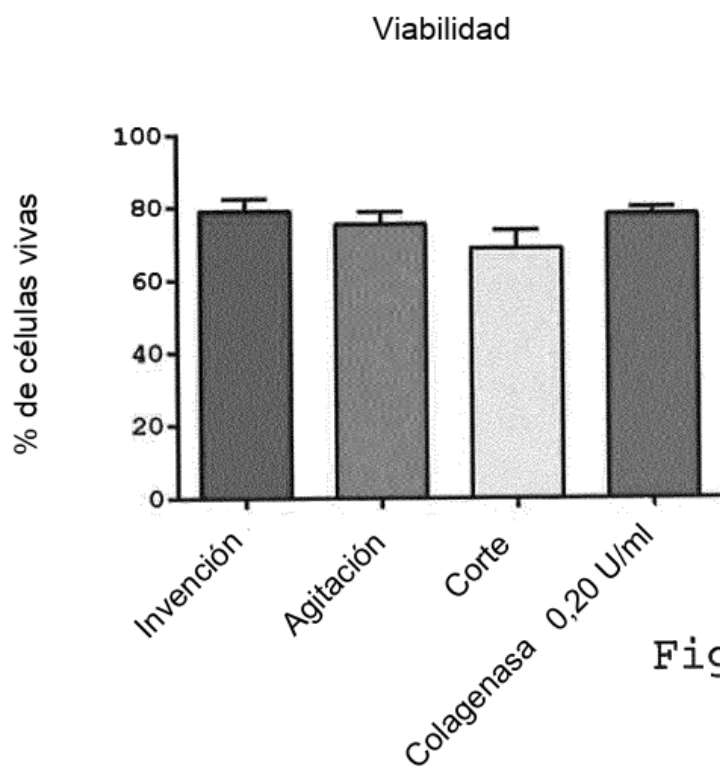


Fig. 9

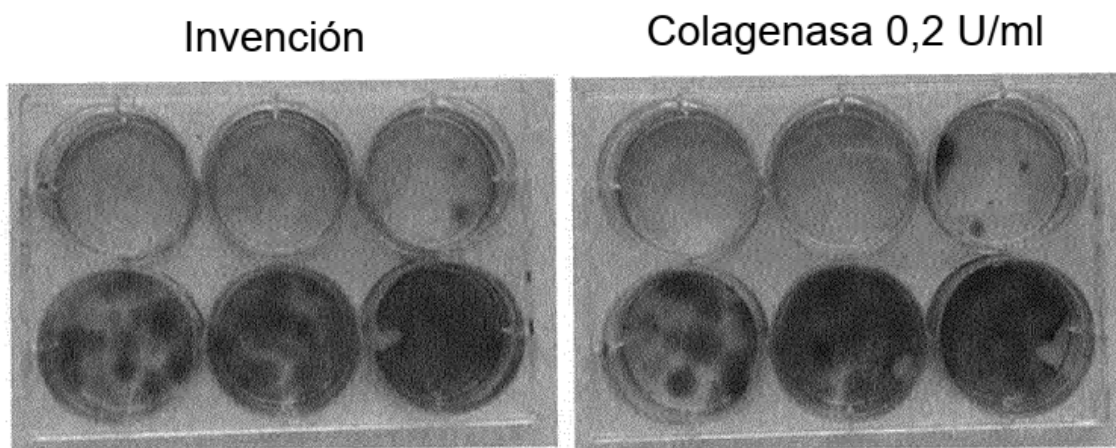
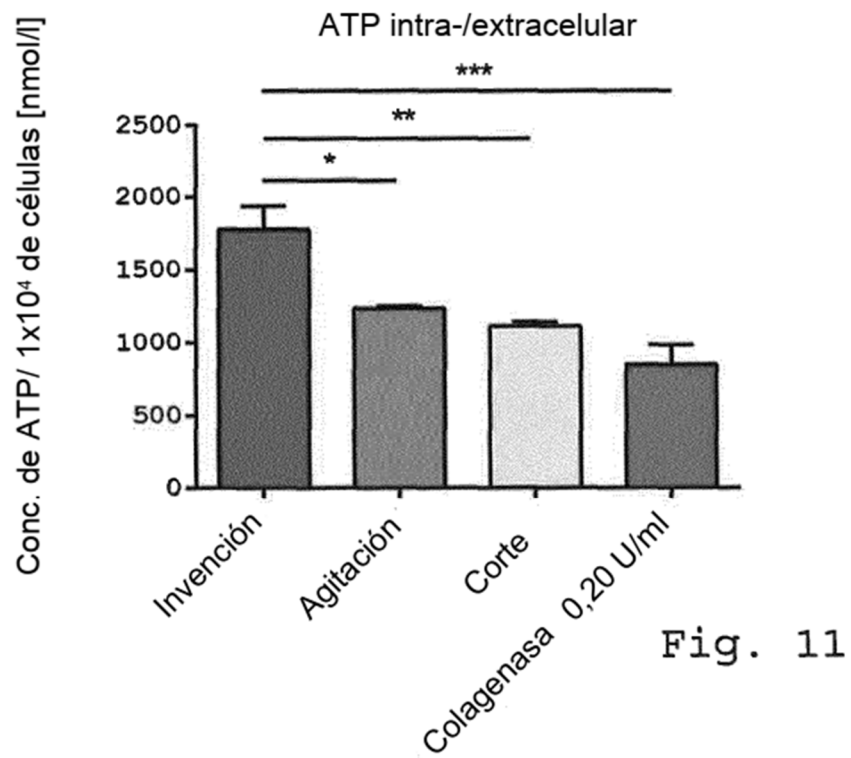
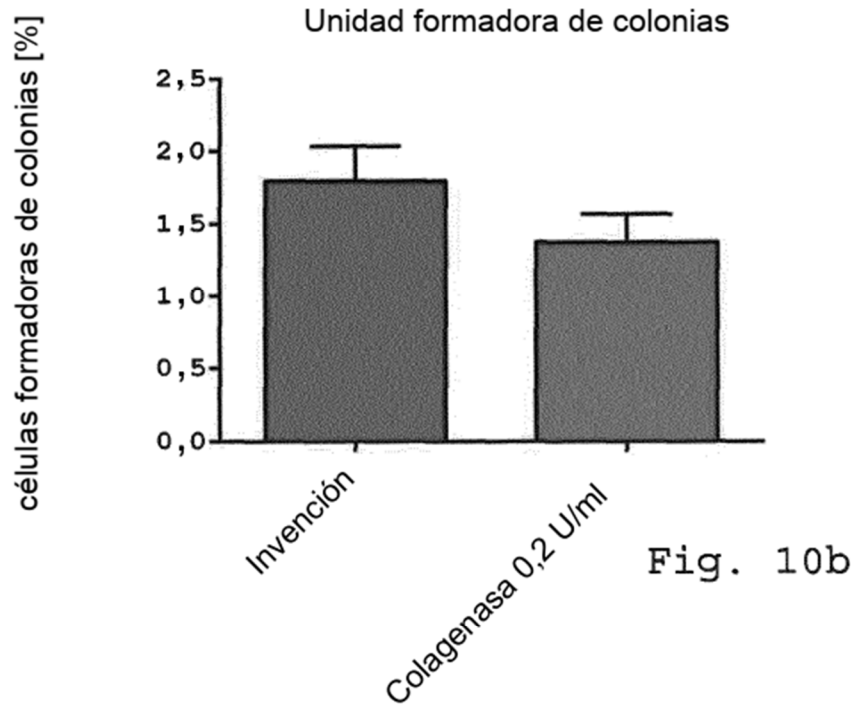


Fig. 10a



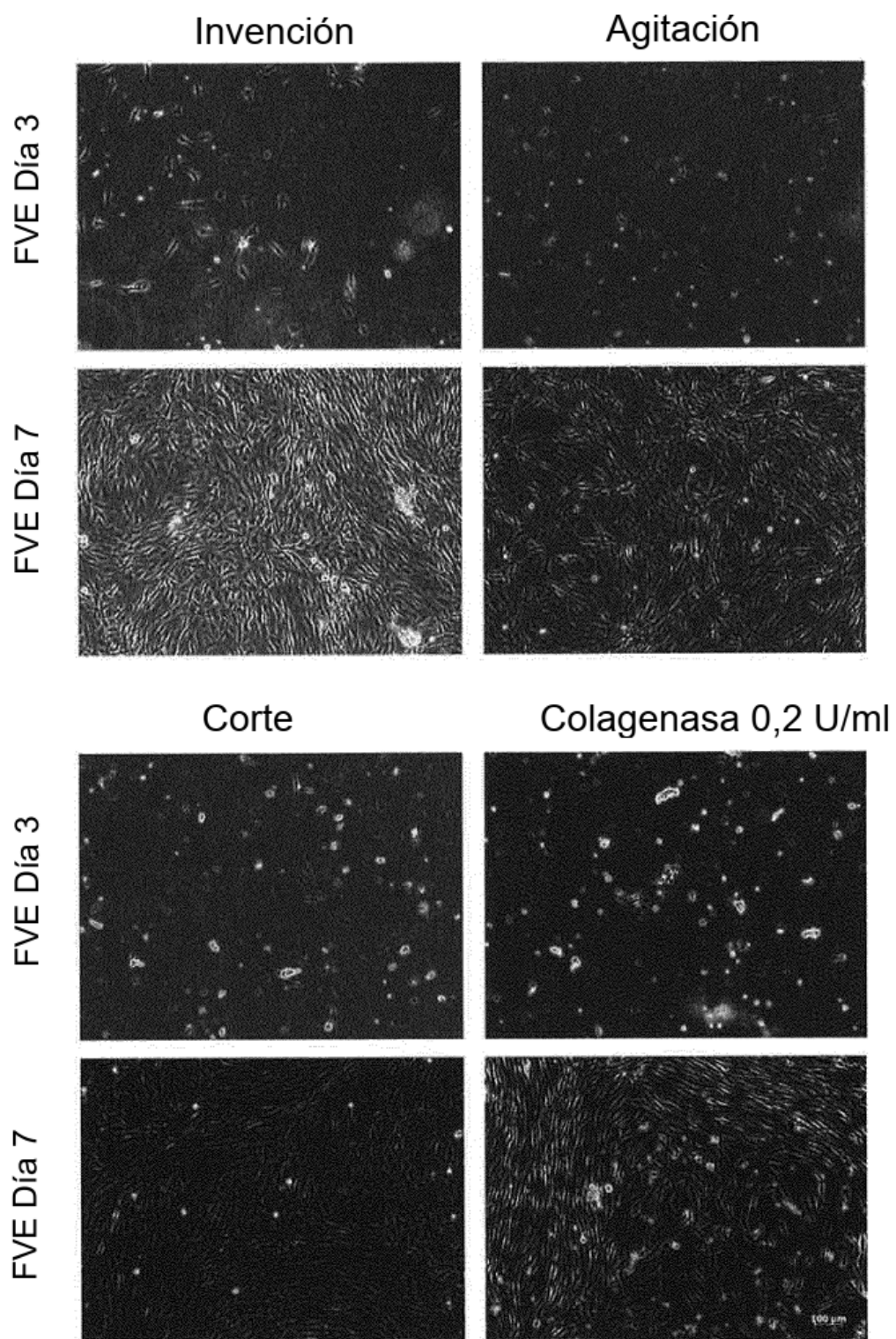


Fig. 12a

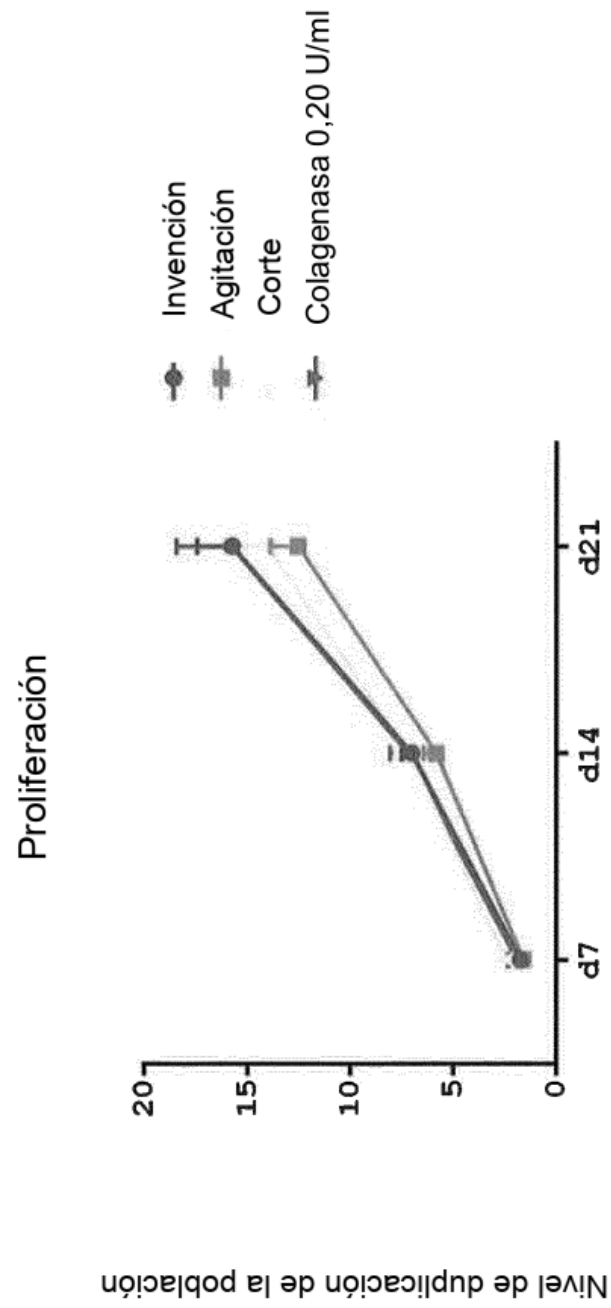
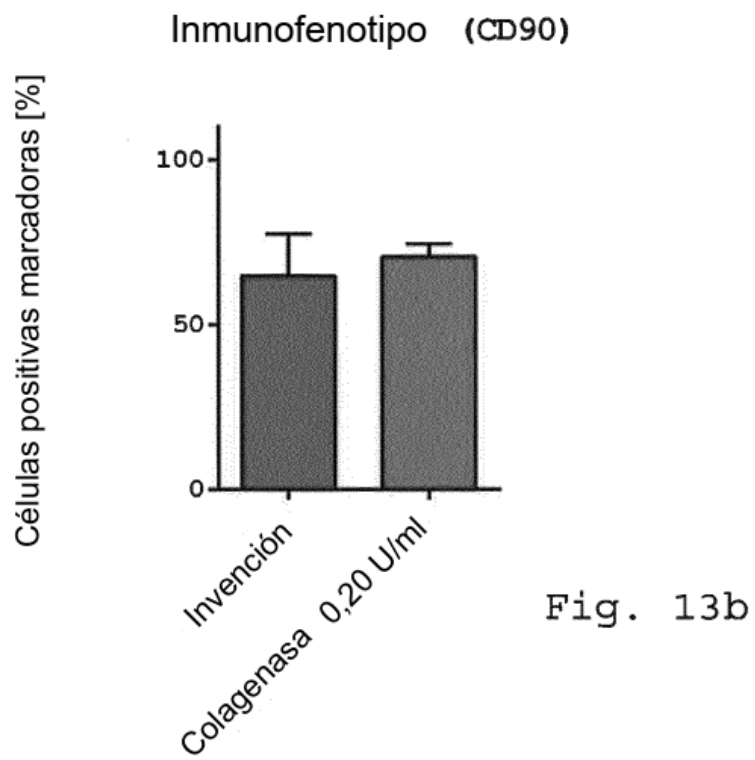
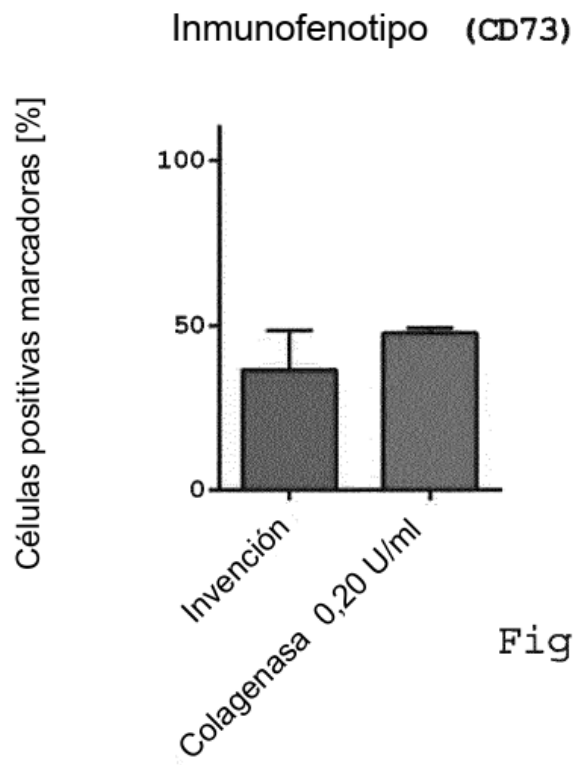
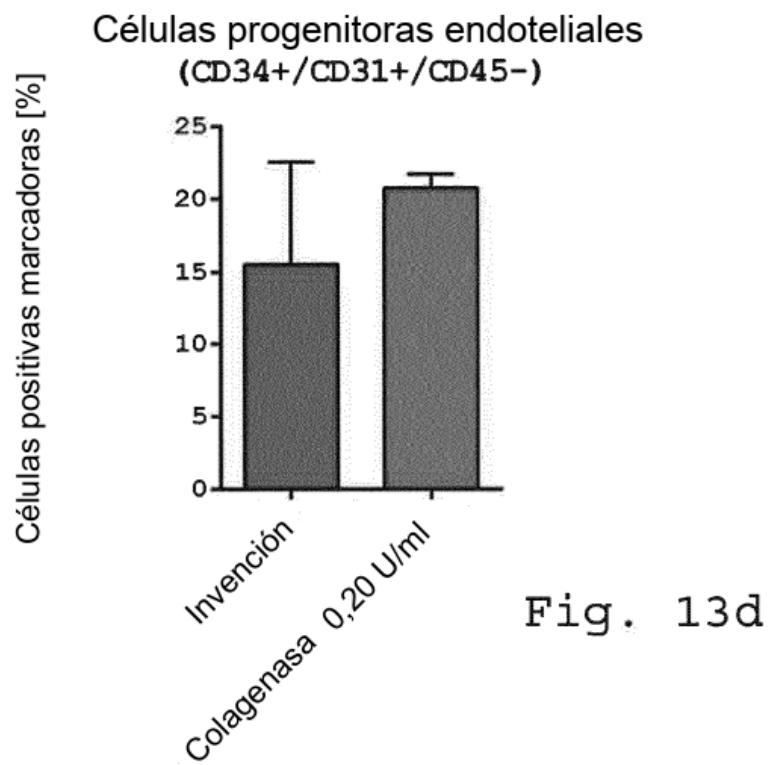
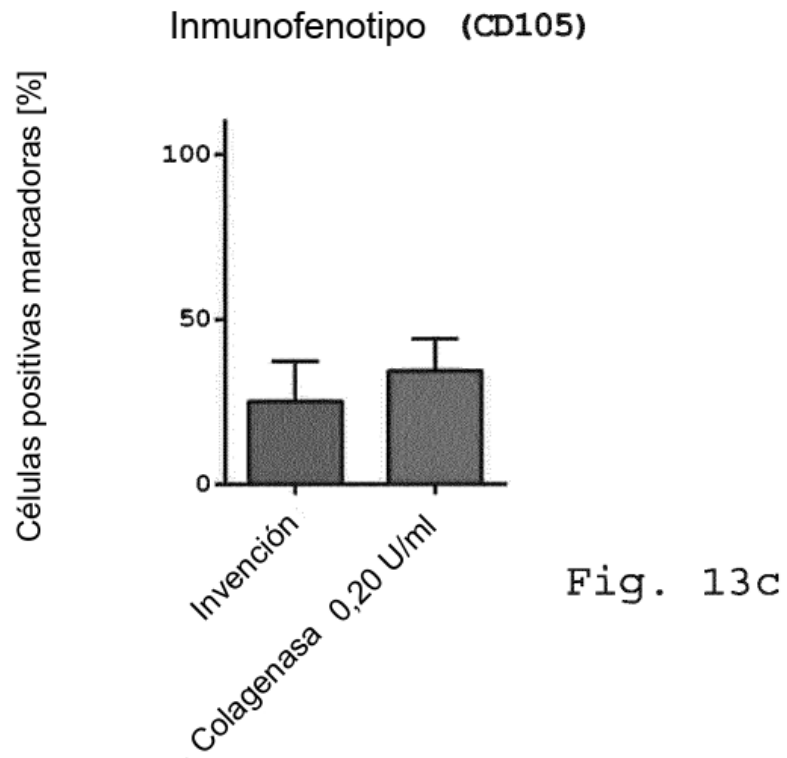
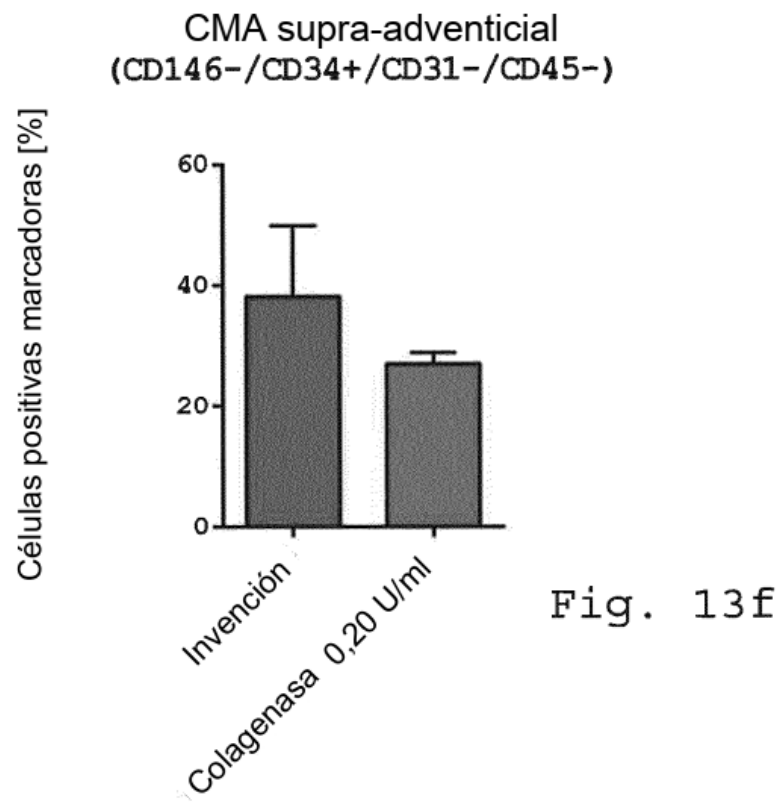
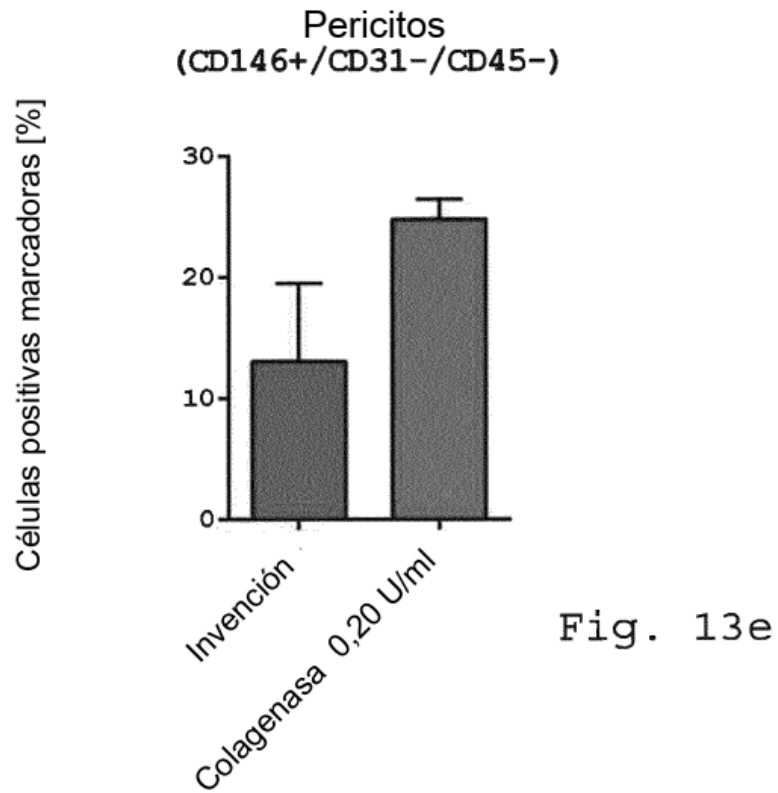


Fig. 12b







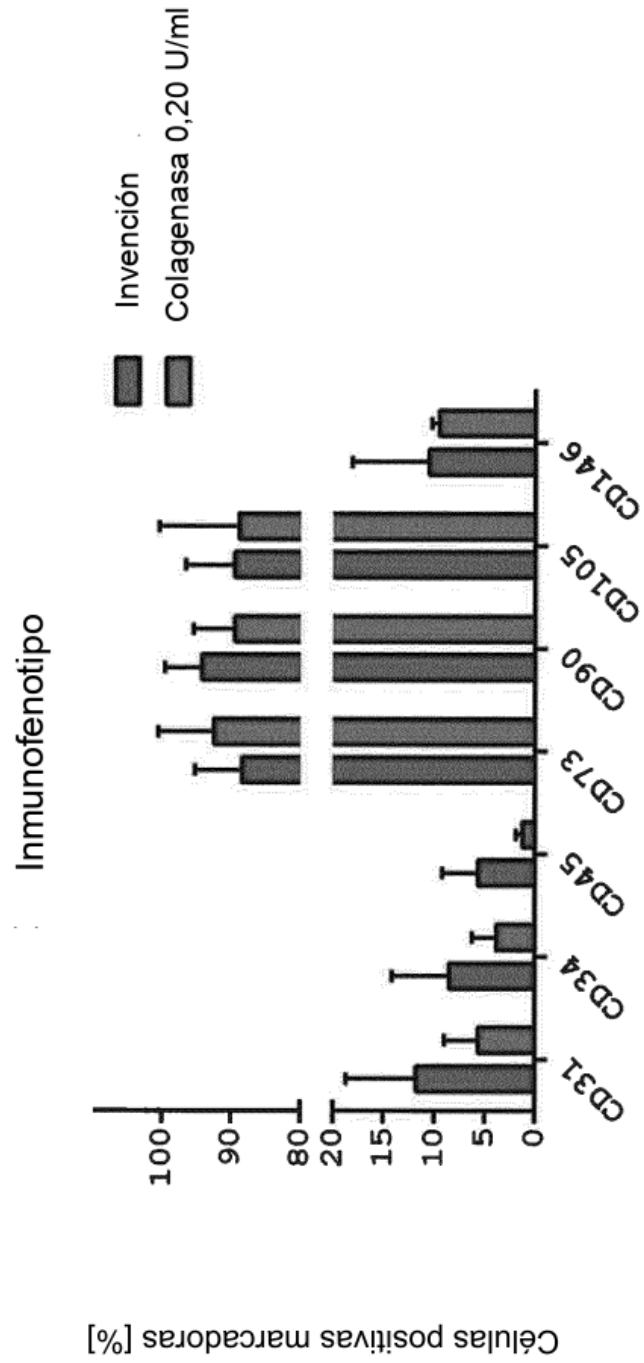


Fig. 14a

Células progenitoras endoteliales
(CD34+/CD31+/CD45-)

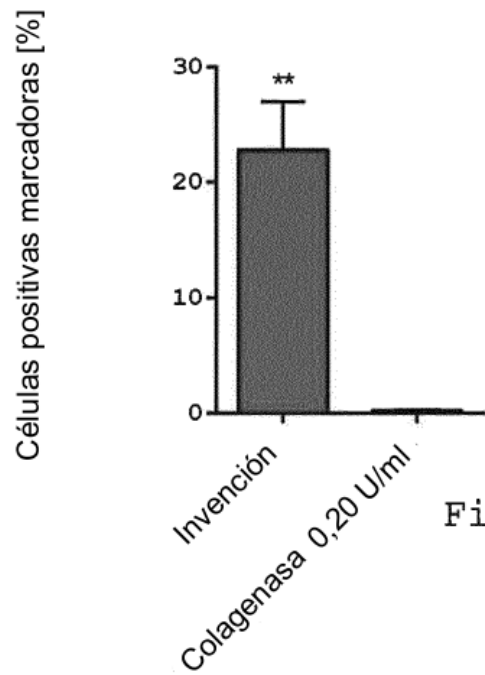


Fig. 14b

Pericitos
(CD146+/CD31-/CD45-)

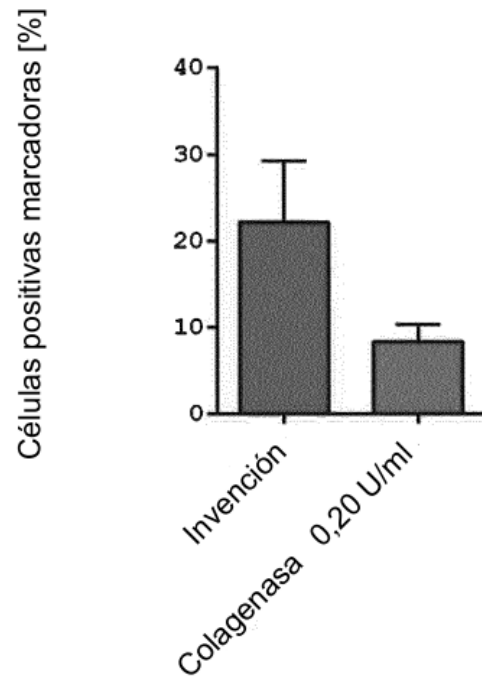


Fig. 14c

CMA supra-adventicial
(CD146-/CD34+/CD31-/CD45-)

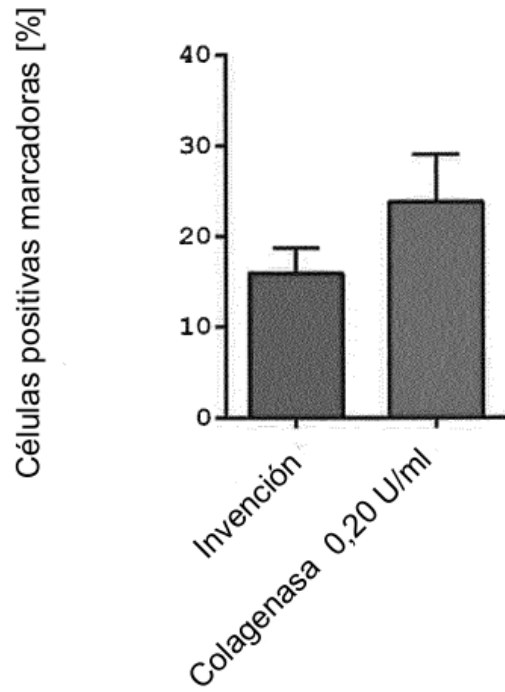


Fig. 14d

Citotoxicidad

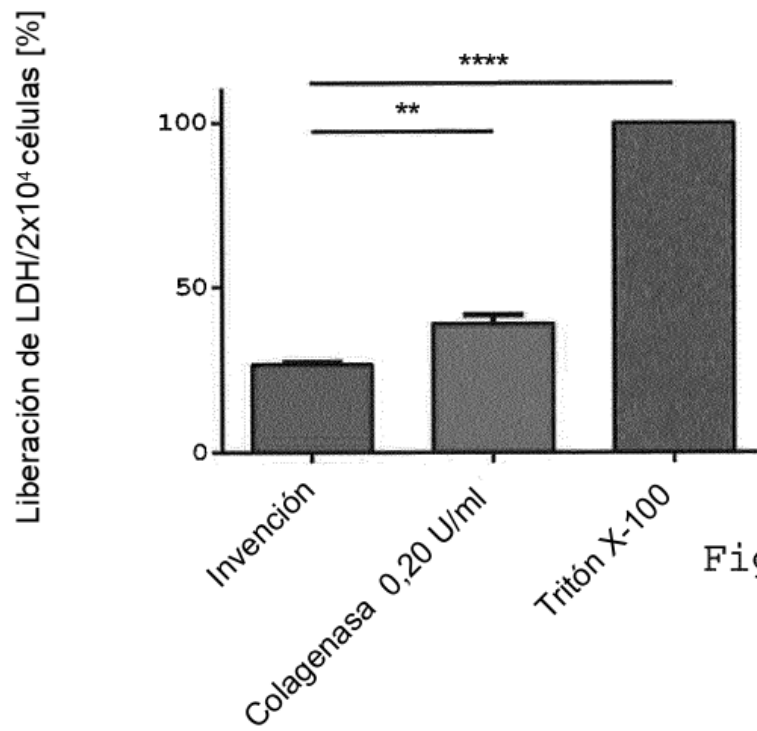


Fig. 15

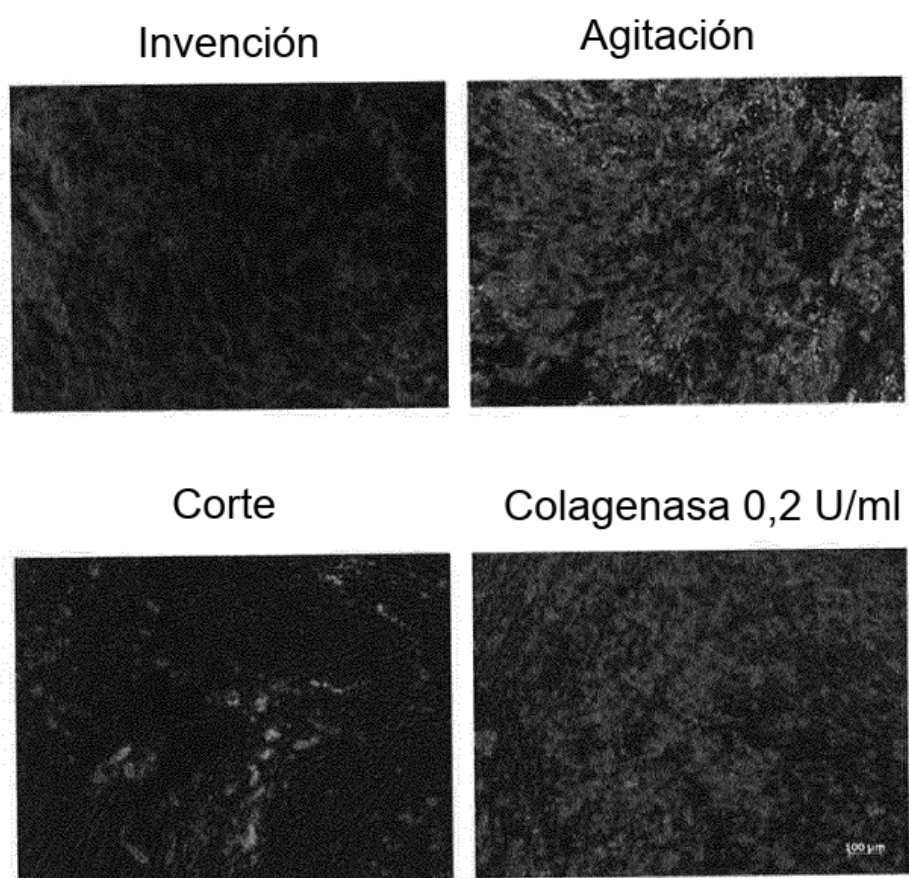
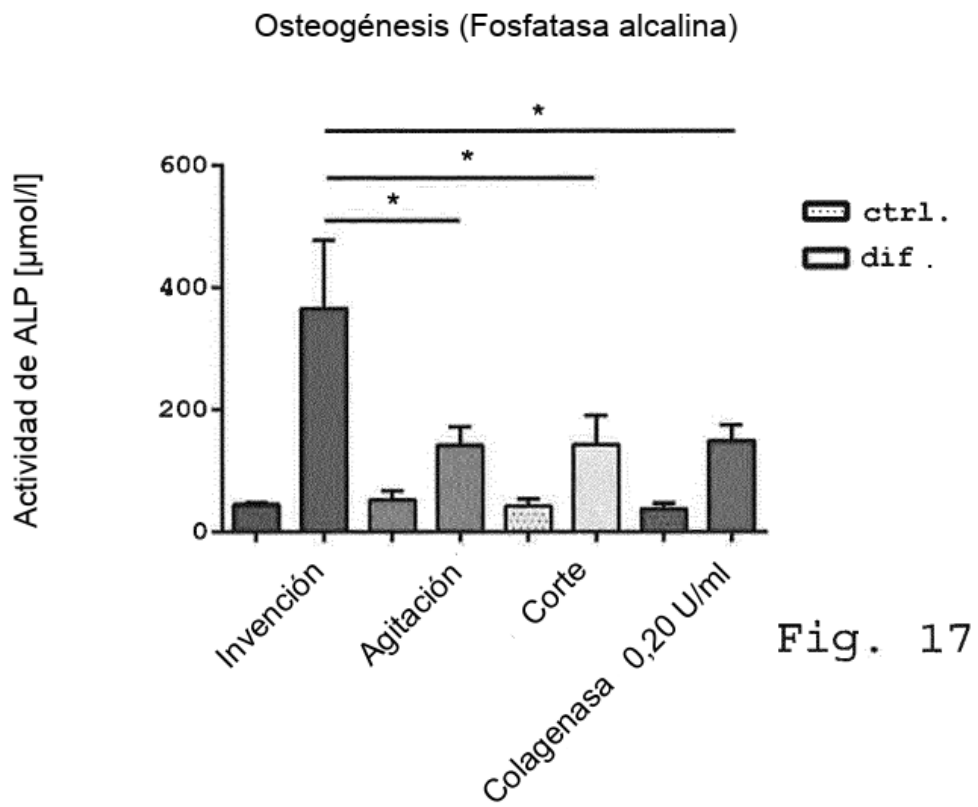
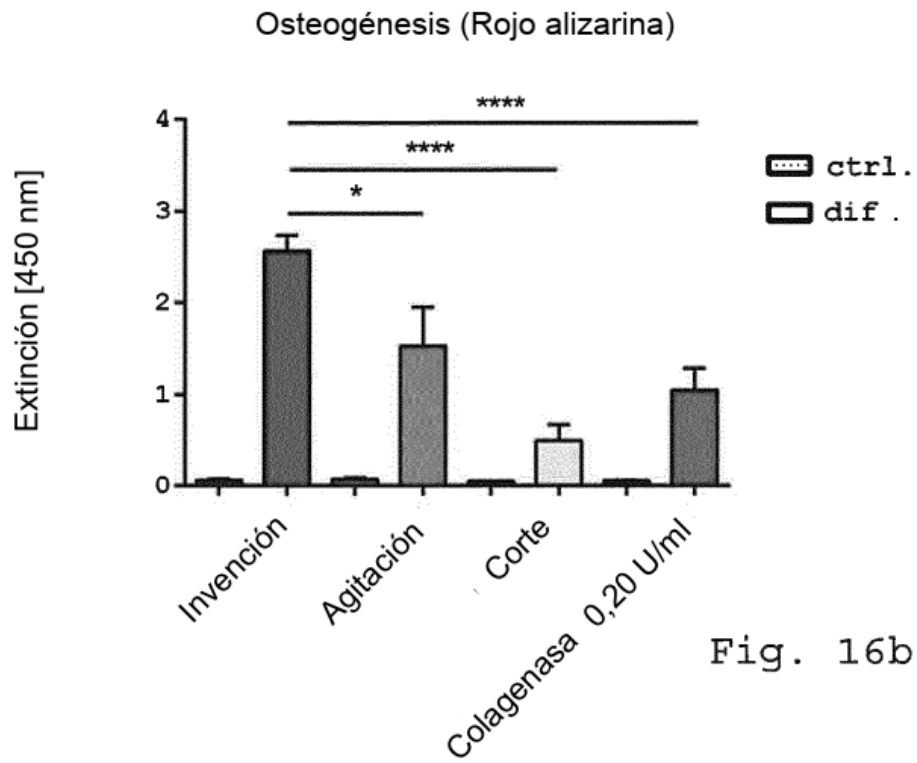


Fig. 16a



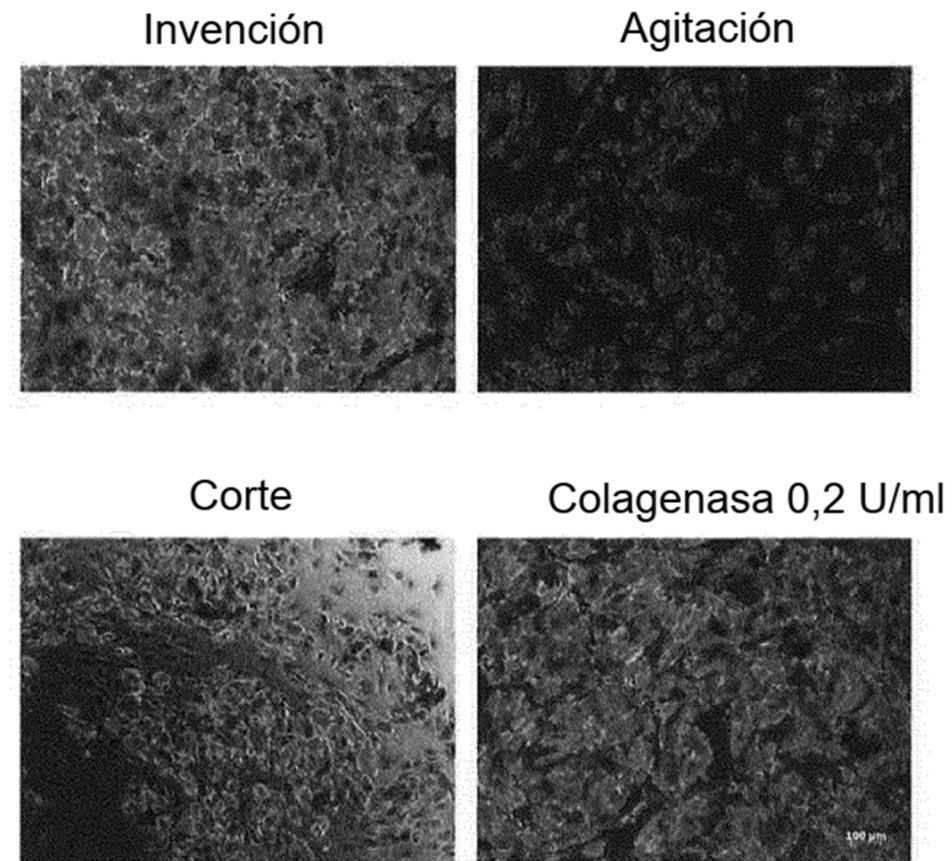
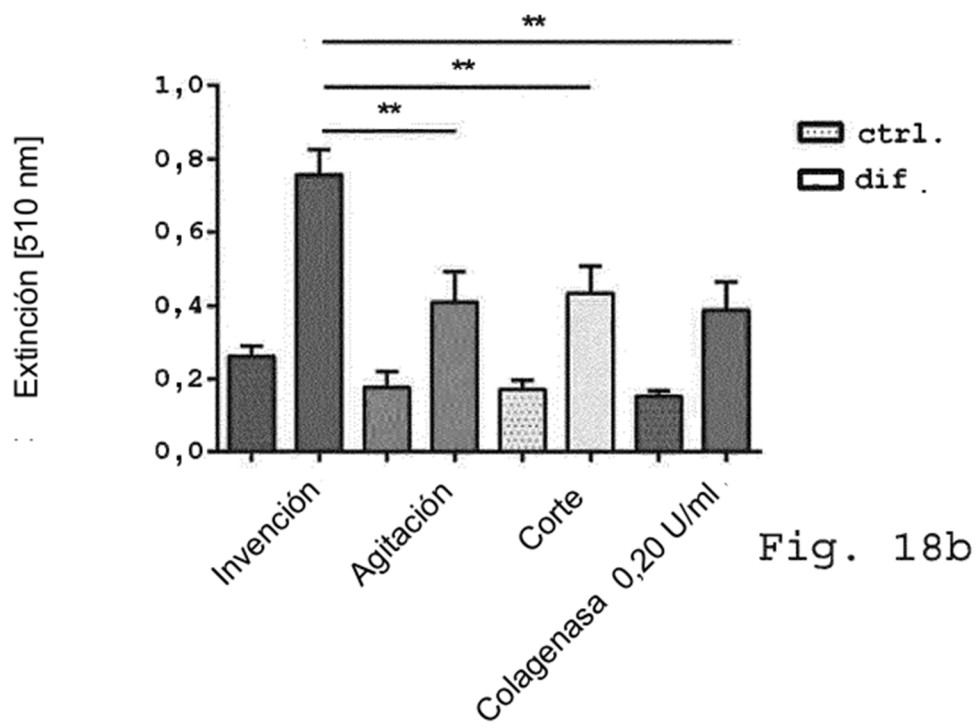


Fig. 18a

Adipogénesis (Rojo aceite O)



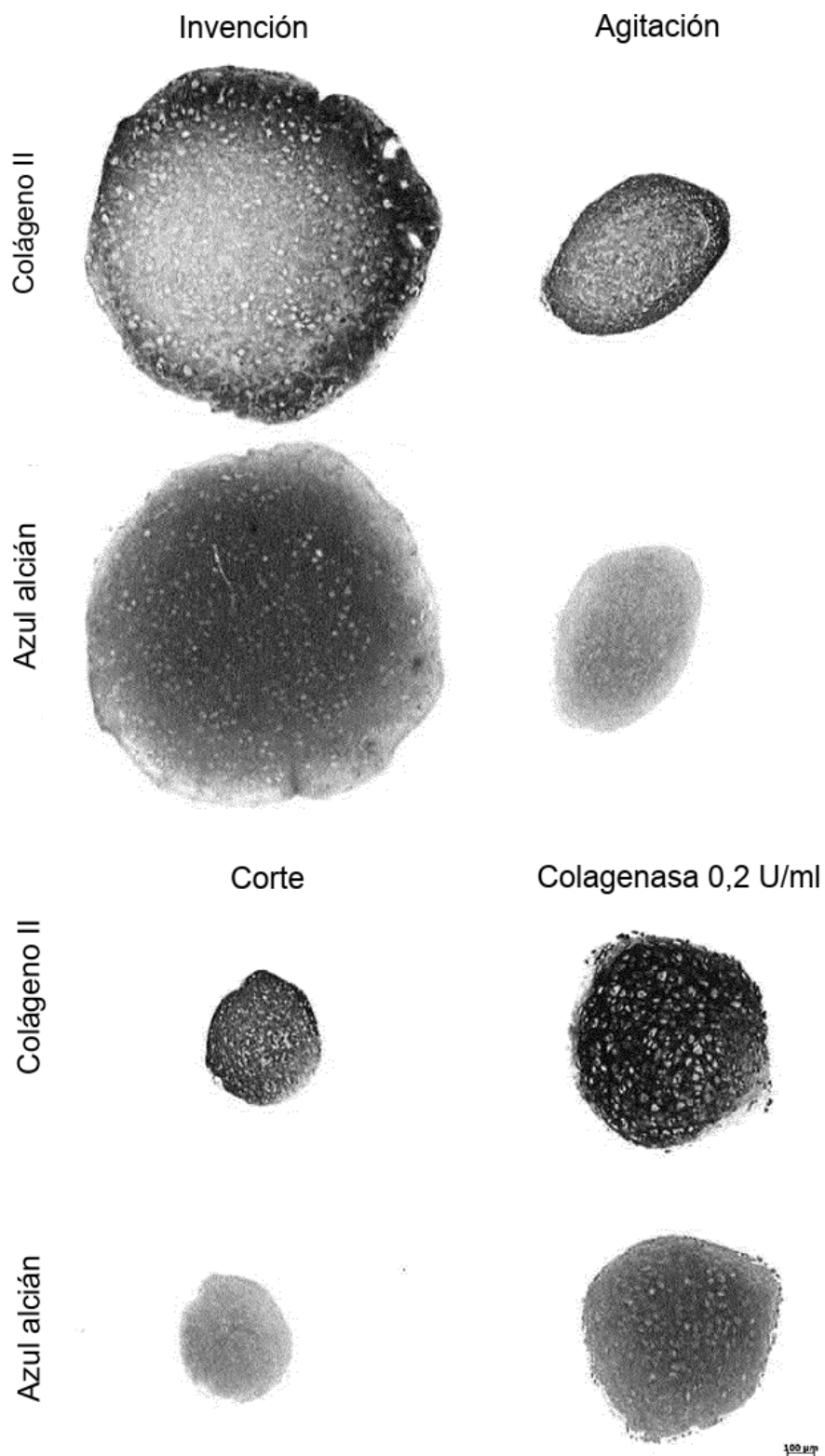


Fig. 19a

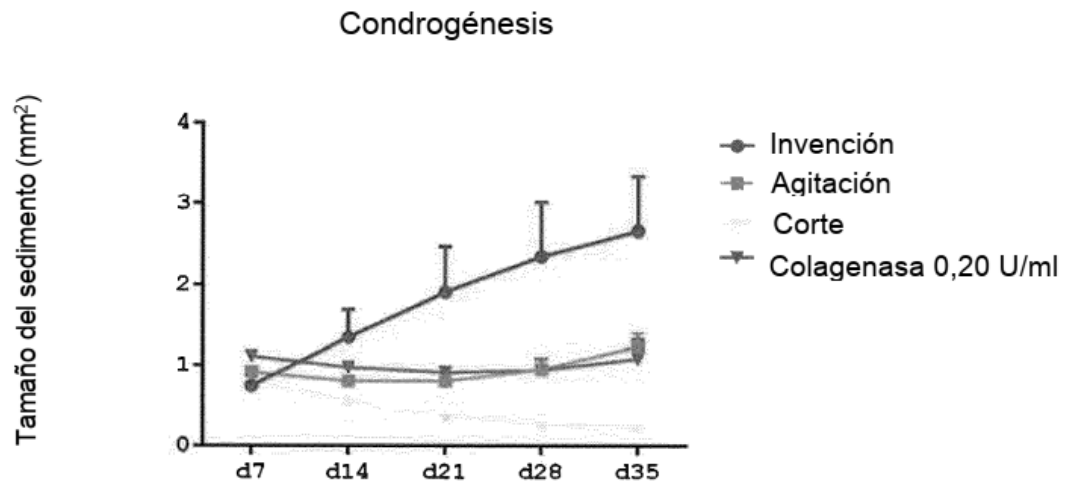


Fig. 19b

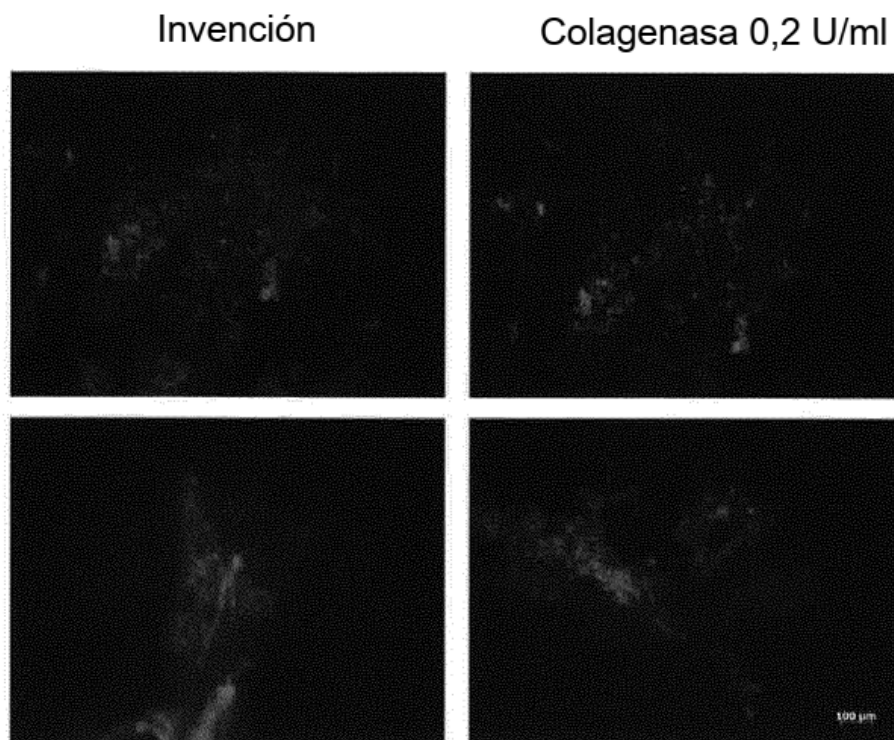


Fig. 20

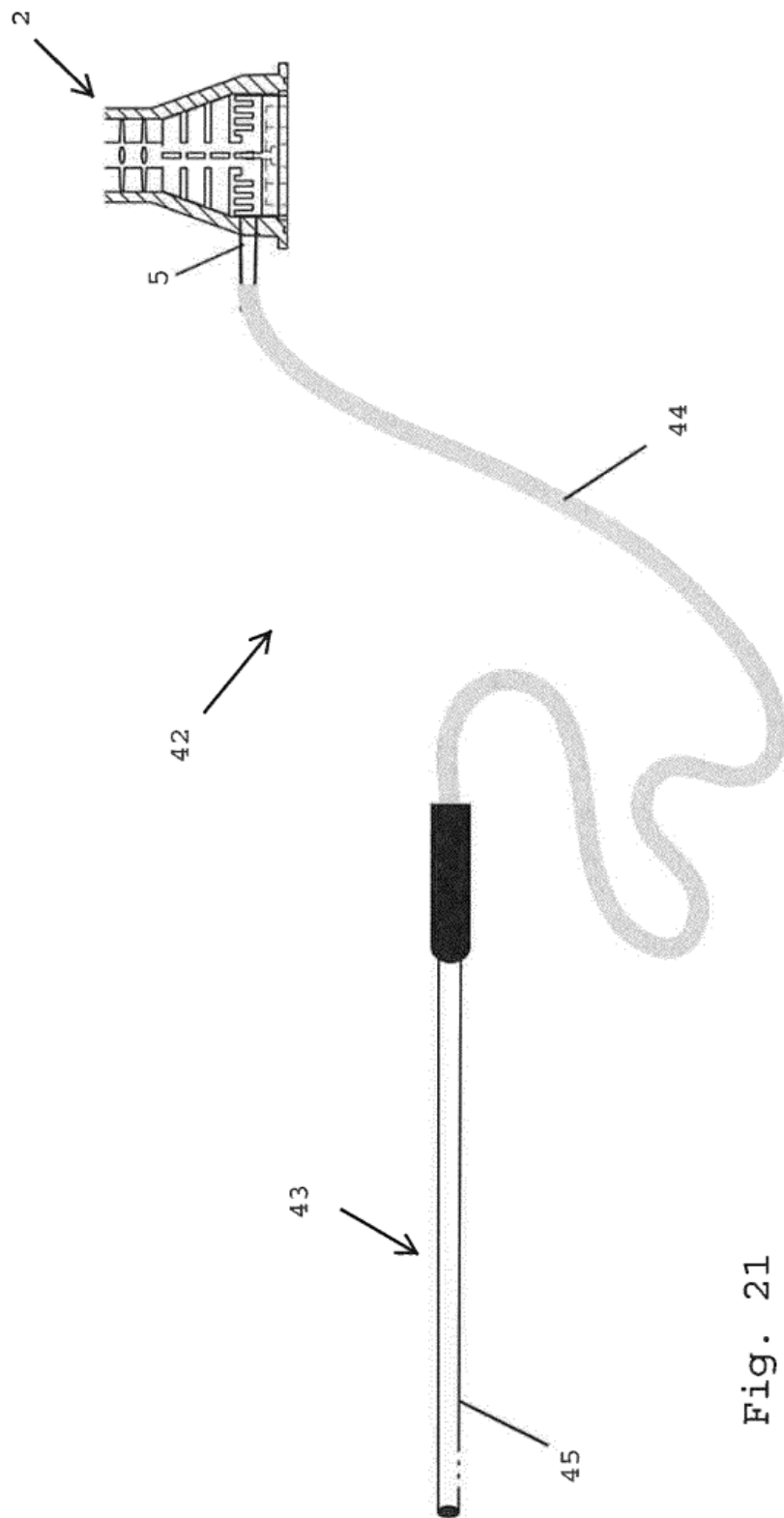


Fig. 21

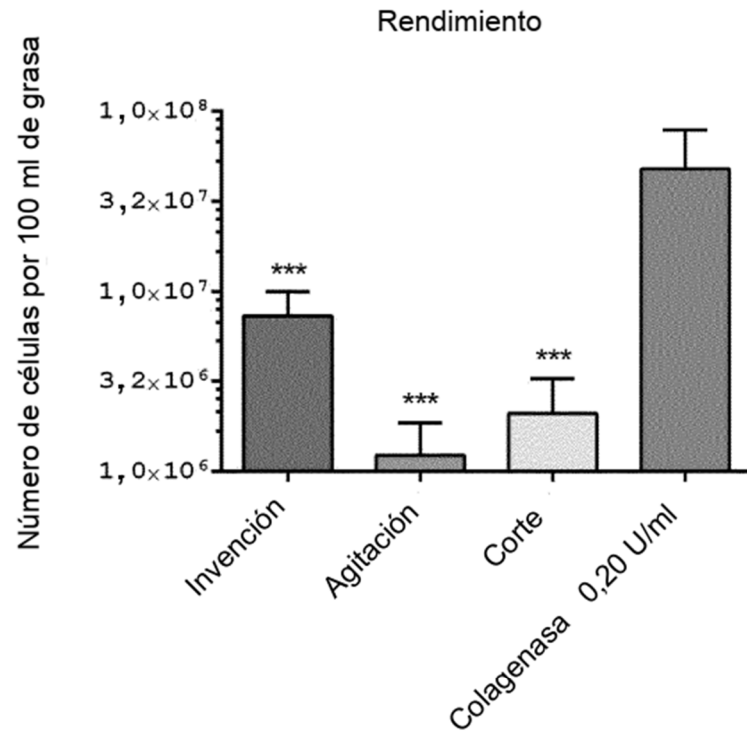


Fig. 22

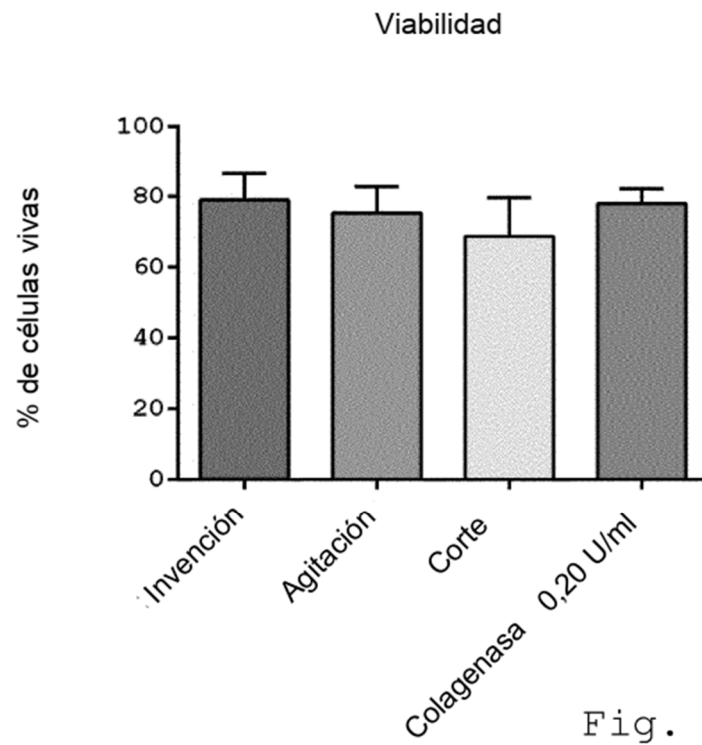


Fig. 23

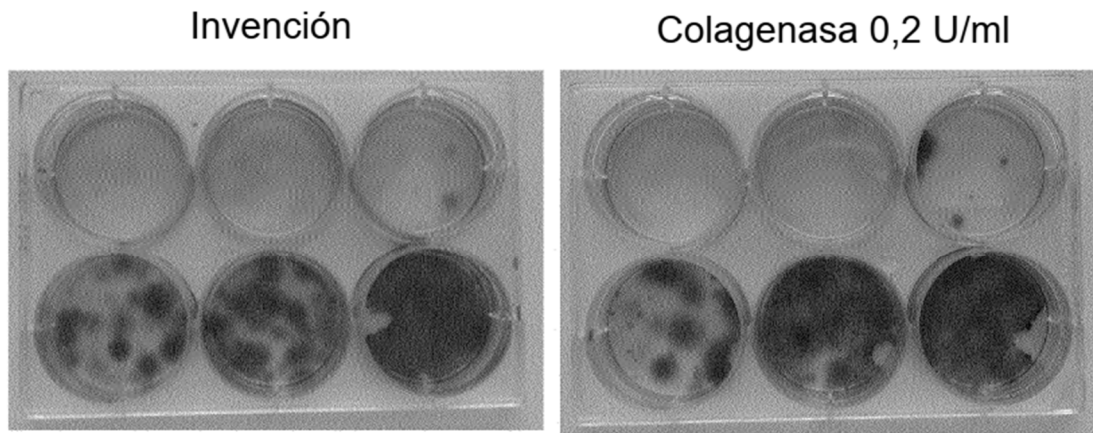


Fig. 24a

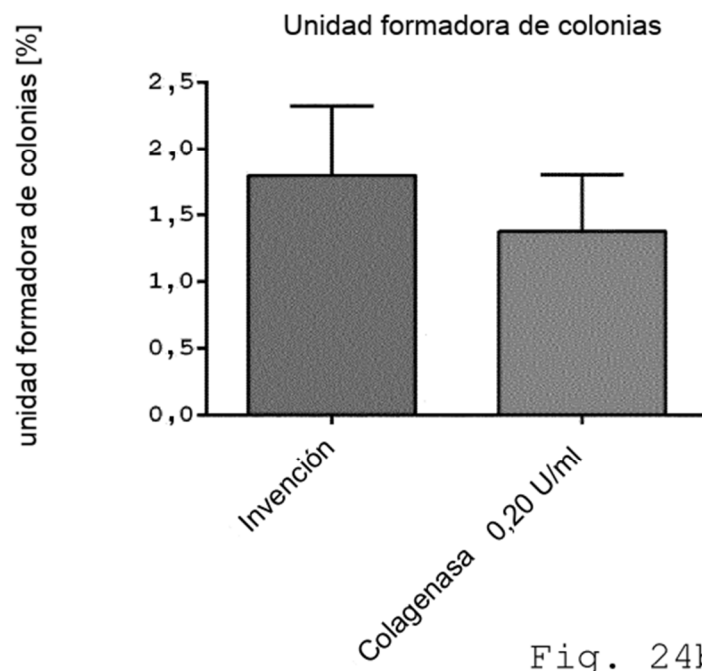


Fig. 24b

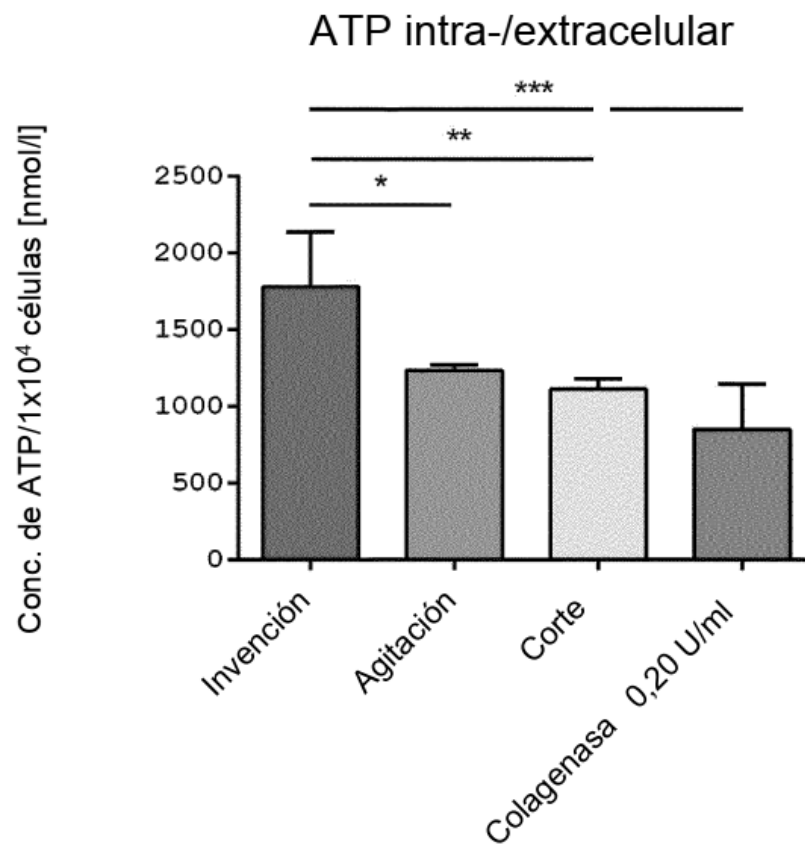


Fig. 25

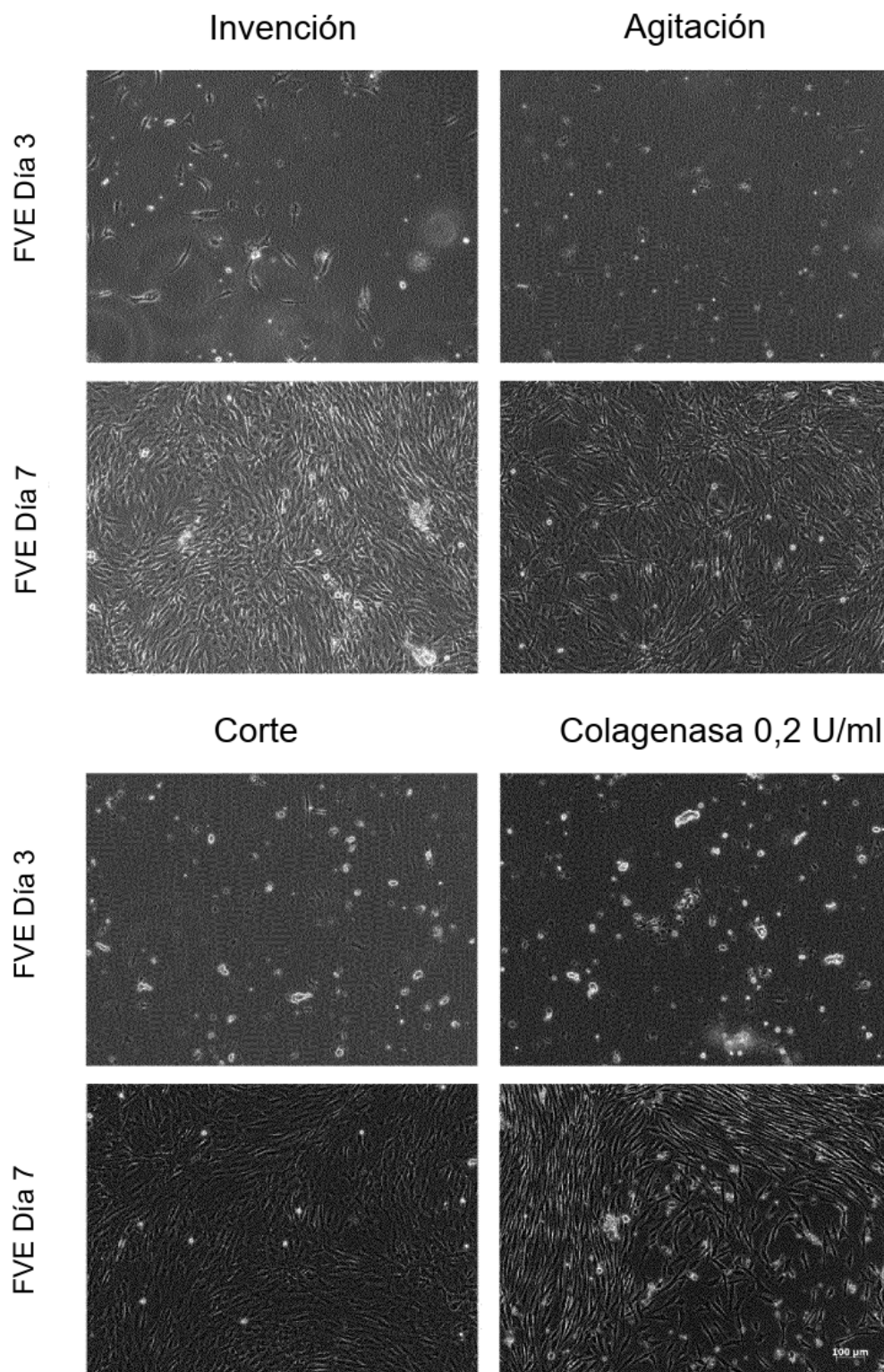


Fig. 26a

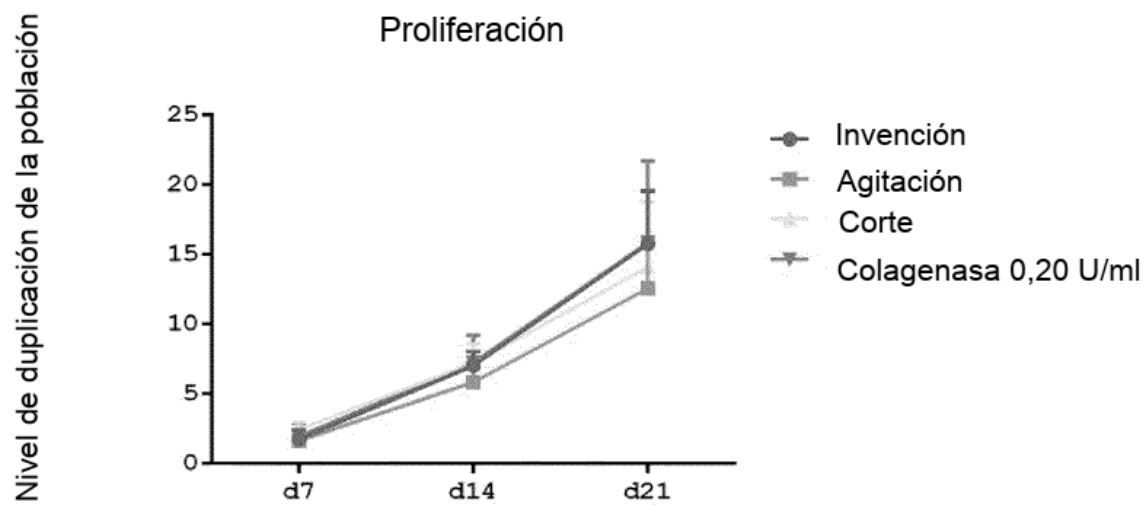
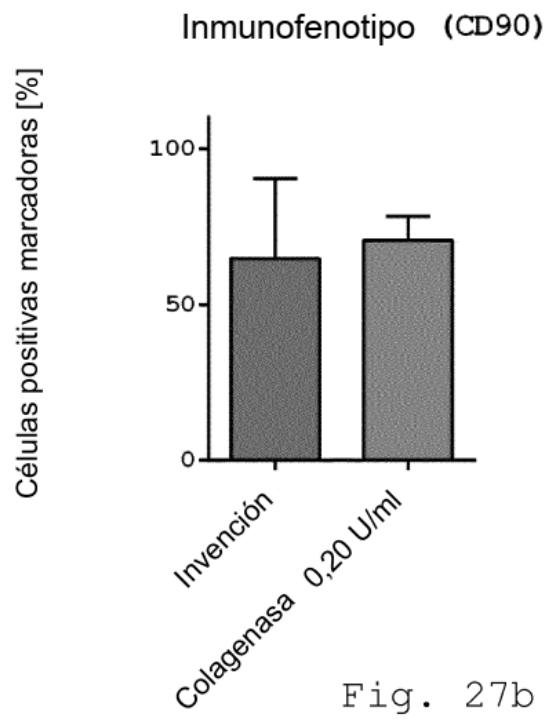
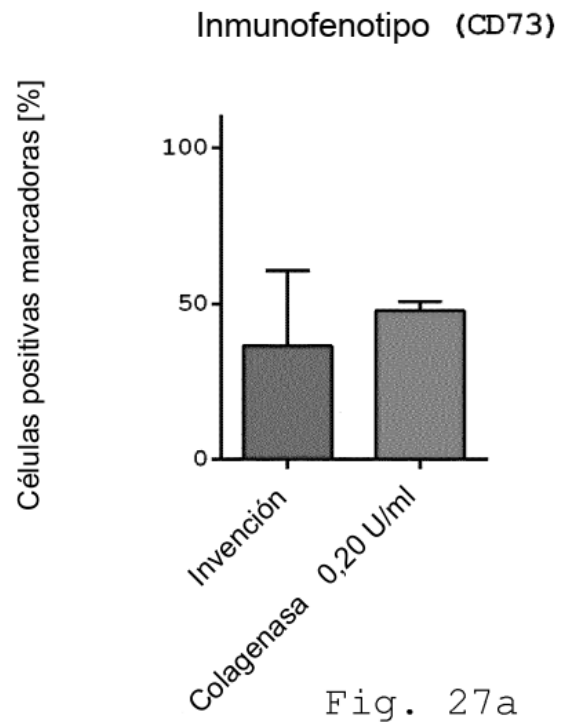
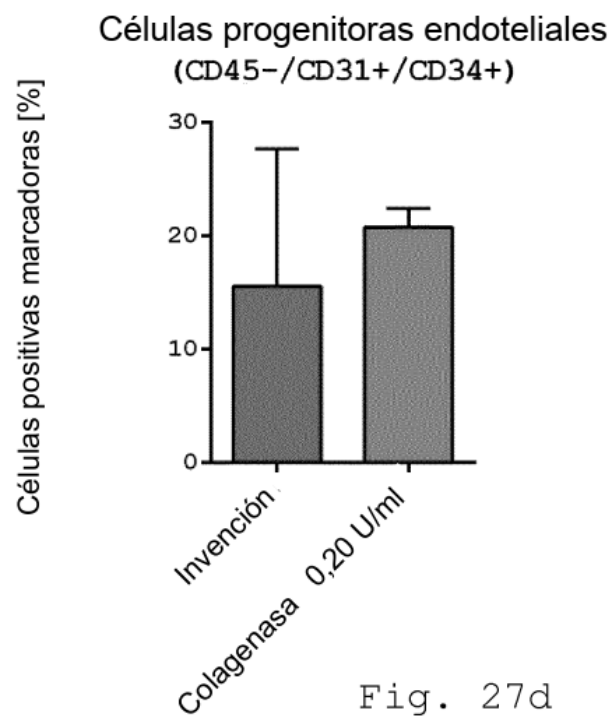
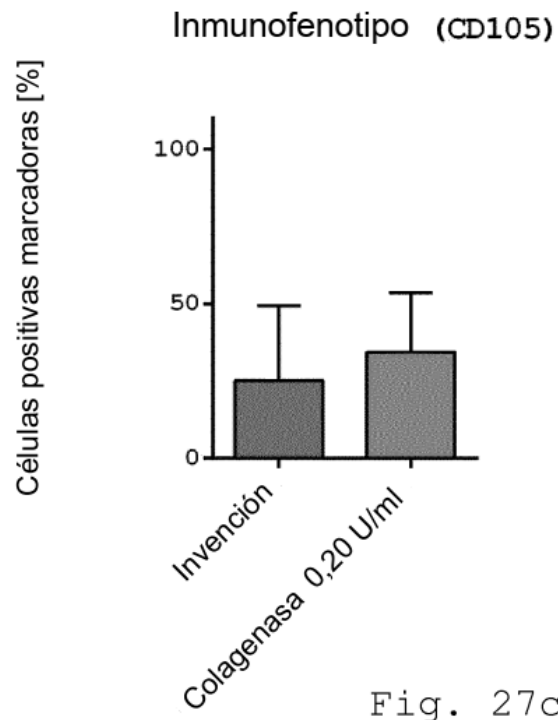
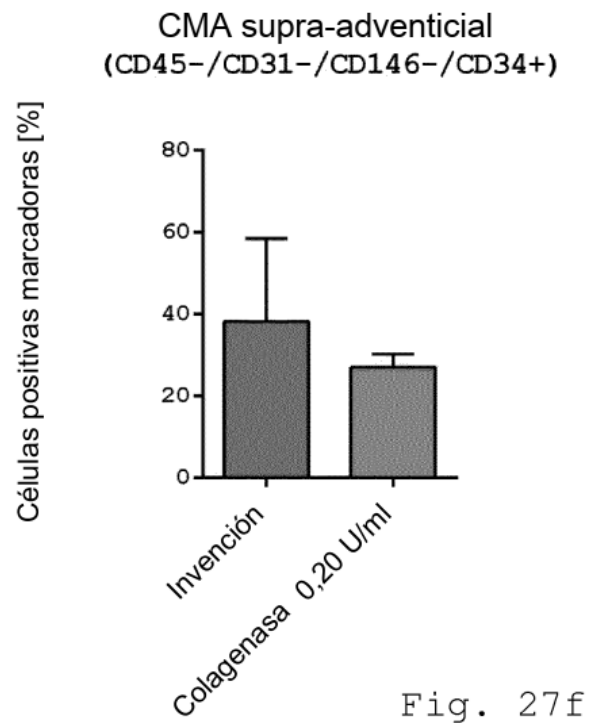
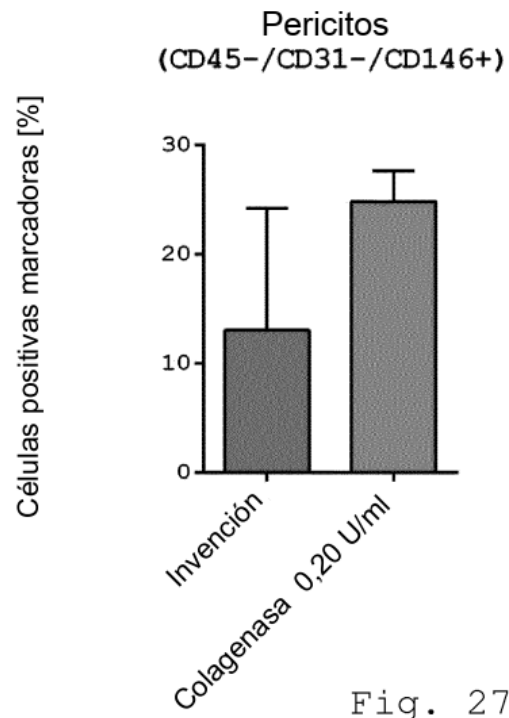


Fig. 26b







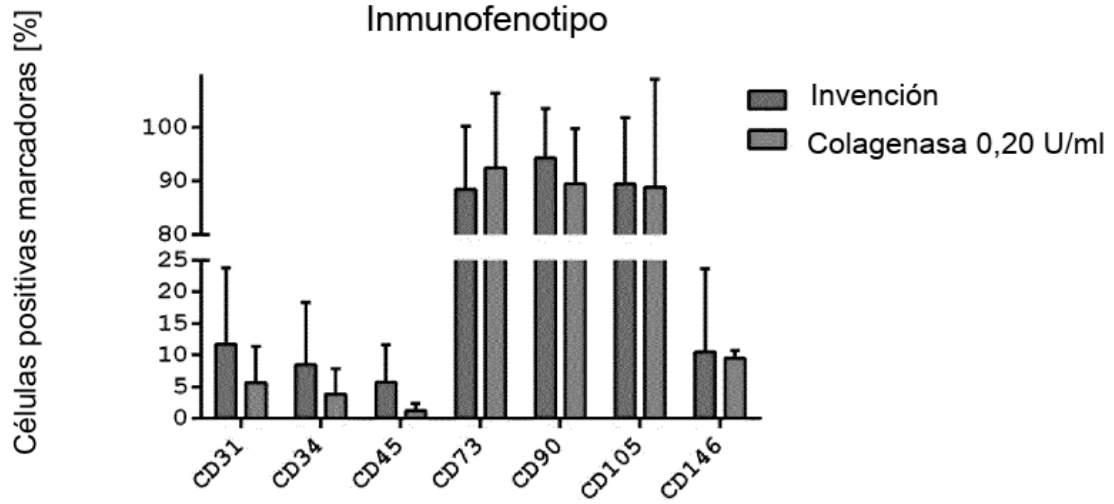


Fig. 28a

**Células progenitoras endoteliales
(CD45-/CD31+/CD34+)**

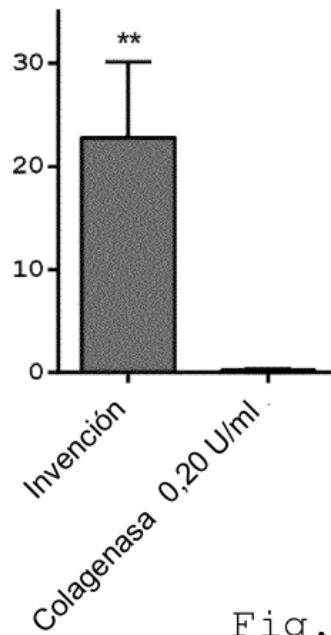
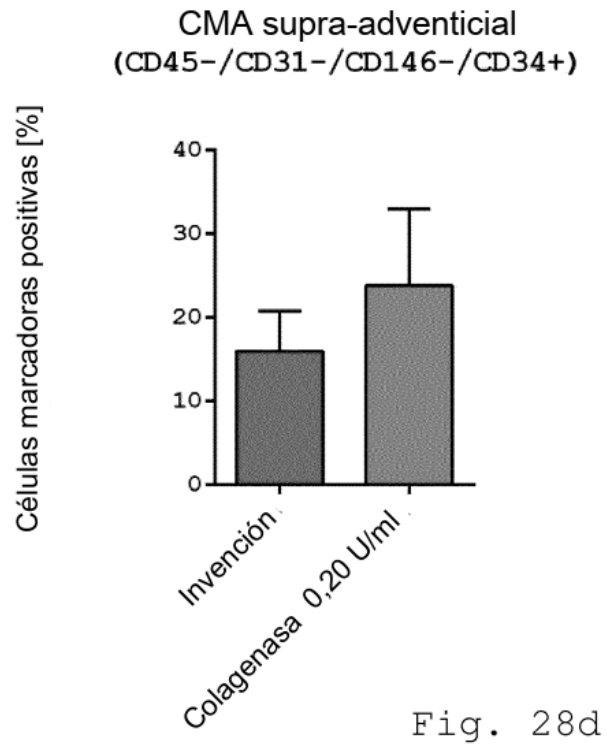
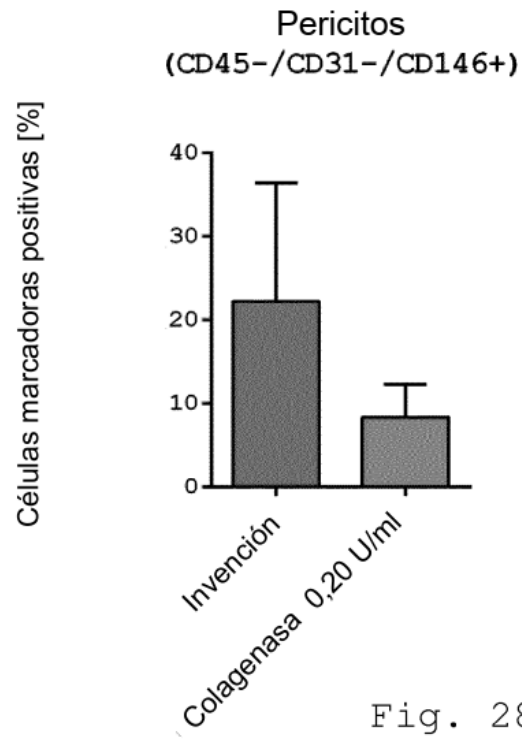


Fig. 28b



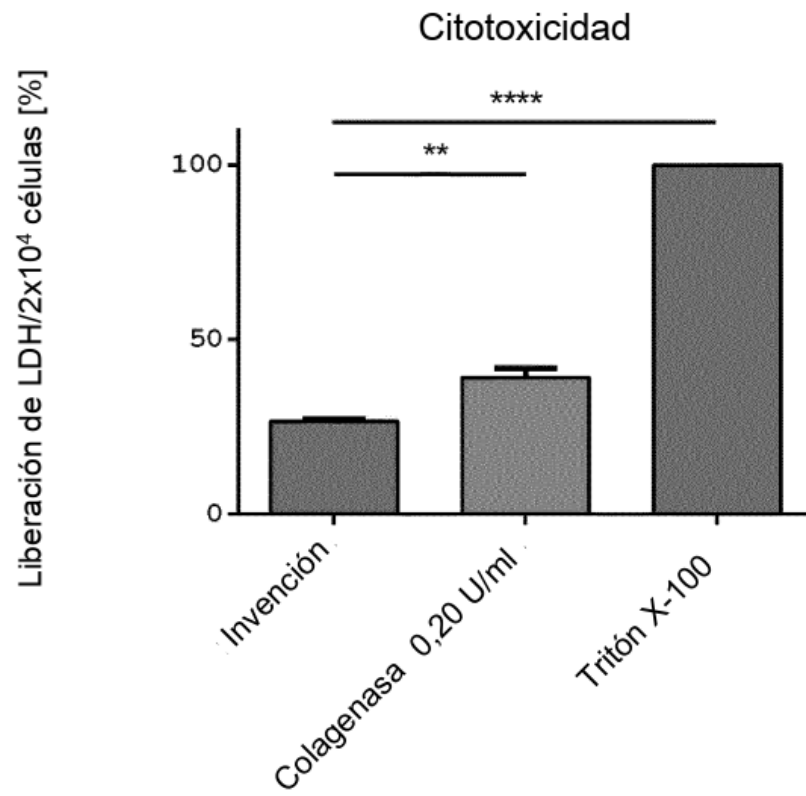


Fig. 29

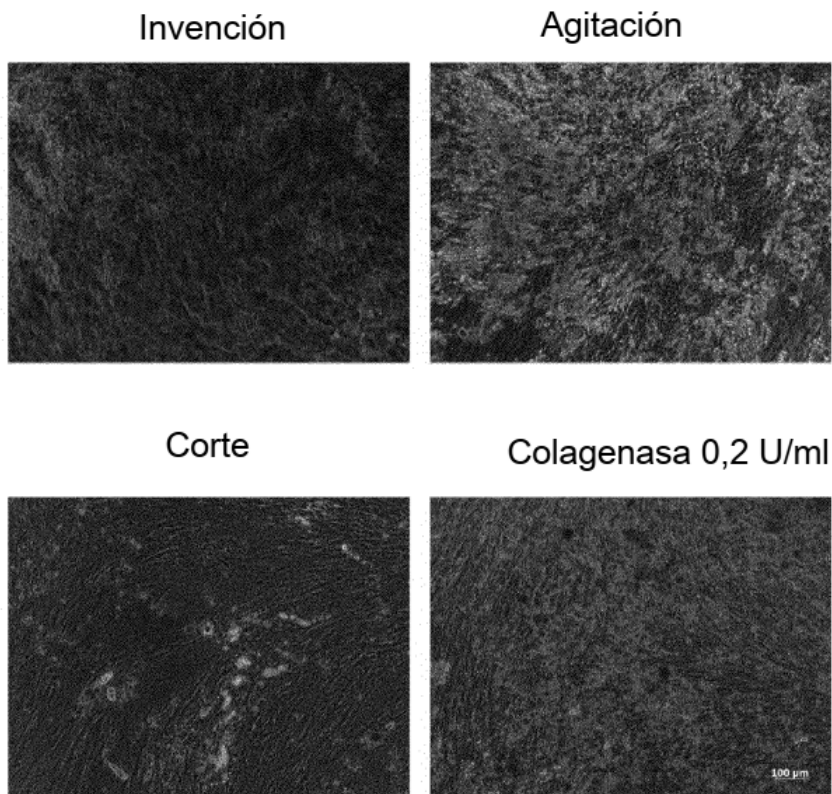


Fig. 30a

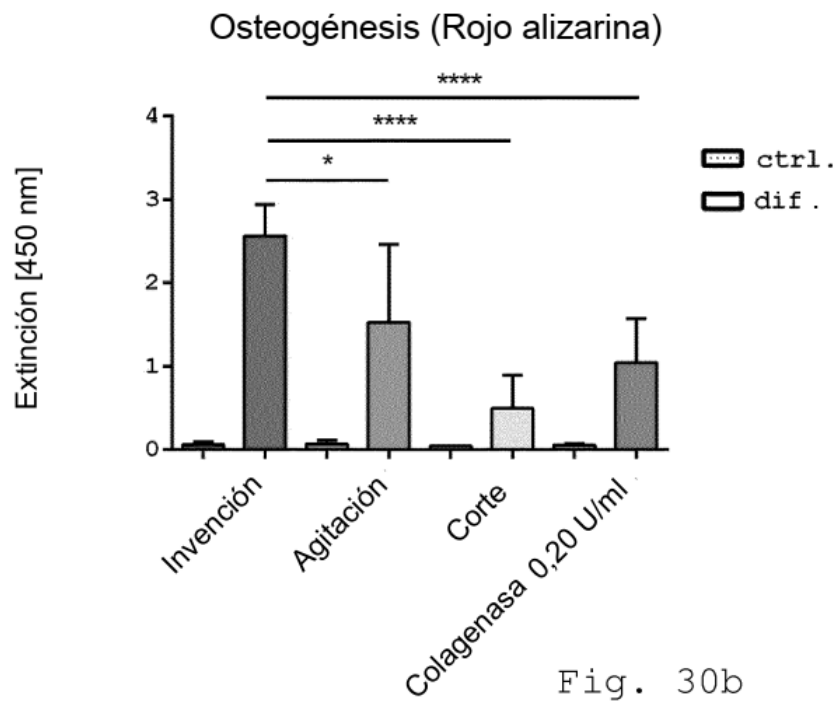


Fig. 30b

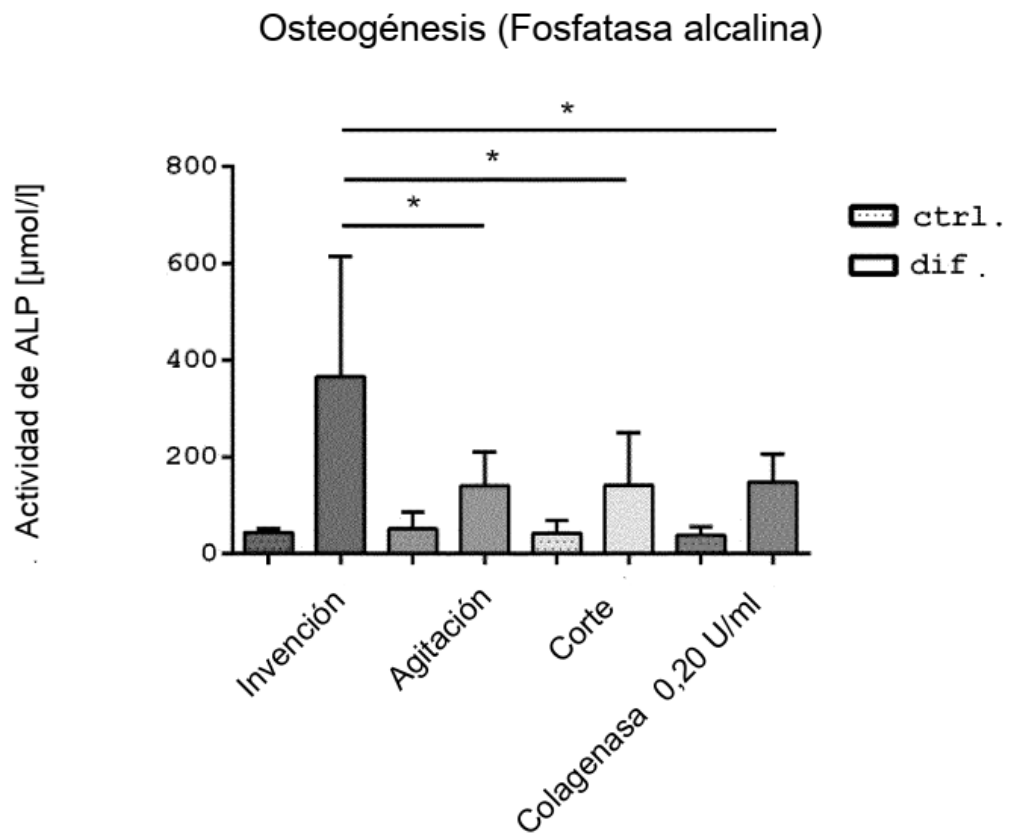


Fig. 31

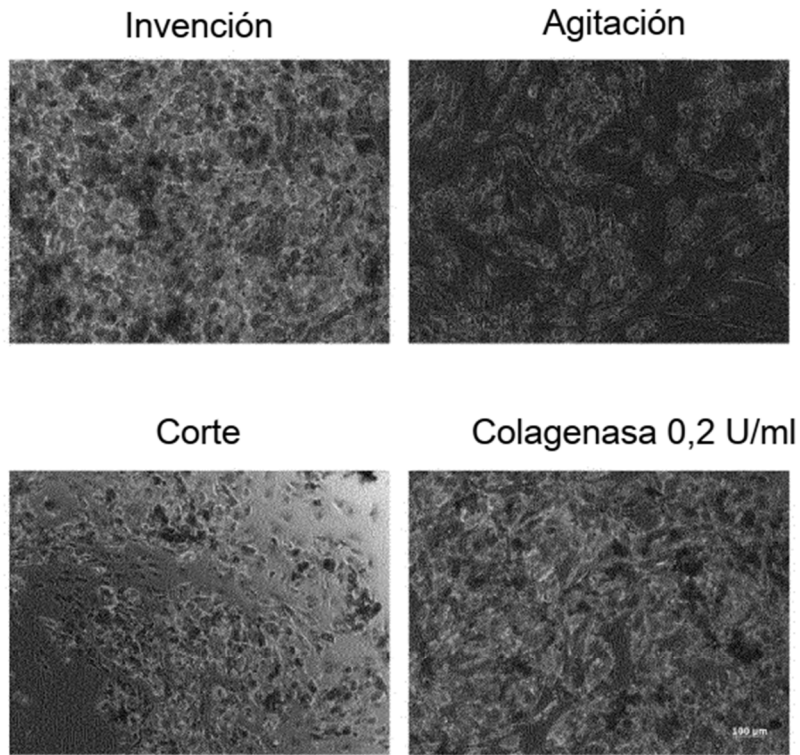
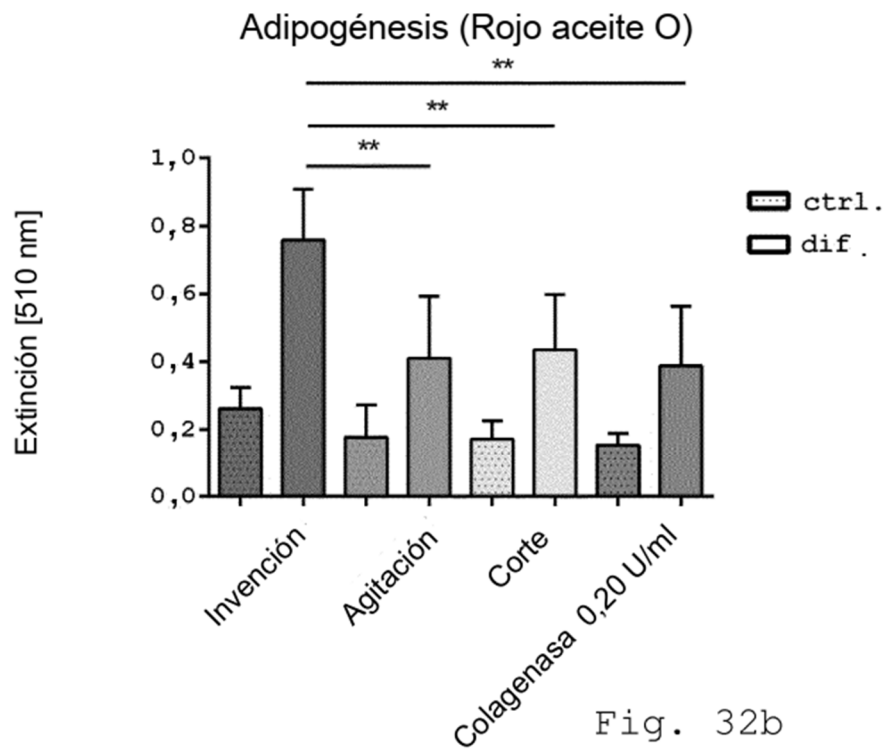


Fig. 32a



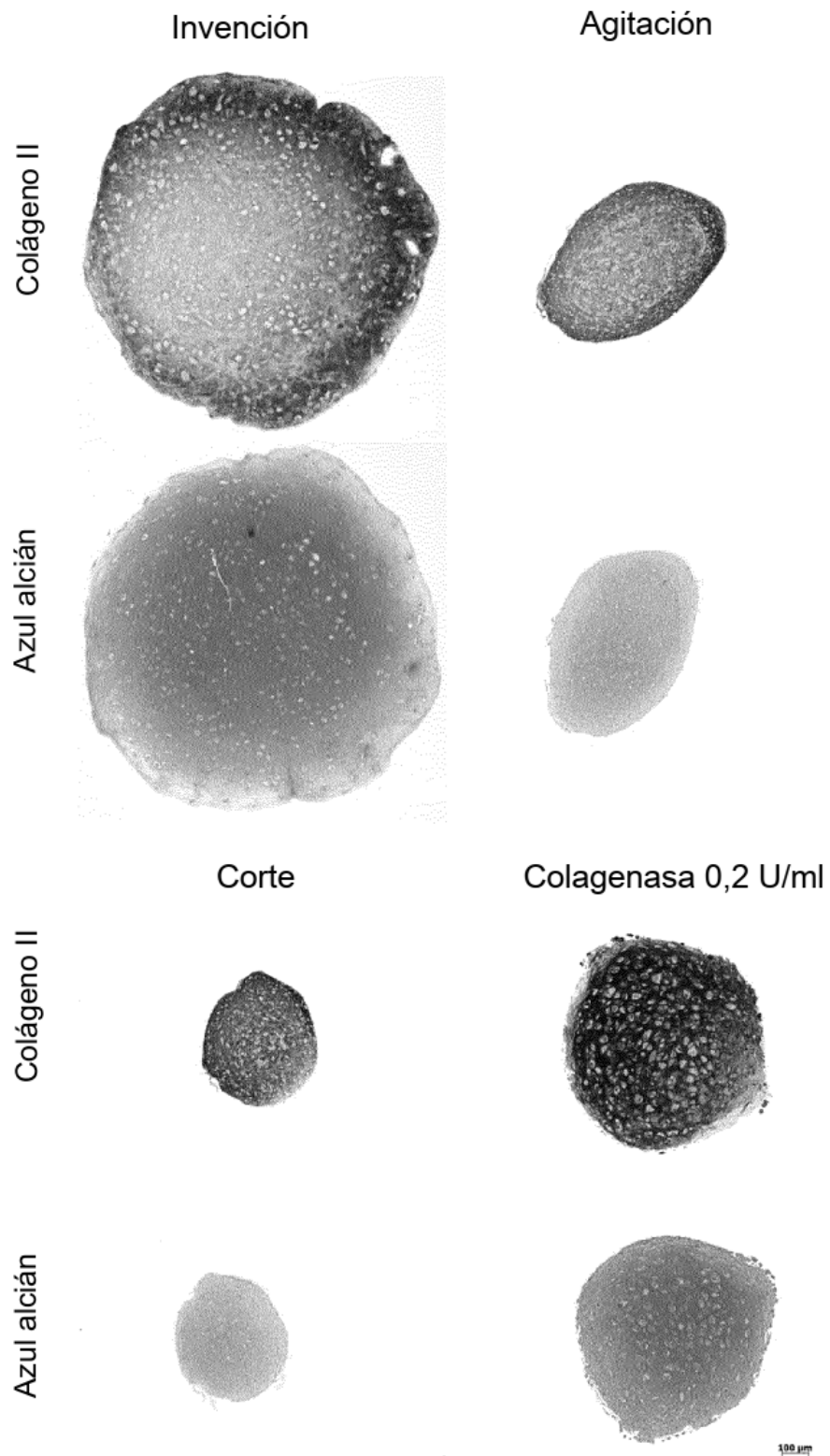


Fig. 33a

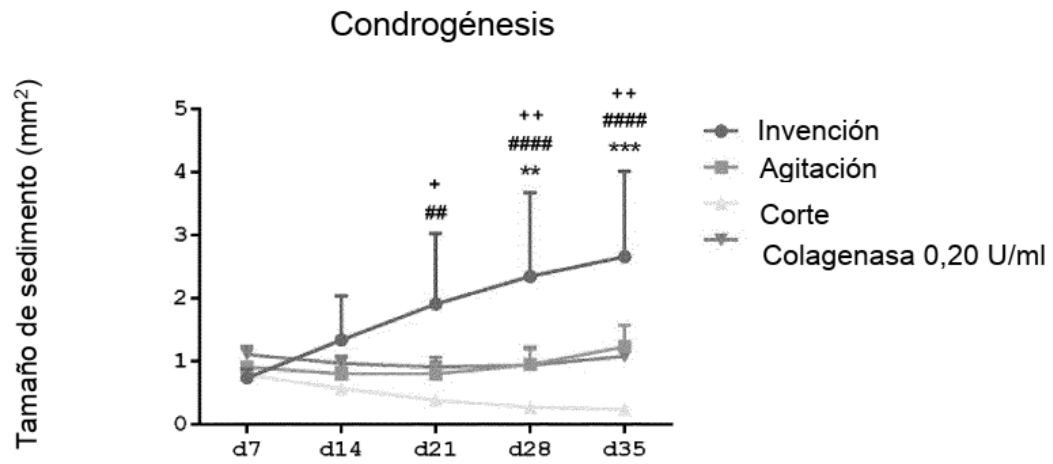


Fig. 33b

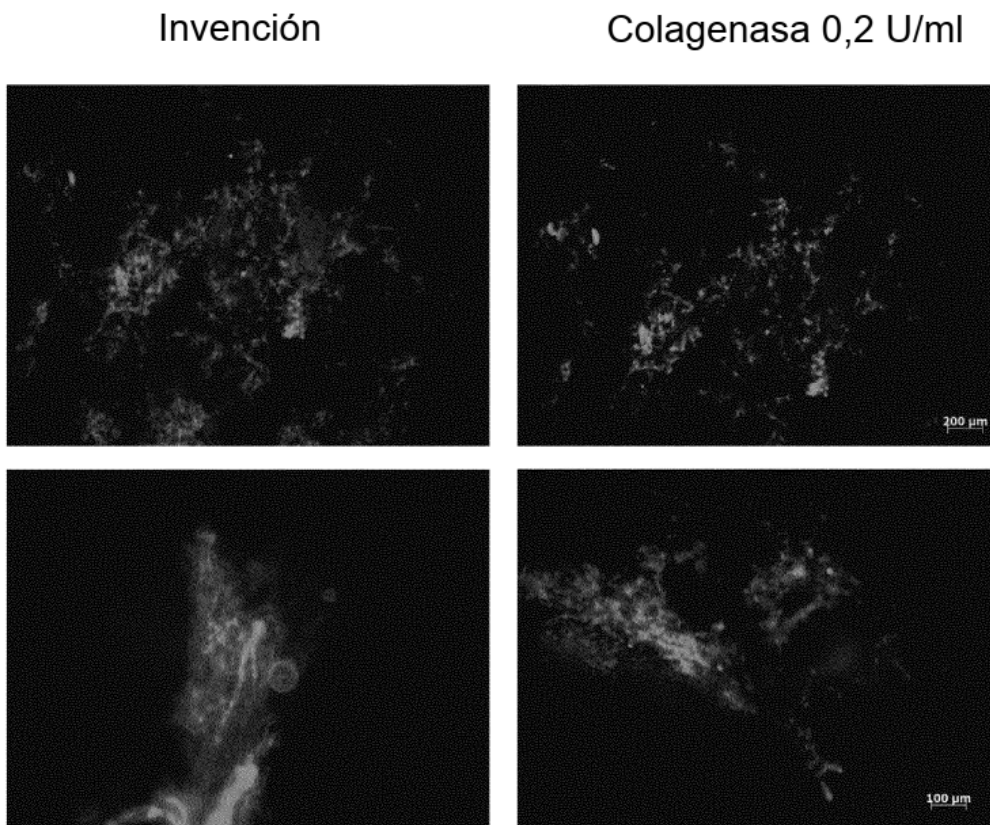
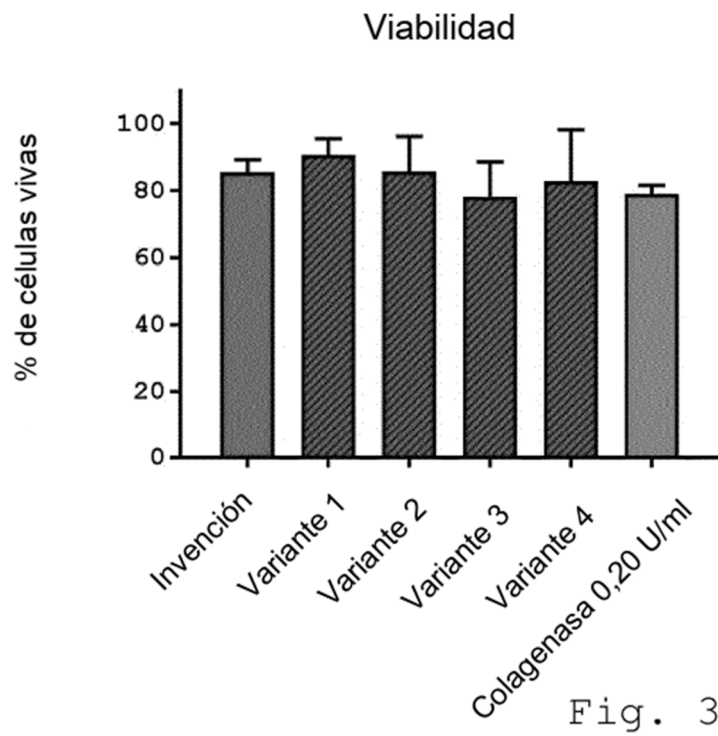
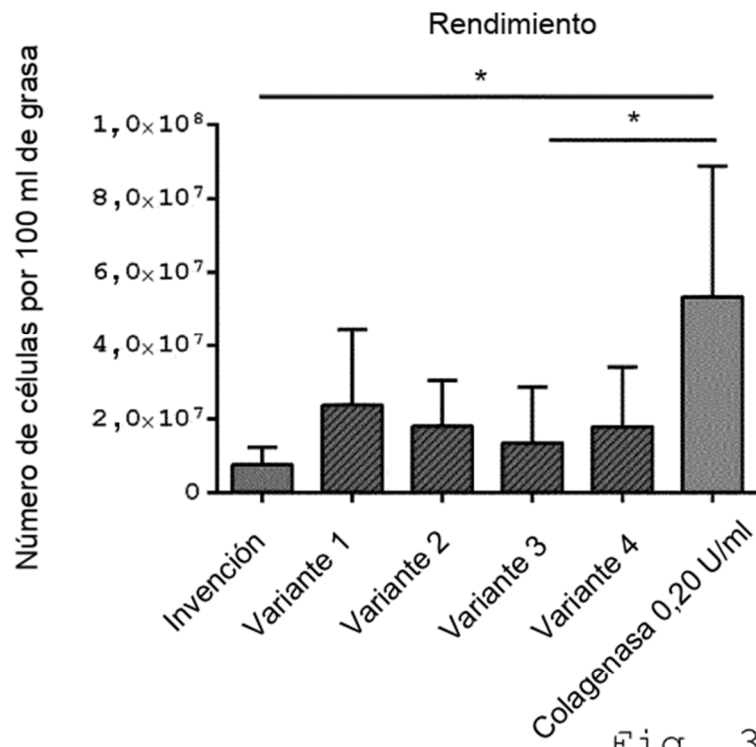


Fig. 34



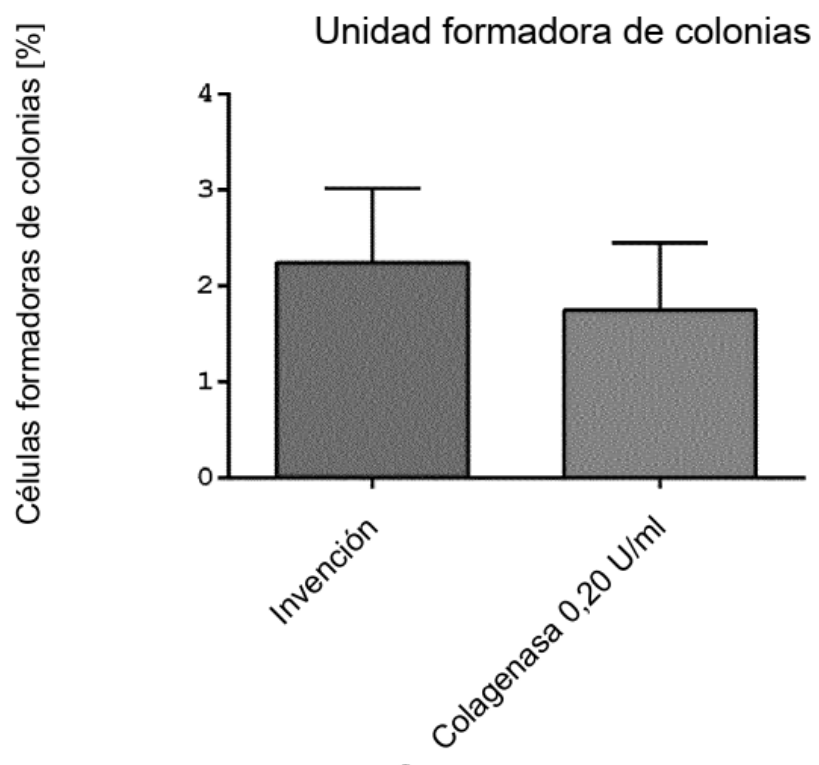


Fig. 37

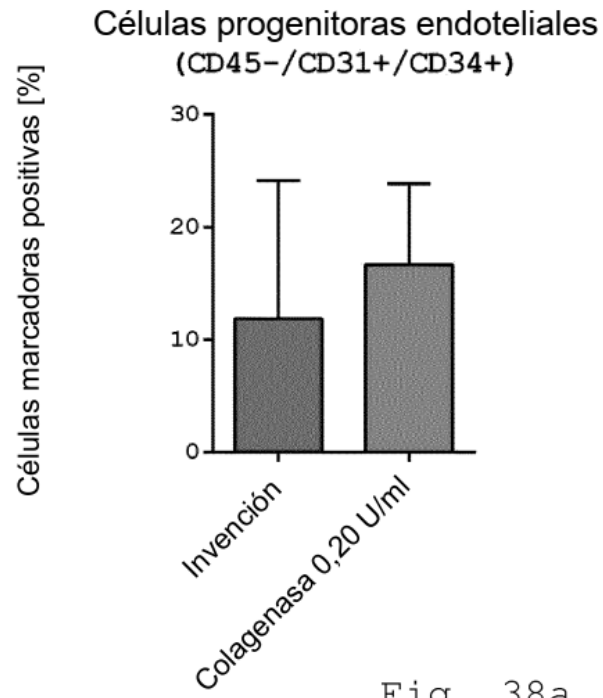


Fig. 38a

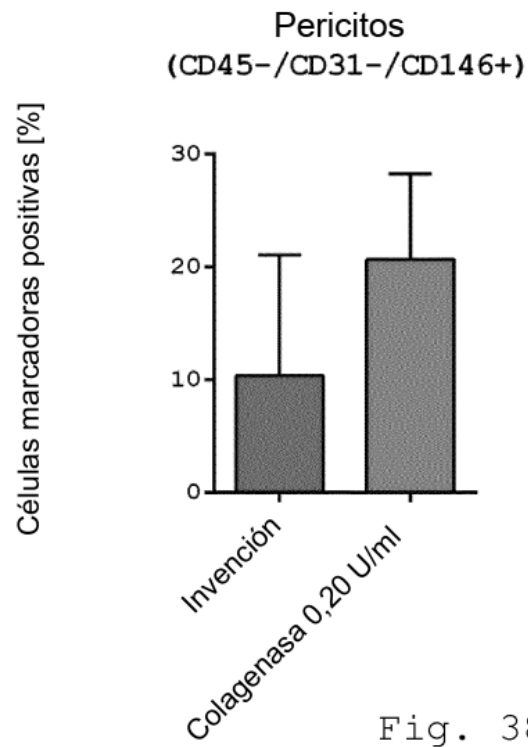
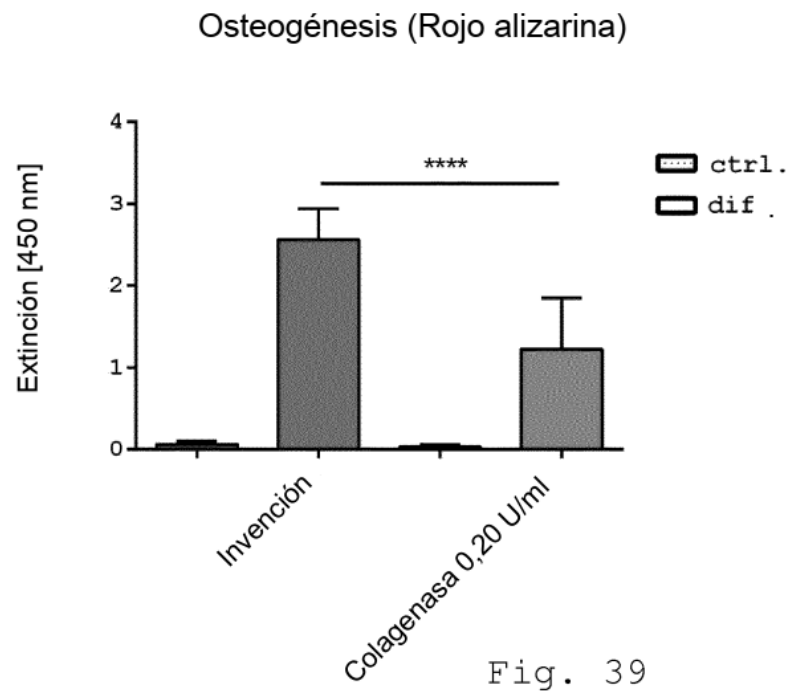
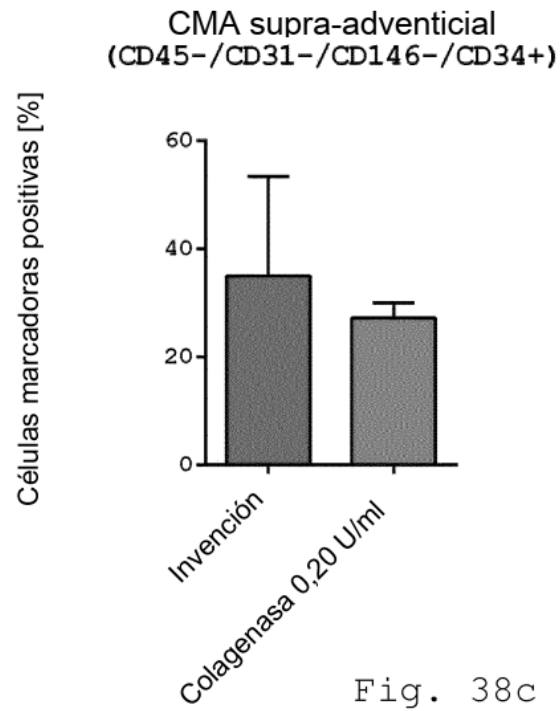


Fig. 38b



Osteogénesis (Fostatasa alcalina)

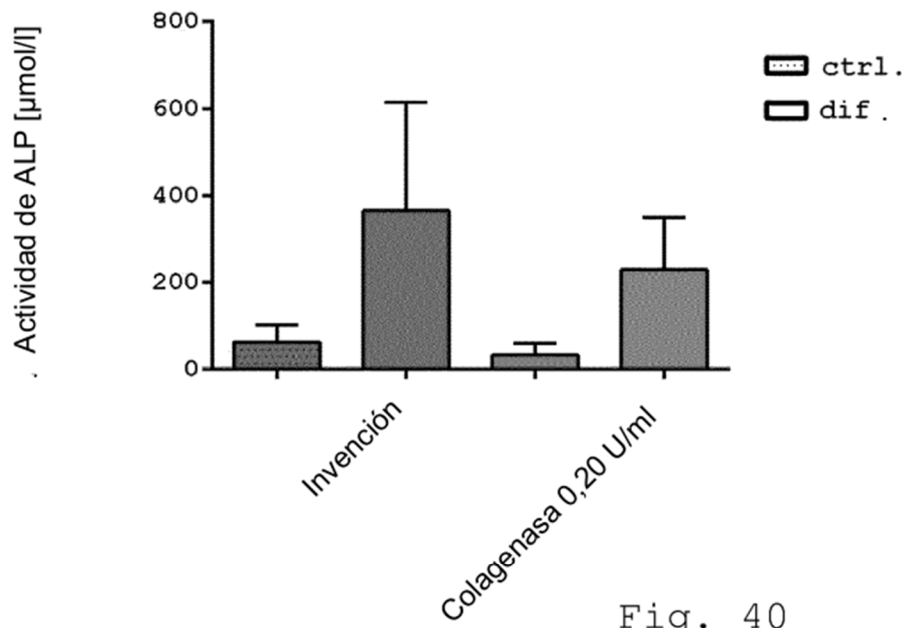


Fig. 40

Adipogénesis (Rojo aceite O)

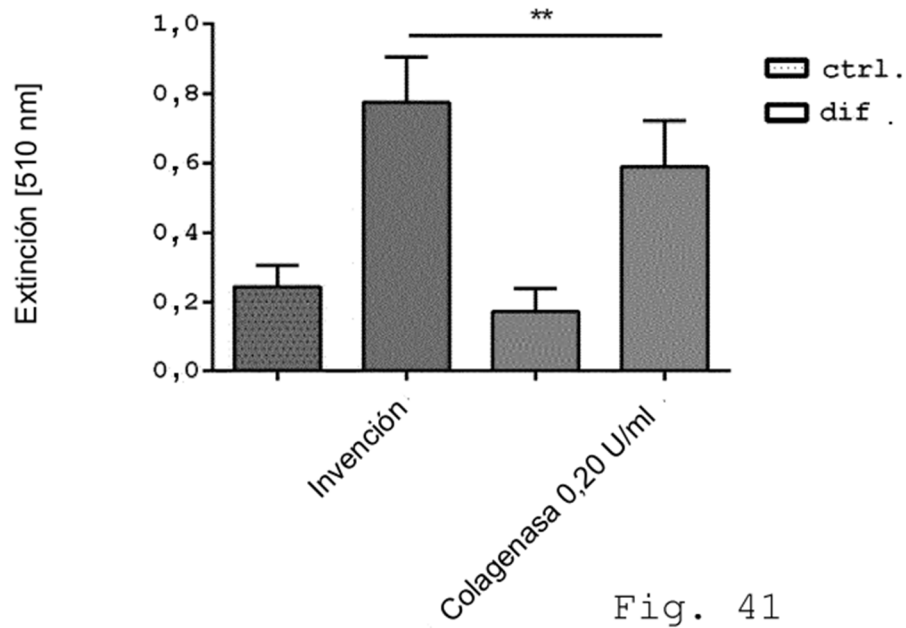


Fig. 41

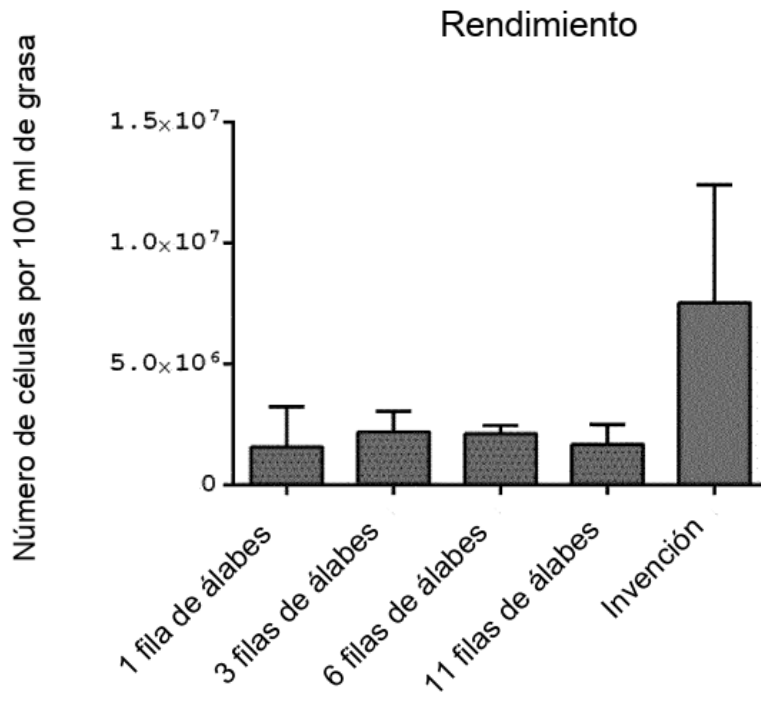


Fig. 42a

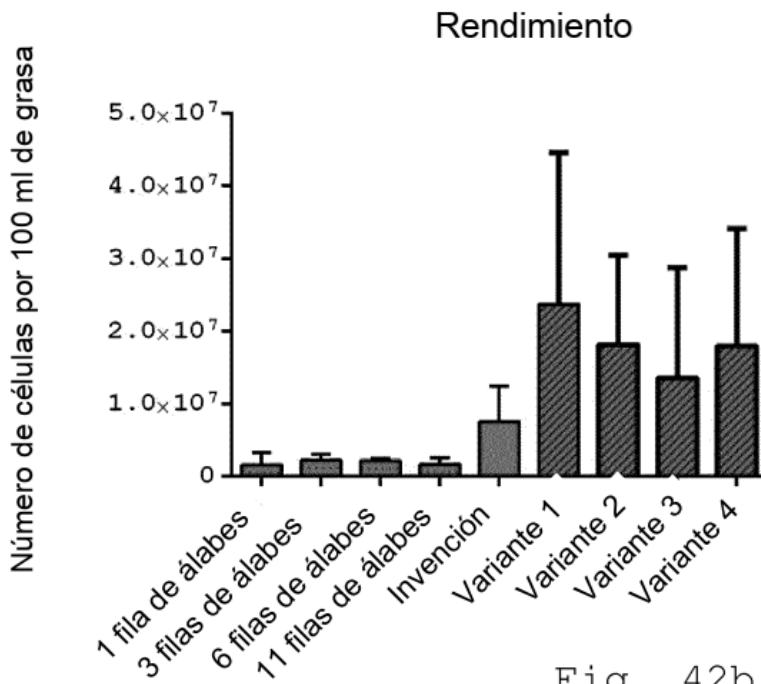


Fig. 42b

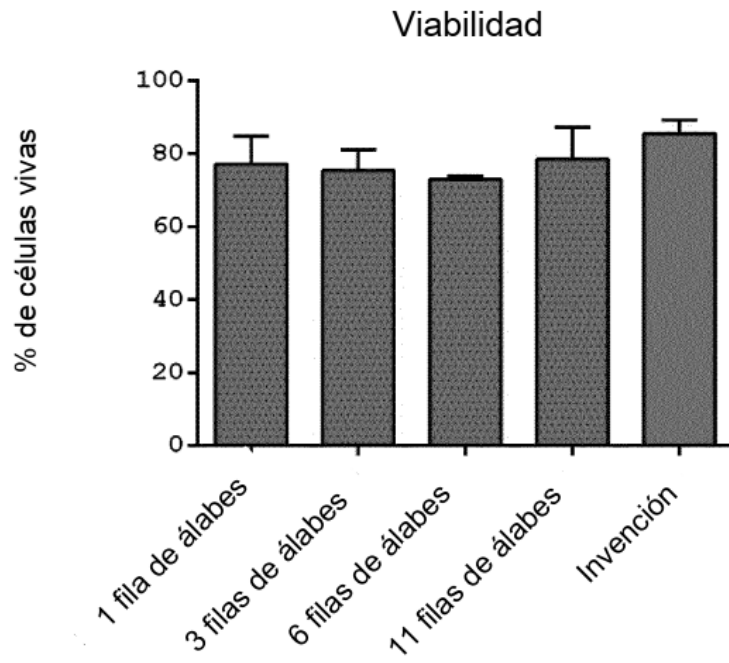


Fig. 43a

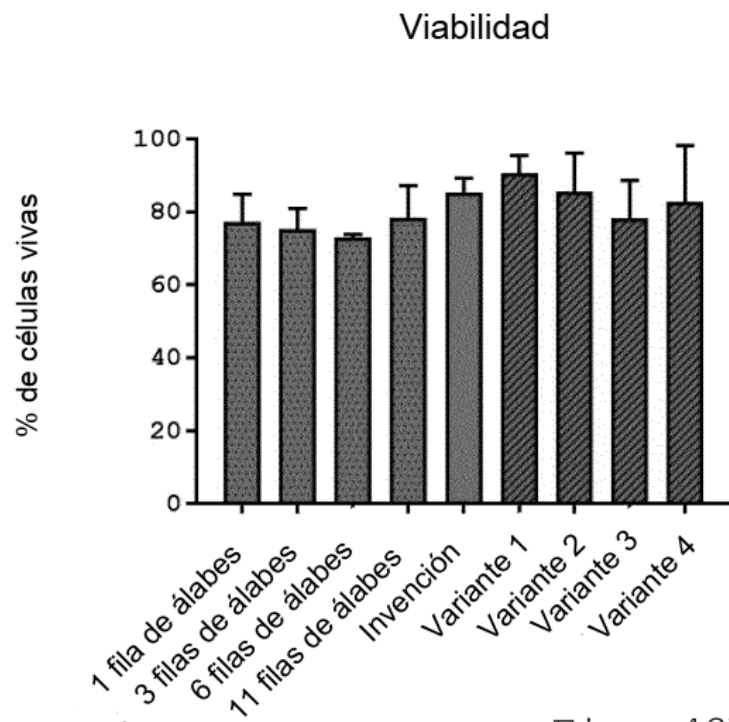


Fig. 43b