

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 754 326**

51 Int. Cl.:

**B04B 1/08** (2006.01)

**C12M 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2015 PCT/US2015/013920**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2015 WO15117007**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2015 E 15742721 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 3099416**

54 Título: **Centrifugadora de tejido adiposo y procedimiento de uso**

30 Prioridad:

**31.01.2014 US 201461934069 P**

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

**17.04.2020**

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)**

**Het Overloon 1**

**6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**FISHER, WILLIAM T.;**

**BRADICA, GINO y**

**NASH, JOHN E.**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 754 326 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**

Centrifugadora de tejido adiposo y procedimiento de uso

Campo técnico

La presente invención se relaciona con centrifugadoras.

Antecedentes de la técnica

5 Se sabe que las células multipotentes son útiles en diversos procedimientos médicos para ayudar a la cicatrización de una zona afectada de un paciente, por ejemplo, proporcionando una mejor regeneración celular de un sitio de tratamiento. Las células multipotentes se pueden obtener a partir de diversos tejidos del cuerpo de un ser vivo para utilizar en un procedimiento quirúrgico. Las células multipotentes pueden ser autólogas, donde el paciente es el donante de las células que se utilizan para tratar al mismo paciente. El término "células multipotentes" incluye las células madre derivadas de adipocitos, que también se han descrito como células madre/estromales derivadas de adipocitos, células madre adultas derivadas de adipocitos, células estromales adultas derivadas de adipocitos, células estromales derivadas de adipocitos, células estromales adiposas, células madre mesenquimales adiposas, lipoblastos, pericitos, preadipocitos y células lipoaspiradas procesadas.

15 Se conoce bien que el tejido adiposo en el cuerpo humano contiene números importantes de células multipotentes, de hecho, se almacenan muchas más células multipotentes por unidad de volumen en grasa que en médula ósea. Algunas estimaciones dan factores de 500:1 para la relación de células multipotentes almacenadas por unidad de volumen en el tejido adiposo en relación con las almacenadas en la médula ósea.

20 Para recuperar las células multipotentes de la grasa, se recupera una muestra de grasa del paciente mediante técnicas conocidas en la técnica, generalmente, por ejemplo, la cirugía o la liposucción. Se ha sabido utilizar las enzimas, tales como la colagenasa, o la tripsina, etc., para romper los enlaces peptídicos en la red de colágeno que mantiene unido el tejido adiposo, y para romper la membrana basal alrededor de las células individuales. Una vez hecho esto, las células multipotentes se pueden separar y concentrar utilizando técnicas de centrifugación, sedimentación o filtración, y el concentrado se lava para eliminar la enzima (residuos) utilizada para tratar la muestra de grasa. Se cree que es vital eliminar los agentes que se han añadido para romper la red de colágeno, ya que se cree que estas enzimas causan una reducción de la viabilidad de las células cosechadas. El concentrado lavado está disponible a continuación para ser inyectado de nuevo en el paciente, con el fin de acelerar la reparación de una lesión. Desafortunadamente, este procesado para preparar una muestra útil de células multipotentes, lleva varias horas (y en algunos casos hasta 14 días), lo que dificulta o imposibilita la utilización *ad-hoc* de un procedimiento de este tipo, con múltiples etapas de procesado requeridas, aumentando de este modo el potencial de contaminación, comprometiendo la esterilidad, y el procesado exige conocimientos técnicos especializados.

30 Se sabe previamente que además de preparar muestras de células multipotentes aisladas del tejido adiposo, las células multipotentes se podrían aislar de una muestra de médula ósea. Sin embargo, para recuperar células de la médula ósea, el paciente tiene que soportar una punción muy incómoda de los espacios/cavidades de la médula en el hueso (por ejemplo, la cresta ilíaca) antes de que se realice la aspiración de médula ósea (BMA). La muestra de BMA se hace girar a continuación en una centrifugadora para obtener un concentrado celular que a continuación se puede inyectar en el paciente para la reparación de alguna lesión. Aunque los tiempos de este procedimiento permiten la utilización *ad-hoc* en un operatorio, el concentrado obtenido puede tener un nivel de dosis insuficiente para algunas aplicaciones sin adoptar un método de cultivo para aumentar la concentración. El procedimiento que utiliza BMA puede ser competitivo para los procedimientos que utilizan células multipotentes de la grasa, sin embargo, la cosecha de tejido para los procedimientos de BMA tiene la desventaja de requerir un procedimiento de acceso doloroso.

45 Por consiguiente, existe la necesidad de un aparato y un procedimiento rápido de recolección, aislamiento y concentración de células multipotentes que permita la utilización *ad-hoc* de las células cosechadas en un procedimiento quirúrgico, en el que las células cosechadas se puedan preparar en un corto plazo de tiempo (menos de 5 minutos), y que se pueda realizar siguiendo un protocolo sencillo con etapas sencillas que no requieran una formación técnica exhaustiva. La invención en cuestión aborda esa necesidad (y otras) proporcionando una unidad de separación centrifugadora compacta, estéril, autónoma y fácil de utilizar para proporcionar un aislamiento celular multipotente rápido y fiable del tejido graso recolectado o cosechado, y métodos para aislar de forma rápida y fiable las células multipotentes del tejido graso recolectado o cosechado. El tejido graso se puede recolectar o cosechar mediante cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a, la liposucción y la grasa cosechada quirúrgicamente. En el caso del tejido adiposo, la mezcla biológica consiste en el tejido graso y fibroso, más una parte de los líquidos tumescentes utilizados para estabilizar la grasa para su extracción (por ejemplo, solución salina, epinefrina, lidocaína, etc.), con las células multipotentes que residen en el tejido graso y fibroso. Para aislar las células multipotentes para la cosecha, el dispositivo descompone mecánicamente la estructura del colágeno y separa sus fracciones por gravedad específica, con el fin de aislar la fracción que contiene las células multipotentes para su recolección y utilización en diversos tipos de procedimientos, ya sean diagnósticos, terapéuticos o quirúrgicos.

Con respecto al procesado de la grasa para reimplantación, se puede obtener alternativamente una muestra de la grasa cosechada para ser utilizada quirúrgicamente, de una manera que no requiera separar las células madre multipotentes de la estructura del tejido, según se describió justo anteriormente. La transferencia de grasa, por ejemplo, también denominada como injerto de grasa autólogo, implica la extracción y reimplantación del tejido adiposo de un paciente. El material adiposo se retira normalmente de zonas del cuerpo como el abdomen, los muslos o los glúteos. Dependiendo de la técnica de extracción (por ejemplo, extirpación quirúrgica, liposucción, etc.), puede ser necesario extraer determinadas partes de la muestra cosechada (por ejemplo, la solución tumescente) del extracto de tejido. Además, puede ser necesario, dependiendo de las técnicas utilizadas para cosechar la muestra, clasificar por tamaño el tejido para crear un producto homogéneo y presentar un material con los tamaños de partículas adecuados para el fin previsto. Clasificar por tamaño el tejido es deseable en muchas aplicaciones clínicas donde hay acceso limitado para reimplantar la muestra. Por ejemplo, cuando existen problemas estéticos (por ejemplo, procedimientos cosméticos faciales), para minimizar las cicatrices de las incisiones, el procedimiento se puede realizar inyectando el material por medio de una aguja de diámetro pequeño. Cuando se utiliza como un relleno facial, el injerto de grasa puede mejorar las zonas arrugadas y hundidas de la cara, y añadir plenitud a los labios y las mejillas. El injerto de grasa también se utiliza comúnmente en el aumento de senos y glúteos, generalmente en lugar de los implantes.

El injerto de grasa actual se realiza mediante la cosecha del material adiposo, utilizando una variedad de técnicas y herramientas quirúrgicas. En consecuencia, el producto que se cosecha puede ser bastante diferente en cuanto a su viabilidad celular, textura (por ejemplo, tamaño de partícula) y composición (por ejemplo, tejido graso, sangre, solución tumescente, aceite, solución salina, agua), como resultado de la técnica utilizada para el cosechado. Esto da como resultado una variabilidad en el material que se puede considerar beneficiosa durante el procesado de la muestra de grasa antes de la reimplantación. Además, las técnicas e instrumentos de preparación aplicados a la muestra de grasa para la reimplantación también pueden variar, dando como resultado posiblemente un producto preparado para la reimplantación que se puede clasificar por tamaño con un tamaño de partícula que sea demasiado pequeño para la utilización prevista del material, dando como resultado una menor viabilidad celular atribuible al procesado excesivo y a un aumento de las posibilidades de lavado del material implantado o de pérdida de volumen en el sitio implantado. Alternativamente, una muestra que se clasifica por tamaño con un tamaño de partícula que es demasiado grande para la utilización prevista puede dar como resultado problemas en el momento de la implantación, tales como una textura irregular, obstrucciones en las agujas de calibre estrecho utilizadas para la reimplantación y dificultades en la revascularización del injerto de tamaño de partícula grande, lo que puede afectar negativamente la viabilidad.

En el documento US2010/0317099 se describe un dispositivo para extraer al menos una parte de una fase líquida de una muestra completa utilizando la fuerza centrífuga. La fase líquida se dirige a través de una región de paso que puede ser perforada y/o porosa y mantener una parte más seca dentro de un contenedor de separación.

Lo que se necesita es un dispositivo que sea capaz de clasificar por tamaño el material hasta una consistencia útil, y que sea capaz de proporcionar una composición fiable del material para la implantación, independientemente de la técnica de recolección original, para evitar los problemas mencionados anteriormente.

Lo que se necesita además es un dispositivo unitario que pueda procesar rápidamente, en un sistema estéril y cerrado, la grasa cosechada para el injerto de grasa, en un material homogéneo, con un tamaño de partícula uniforme y fiable. El dispositivo ideal clasificaría por tamaño el material de manera consistente de manera independiente de la forma de cosechado inicial de la muestra de grasa. Además, lo que se necesita es un dispositivo capaz de eliminar al menos una parte sustancial de los componentes no deseados de la muestra cosechada y preservar los componentes que se van a implantar, tal como, eliminando de la muestra uno o más de los siguientes elementos: sangre, agua, solución salina, aceite, solución tumescente. Además, el dispositivo ideal minimizaría el potencial de daño a los componentes celulares y a la estructura del tejido dentro de la muestra, para maximizar la viabilidad de las células que se van a implantar.

#### Descripción de la invención

En la presente memoria se describe que se proporciona una centrifugadora para procesar una mezcla biológica que comprende tejido adiposo, y que concentra de forma selectiva sus componentes. Esos componentes tienen diferentes gravedades específicas y se pueden estratificar en un campo centrífugo producido por la centrifugadora. La centrifugadora comprende un conjunto de procesado y una fuente de rotación. El conjunto de procesado comprende una cámara interior, una cámara exterior y un tamiz anular. La cámara interior se dispone para contener una mezcla biológica, y tiene un eje longitudinal central sobre el cual se dispone la cámara interior para que gire y comprende un elemento cónico. La cámara exterior se dispone para recibir una mezcla biológica desde la cámara interior y se dispone coaxialmente en torno del eje longitudinal central de la cámara interior y alrededor de la cámara interior. La cámara exterior se dispone de forma que gire en torno al eje longitudinal central y comprende una pared exterior de la cámara y un plato. El tamiz tiene una serie de aberturas en el mismo y se dispone para que gire en torno al eje longitudinal central. La fuente de rotación se acopla a las cámaras interior y exterior.

De acuerdo con la invención, de acuerdo con la reivindicación 1, se proporciona una centrifugadora para concentrar de forma selectiva al menos un componente de una mezcla biológica que comprende tejido adiposo. Los componentes tienen diferentes gravedades específicas y se pueden estratificar en un campo centrífugo producido

por la centrifugadora. La centrifugadora comprende una cámara interior dispuesta para recibir la mezcla biológica y tiene un eje longitudinal central sobre el que se dispone la cámara interior para que gire. La cámara interior comprende una pared lateral que tiene una superficie interior cónica, una base, un tamiz anular, y opcionalmente, una trampa y al menos un rodillo. Si está presente, la trampa se sitúa en la cámara interior adyacente a la superficie interior de la pared lateral. El tamiz anular tiene una superficie interior y se sitúa a una primera distancia radial del eje longitudinal central. El tamiz anular sobresale alejándose de la base. El al menos un rodillo se dispone para rodar de forma efectiva alrededor de la superficie interior del tamiz para impulsar al menos una parte de la mezcla biológica a través del tamiz y alejándose del eje longitudinal central y hacia la pared lateral cónica.

De acuerdo con otro aspecto de esta invención se proporciona un método para procesar una mezcla biológica que comprende tejido adiposo, y que concentra de forma selectiva los componentes de la mezcla biológica. Los componentes tienen diferentes gravedades específicas y se pueden estratificar en un campo centrífugo. El método básicamente consiste en proporcionar la mezcla biológica en una cámara interior de una centrifugadora. La mezcla biológica morselizada se introduce en la cámara exterior y la cámara exterior se hace girar alrededor de un eje para hacer que la mezcla biológica morselizada se estratifique en la cámara exterior en al menos dos capas estratificadas concéntricas de componentes (por ejemplo, siendo una de las cuales células multipotentes).

También se describe que se proporciona un método para procesar una mezcla biológica que comprende tejido adiposo, y que concentra de forma selectiva los componentes de la mezcla biológica. Los componentes tienen diferentes gravedades específicas y se pueden estratificar en un campo centrífugo. El método básicamente consiste en proporcionar la mezcla biológica en una cámara interior de una centrifugadora, y al mismo tiempo hacer girar la cámara alrededor de un eje longitudinal, haciendo que al menos una parte de la mezcla biológica en la cámara se clasifique por tamaño al pasar a través de un elemento de tamizado giratorio con pequeñas aberturas en el mismo. La rotación continua de la cámara hará que la mezcla biológica clasificada por tamaño se estratifique en la cámara exterior en al menos dos capas estratificadas concéntricas de componentes.

En las diversas formas de realización de ejemplo descritas en la presente memoria, se proporciona un motor o unidad motriz, la cual sirve como fuente de rotación para la unidad de procesado. Preferiblemente, la unidad de motor se puede separar de la unidad de procesado, de tal manera que la unidad de motor se pueda reutilizar, mientras que la unidad de procesado es preferiblemente un componente de un solo uso, aunque se contempla que la unidad de procesado se pueda limpiar y esterilizar, de modo que también se pueda reutilizar. La unidad de procesado es un conjunto compuesto por una cámara interior y una cámara exterior. La cámara interior está formada por una pared lateral y una base. La pared lateral tiene una superficie interior cónica.

En algunas de las formas de realización de ejemplo descritas en la presente memoria, puede haber un elemento estático colocado entre las cámaras interior y exterior giratorias. Algunas de estas formas de realización también pueden tener un tamiz dispuesto entre el elemento estático y la cámara exterior. A medida que el tejido morselizado se encuentra con el tamiz, la fuerza centrífuga continua impulsará el material a través del tamiz, capturando de este modo el material fibroso en el tamiz y pasando el material no fibroso a la cámara exterior. Este tamiz también puede servir para reducir adicionalmente el tamaño de las partículas del material al pasar por las aberturas.

Una vez que el material morselizado está en la cámara exterior giratoria, el diámetro mayor de la cámara exterior someterá al material morselizado a mayores fuerzas centrífugas, en relación con las de la cámara interior, si la velocidad de rotación se mantiene constante. Alternativamente, si se desea mantener el nivel de fuerzas G a un nivel constante, la velocidad de rotación se podría reducir una vez que la mayoría del material tisular esté en la cámara exterior. Mientras se encuentre en la cámara exterior giratoria, el material morselizado se estratificará en capas anulares, basándose en la gravedad específica de los componentes de la mezcla biológica. Se entiende que la velocidad de rotación se puede variar durante el procesado y la separación.

En otras varias formas de realización de ejemplo del dispositivo, la unidad de procesado es una cámara interior, con un elemento de tamizado interior. La mezcla biológica que comprende el tejido adiposo se añade al interior de la cámara y, a medida que el dispositivo se hace girar, el material se encontrará con el tamiz. La rotación continua impulsará el material a través del tamiz, lo que hará que el material se morselice al pasar a través de la abertura. Además, el tamiz puede capturar gran parte de los elementos fibrosos en el material y pasar los elementos no fibrosos a través de las aberturas a la pared de la cámara, donde se puede separar el material morselizado por gravedad específica. En algunas de estas formas de realización de ejemplo que tienen un tamiz, se puede proporcionar un rodillo opcional para impulsar adicionalmente el material a través del tamiz. En una forma de realización de este tipo, cuando el material se extiende hacia afuera a lo largo de la superficie interior del tamiz que gira, el material encontrará un rodillo dispuesto paralelo al tamiz, en esencia, rodando en el lugar en contra del tamiz que gira, por lo tanto, el material será empujado a través de las aberturas en el tamiz a medida que el material se encuentra con el rodillo.

En varias formas de realización de ejemplo descritas en la presente memoria, la pared de la cámara, y la base de la cámara interior pueden formar una trampa para capturar la fracción de densidad más alta del líquido en la cámara, cuando los componentes se separan por gravedad específica debido a la rotación de la centrifugadora en torno del eje longitudinal central. Esta trampa se dispone de tal manera que, al cesar la rotación de las cámaras del dispositivo de centrifugación, los efectos de la gravedad superen la fuerza centrífuga que actúa sobre el material dentro del dispositivo, la fracción de componente dentro de la trampa permanecerá dentro de la trampa, y no se mezclará con

el material restante dentro de la cámara, ya que esa fracción más ligera se acumula debido a la gravedad en el centro de la cámara interior. La fracción que queda dentro de la trampa se puede cosechar mediante diversas técnicas y aplicar al tejido para ayudar en la reparación.

5 Alternativamente, en otras formas de realización de ejemplo donde las células están siendo retenidas dentro de la estructura nativa del material tisular, una parte sustancial de los líquidos será extraída del tejido y acumulada en la trampa, sin embargo, una parte sustancial de las células deseadas permanecerán dentro de la cámara interior de hecho para su recolección y utilización en procedimientos quirúrgicos donde un material de andamiaje pueda ser útil.

La fracción aislada que contiene las células multipotentes se puede cosechar y almacenar para su utilización posterior, o se puede dirigir inmediatamente a un paciente para su tratamiento en un procedimiento médico.

#### Breve descripción de los dibujos

10 La Fig. 1 es una vista en sección transversal de otra forma de realización alternativa de una unidad de procesado de una centrifugadora construida de acuerdo con esta invención, en donde la unidad de procesado incluye un elemento de tamizado y un elemento de rodillo.

15 La Fig. 2 es una vista en sección transversal ampliada de todavía otra forma de realización alternativa de una unidad de procesado de una centrifugadora con un elemento de tamizado y elemento de rodillo construida de acuerdo con esta invención.

Las Fig. 3A y 3B son vistas en sección transversal ampliadas respectivas de los elementos de tamiz y de rodillo suspendido construidos de acuerdo con esta invención.

20 La Fig. 4 es una vista en sección transversal de todavía otra forma de realización alternativa de una centrifugadora construida de acuerdo con esta invención que hace uso de un elemento de tamiz, un elemento de rodillo y un elemento de tamizado secundario.

La Fig. 5 es una vista en sección transversal de todavía otra forma de realización alternativa de una centrifugadora construida de acuerdo con esta invención que hace uso de un elemento anular, y un elemento de rodillo, con uno o más que presentan una topografía irregular.

25 La Fig. 6 es una vista en sección transversal ampliada de todavía otra forma de realización alternativa de una unidad de procesado de una centrifugadora con un elemento de tamizado y un elemento de rodillo construida de acuerdo con esta invención.

#### Modos para llevar a cabo la invención

30 Con referencia ahora a las diversas figuras del dibujo, en donde símbolos de referencia semejantes se refieren a partes semejantes, en la Fig. 1 se muestra una forma de realización de ejemplo de una parte de una centrifugadora construida de acuerdo con esta invención. La centrifugadora comprende básicamente una unidad o conjunto de procesado y de una unidad de base o motriz 20. En algunas de las formas de realización de ejemplo descritas en la presente memoria, la unidad de procesado incluye una cámara exterior 102 que puede girar y una cámara interior 103 que puede girar. La cámara interior se dispone para recibir una mezcla biológica que comprende tejido adiposo (graso) y para hacerla girar con lo que se descompone mecánicamente y desde donde se introduce el tejido descompuesto en la cámara exterior. La cámara exterior también se dispone para hacerla girar para efectuar la separación de los componentes de tejido descompuesto mediante la fuerza centrífuga producida por la rotación de esa cámara.

35 Aunque se ha sabido previamente que la red fibrosa en el tejido graso se puede descomponer mediante la utilización de agentes enzimáticos, actualmente se busca descomponer la red fibrosa en el tejido adiposo cosechado utilizando únicamente medios mecánicos, con el fin de permitir, en algunas formas de realización, la liberación de las células multipotentes contenidas dentro de la red fibrosa. Esta descomposición mecánica de la red fibrosa debería evitar la necesidad de lavar un agente enzimático, y se puede lograr utilizando las diversas formas de realización de los dispositivos centrífugos descritos en la presente memoria. Para claridad, el término morselizado se utiliza para describir el procesado de reducir mecánicamente un tejido que tiene un tamaño de fragmento inicial en fragmentos de un tamaño más pequeño mediante las centrifugadoras de esta invención, también conocido como clasificación por tamaño del tejido. Los términos "morselizar" y "clasificar por tamaño" se utilizan de forma intercambiable en la presente memoria.

40 El conjunto de procesado o unidad 100D de la Fig. 1, al igual que las demás unidades de procesado que se van a describir más adelante, se dispone de forma que se pueda montar con capacidad de liberarse en la base 20. Una vez montada en la base, la centrifugadora se puede hacer funcionar para hacer girar la unidad de procesado con una velocidad elevada (que se va a describir más adelante) en torno a un eje central longitudinal 125 de la unidad de procesado. El medio para efectuar esa rotación básicamente comprende un motor 25 alojado en la unidad de base 20. El conjunto de procesado se hace girar al activar el motor 25 a través de un acoplamiento 126. El acoplamiento tiene preferiblemente la forma de una pareja de componentes enchavetados que se emparejan juntos con capacidad de liberarse, de tal manera que la unidad de base y el conjunto de procesado se puedan acoplar de forma selectiva.

45 Mientras que las diversas unidades de procesado y la unidad base se muestran horizontales en las figuras del

dibujo, se debe señalar que durante la utilización la centrifugadora se orienta de modo que el eje de rotación de las cámaras sea vertical, con la unidad base dispuesta sobre alguna superficie y soportando la unidad de procesado encima de ella.

Se prefiere que la unidad base 20 se pueda reutilizar de modo que se pueda utilizar de forma consecutiva con múltiples conjuntos de procesado. Sin embargo, se contempla que la unidad base pueda ser desechable, si se desea. La unidad de procesado es, sin embargo, preferiblemente desechable, pero esto no es obligatorio siempre que se pueda limpiar y desinfectar lo suficiente para su reutilización. En la forma de realización donde la unidad motriz es reutilizable, el coste para el usuario se puede mantener más bajo de lo que sería en el caso donde la unidad motriz se dispusiese junto con la unidad de separación que puede girar. Se contempla que el acto de unir los componentes acoplables (es decir, la unidad motriz 20 y la unidad de procesado 100) pueda desencadenar una reacción automática de arranque en la unidad motriz, para iniciar el procesado del material fibroso. Por ejemplo, al incorporar interruptores magnéticos en la unidad motriz, el acto de insertar la unidad de procesado en la unidad motriz puede despertar y opcionalmente arrancar la unidad motriz. Alternativamente, la unidad motriz puede incluir controles operados manualmente, para permitir que el operador tenga control total sobre algunas o todas las etapas de procesado.

Durante el funcionamiento de las diversas formas de realización de ejemplo descritas en la presente memoria, el tejido adiposo se puede obtener de un paciente mediante técnicas conocidas, que incluyen la liposucción o la escisión quirúrgica. En el caso del tejido obtenido por liposucción, es probable que el tejido graso y la mezcla de solución tumescente estén en aproximadamente una relación de 1:1 y que tendrán que pasar a través de orificios de cánulas de succión que habrán reducido los fragmentos de grasa a un tamaño de aproximadamente 2 mm. Esta mezcla biológica se puede alimentar directamente a las diferentes formas realización de un dispositivo de centrifugación descrito en la presente memoria, por medio del puerto de inyección 110 o del tubo estacionario 235, según corresponda. Alternativamente, en el caso del tejido graso obtenido por medio de la escisión quirúrgica, la grasa normalmente se eliminará del paciente como una masa semicoherente, en contraste con el tejido recogido como partículas a través de liposucción. En el caso de la grasa extirpada quirúrgicamente, la grasa se debe descomponer en trozos más pequeños, y luego se debe mezclar con partes de líquido, normalmente con solución salina o tumescente, hasta dos veces el volumen de grasa, aunque se contempla que otras proporciones también pueden ser adecuadas. La mezcla de la grasa cosechada y el líquido de mezcla se puede realizar pasando la mezcla de un lado a otro entre jeringas con boquillas de aproximadamente 2 mm antes de colocarla en el dispositivo de centrifugación.

Durante el funcionamiento de cualquiera de las diversas formas de realización de ejemplo descritas en la presente memoria, el tejido adiposo cosechado se puede tratar opcionalmente con un aditivo, tal como un agente biológicamente activo. Se contempla que uno puede desear tratar el tejido adiposo con, por ejemplo, medicamentos, antibióticos, modificadores celulares, modificadores del pH, enzimas, productos sanguíneos (por ejemplo, sangre entera, plasma rico en plaquetas (PRP), glóbulos rojos, plasma pobre en plaquetas (PPP), aspirado de médula ósea (BMA) o concentrado de aspirado de médula ósea (BMAC)), antes de, o durante, el procesado del tejido adiposo en las diversas formas de realización de ejemplo descritas en la presente memoria. Alternativamente, uno o más conservantes o anticoagulantes (por ejemplo, heparina, cumarina, ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), citratos (por ejemplo, citrato anticoagulante dextrosa A (ACDA), oxalato) se pueden añadir solos, u otros aditivos, al tejido adiposo antes de, o a medida que se procesa en las diversas formas de realización de ejemplo de los dispositivos descritos en la presente memoria. Se contempla que los aditivos pueden ayudar de manera beneficiosa en la separación de células durante la centrifugación, pueden alterar el comportamiento de las células en la muestra cosechada para su procesado según se describe en la presente memoria, o permitir el almacenamiento de la muestra de tejido cosechada para su posterior procesado según se describe en la presente memoria. Por ejemplo, la adición de ACDA puede prevenir la coagulación, permitiendo el almacenamiento de la solución que contiene glóbulos rojos o plaquetas, o adicionalmente, el ACDA puede servir para alterar la morfología de las células madre y las células plaquetarias. Por ejemplo, los solicitantes creen que añadir ACDA a la carga de la mezcla biológica puede ser beneficioso, en el caso de las células plaquetarias que normalmente tienen una morfología similar a la de una placa, se puede convertir en una morfología más esférica, afectando de este modo de manera beneficiosa la capacidad de las células plaquetarias para ser separadas por gravedad específica, ya que la forma más esférica de la célula puede maniobrar con mayor facilidad a través de los otros componentes de la mezcla biológica, por ejemplo, las partículas de tejido adiposo.

Durante este proceso de centrifugación, el componente graso del material tiende a migrar hacia el eje longitudinal central 125, y las células más pesadas y la solución acuosa tienden a desplazarse hacia las paredes exteriores de la cámara exterior 102. El líquido de mayor densidad (con la gravedad específica más alta), que contiene las mayores concentraciones de células multipotentes, se desplaza al diámetro más exterior, a la trampa anular 136. Esa trampa básicamente comprende un canal que se extiende angularmente, aunque el tamaño y la forma de la trampa se pueden modificar para capturar diferentes fracciones de la mezcla biológica. Por ejemplo, la trampa puede no estar en ángulo como se muestra en la figura, sino que puede ser un canal que se dispone en paralelo al eje de rotación 125.

Para mayor facilidad de fabricación, la cámara interior 103 y la cámara exterior 102 se disponen para girar juntas, de una manera sincronizada, sin embargo, en las formas de realización descritas en la presente memoria, se contempla que la centrifugadora se podría disponer de modo que la cámara interior 103 y cámara exterior 102 giren de una

manera no sincronizada. Por lo tanto, la cámara interior puede girar a una primera velocidad, siempre que esa rotación cree un campo centrífugo que generará suficiente presión sobre la carga del tejido; mientras que la cámara exterior 102 gira a una segunda velocidad, ya sea en el mismo sentido de rotación o en otro diferente, siempre que la rotación cree un campo centrífugo, con el fin de efectuar la estratificación del material de lechada morselizado.

5 Se ha observado que la grasa de diferente composición se comporta de manera diferente en el dispositivo de centrifugación. Mientras que una parte del líquido con la gravedad específica más alta se desplaza de hecho al diámetro exterior durante la centrifugación y una parte de ese líquido con la gravedad específica más alta llena la trampa 136, la grasa residual puede, o no, emulsionarse en una pasta cremosa estable. En aquellos casos en los que la grasa residual se presenta en forma de una pasta estable, el material de la pasta será autoportante, al menos durante unos minutos, en lugar de fluir, como lo sería una pasta que no fuese autoportante.

La Fig. 1 muestra una forma de realización de la unidad de procesado 100D. Esta unidad de procesado también se dispone para ser accionada desde un motor con un eje motriz y alojada en una unidad base, según se ha descrito anteriormente. A diferencia de las formas de realización de la unidad de procesado descritas anteriormente, la unidad de procesado 100D de la Fig. 1 incluye un elemento de rodillo 210, que actúa en concierto con un tamiz giratorio 215 para morselizar el tejido proporcionado dentro de la cámara interior, antes de hacer que el tejido sea separado por centrifugación. Esta forma de realización incluye una cámara interior giratoria 103 que tiene una pared lateral cónica 134. Un elemento de tamizado anular 215 se sitúa dentro de la cámara interior 103 y se extiende concéntricamente alrededor del eje longitudinal central (es decir, el eje de rotación). El elemento de tamizado se extiende desde donde se une con la base 118 de la cámara interior, hasta el punto donde se encuentra con la pared lateral de la cámara. El tamiz divide por lo tanto la cámara interior 103, de modo que el material que pasa de una región dentro del anillo del elemento de tamizado 215 al exterior del elemento de tamizado debe pasar necesariamente a través de las aberturas previstas en el elemento de tamizado. El elemento de tamizado es un elemento parecido a una malla que puede ser un material de alambre metálico o polimérico, o alternativamente una lámina perforada que proporcione aberturas dimensionadas para que el material líquido pase, pero que retengan gran parte del material fibroso. Se prevé que las aberturas serán dimensionadas uniforme o no uniformemente entre 0,002 y 0,040 pulgadas. Para ayudar en el paso del material tisular a través del elemento de tamizado, se proporciona un elemento de rodillo 210 adyacente a la superficie interior del elemento de tamizado y dispuesto para rodar contra él. El elemento de rodillo se monta en un eje 220. El eje puede ser de cualquier tipo conocido en la técnica. Según se muestra en la Fig. 1, el eje puede ser un alambre rígido con forma que se extiende a través del orificio central del rodillo, y el alambre se monta de modo que se pueda asegurar en una posición estática (estacionaria) dentro de la cámara interior. En esta forma de realización, el extremo superior del alambre que forma un eje 220 que se fija a una brida 225 en el extremo de un tubo estacionario 235 y que se extiende a través de una abertura en la tapa final 106. La brida 225 y el tubo estacionario 235 presentan un orificio hueco que se extiende a través de su interior y que sirve como puerto de entrada para dirigir el material tisular hacia el dispositivo para su procesado. La brida 225 y el tubo estacionario 235 se aíslan de la rotación de la cámara interior 103 mediante los cojinetes de la brida 230 y un cojinete del puerto 245. El extremo inferior del alambre con forma que compone el eje 220 se dirige hacia un casquillo 240, situado en el centro concéntrico de la base 118 de la cámara interior 103, en línea con el eje de rotación de la cámara interior. El casquillo 240 sirve para aislar el eje estático 220 de la rotación de la cámara interior 103. Por lo tanto, el elemento de rodillo 210 se puede hacer rodar de forma efectiva alrededor de la superficie interior del elemento de tamizado 215 manteniendo el eje del rodillo 220 estacionario cuando el tamiz 215 y la cámara interior 103 giran.

Se contempla que puede haber un beneficio para utilizar un elemento de rodillo 210 que se dote con una libertad de movimiento, tal que se pueda articular, cuando gira en torno del eje estático 220. En las Fig. 3A y 3B se muestran ejemplos de posibles mecanismos de articulación. Al proporcionar una fuerza en la mitad de la longitud del rodillo y un espacio libre sobre el eje 220, el rodillo se puede desplazar en relación con el eje de rotación de la cámara, cuando se enganche a partes abultadas del material tisular. Las Fig. 3A y 3B muestran una vista ampliada detallada del elemento de rodillo 210, en el eje 220, contra el elemento de tamizado 215. En estas formas de realización, el rodillo es capaz de fluctuar contra el elemento de tamizado 215, por la naturaleza de la desviación en una dirección perpendicular al eje de rotación, lo cual es permitido por el alambre elástico conformado como eje 220. Además, el elemento de rodillo 210 es capaz de efectuar un movimiento de guiñada, mostrado como inclinación del eje de rotación del elemento de rodillo 210, cuando el elemento de rodillo 210 encuentra el tejido contra el elemento de tamizado 215. La capacidad de efectuar un movimiento de guiñada se proporciona ya que el rodillo puede pivotar en el eje 220.

Con referencia de nuevo a la Fig. 1, se puede ver que la cámara interior 103 presenta una pared lateral cónica 134. La base 118 de la cámara interior 103 se forma de modo que también proporciona una superficie cónica, en relación con el eje de rotación 125, provista mediante la cuña 265. Según se representa en la Fig. 1, la trampa 136 se define en este caso por la superficie exterior de la cuña 265 y la superficie interior de la pared lateral cónica 134. La trampa 136 es preferiblemente anular, aunque se contempla que formas alternas pueden ser suficientes, por ejemplo, por ser lobuladas. La trampa, según se representa en la Fig. 1 en sección transversal, aparece como un pasadizo en ángulo, con una parte más interior en la entrada hacia la trampa, donde el componente de mezcla entra desde la zona central de la cámara giratoria, y adyacente al extremo cónico de la cuña 265. La entrada a la trampa forma el extremo de la trampa más cercano al eje de rotación 125. La trampa 136 también presenta una parte más exterior, que el extremo que tiene la mayor distancia radial desde el eje de rotación 125. Alternativamente, la trampa 136 puede no estar en ángulo con respecto al eje de rotación, sino que se puede disponer paralelamente al eje de

rotación. En el diámetro exterior más grande de la trampa, se proporciona un primer puerto de conexión 275, que se puede abrir de forma selectiva, tal como a través de una válvula, con el fin de permitir el acceso a la trampa para cosechar la fracción de material procesado contenida en la misma. En la carcasa exterior 101 se puede prever una abertura de acceso 270 para facilitar el acceso al primer puerto 275. En particular, cuando se vaya a acceder al primer puerto 275, una aguja o cánula de acceso (no mostrada) se puede dirigir a través de las aberturas alineadas, con el fin de permitir la cosecha de la fracción de material procesado en la trampa 136. Esto se puede lograr colocando en alineación la abertura de acceso 270, el primer puerto 275, y el puerto sellado 271. Ese puerto puede adoptar la forma de una válvula de pico de pato o de un tabique autosellante en la pared de un contenedor o recipiente 272. El contenedor 272 es un elemento anular situado en la parte inferior de la cámara de procesado 100D y su función se describirá más adelante. La alineación de la abertura de acceso 270, el primer puerto 275 y el puerto sellado 271 se puede controlar mediante diversos medios conocidos en la técnica, por ejemplo, girando a mano una parte del alojamiento exterior. Las levas 273 se suministran sobresaliendo hacia el interior desde la parte inferior de la carcasa para ajustar de forma selectiva la colocación vertical de los elementos seleccionados en el dispositivo. Alternativamente, el primer puerto puede tener capacidad de abrirse, y cerrarse, de forma selectiva durante la rotación de la cámara interior 103, de tal manera que al menos una parte del material contenido dentro de la trampa 136 se pueda expulsar de forma automática hacia una zona de recolección a la que se pueda acceder más tarde.

Durante el funcionamiento de la forma de realización representada en la Fig. 1, una carga de grasa y una solución, tal como sangre, solución salina, agua, solución tumescente, se inserta a través del tubo estacionario 235. Una vez que se ha introducido la carga, la cámara interior 103 y el elemento de tamizado 215 se hacen girar mediante el motor a una primera velocidad por medio del acoplamiento 126, manteniendo el eje del rodillo 220 estacionario, durante un primer período definido. Durante este primer período de rotación, la grasa tenderá a extenderse a lo largo del interior del elemento de tamizado debido al efecto del campo centrífugo creado por la rotación de la cámara, y el elemento de rodillo 210 forzará a la grasa a través de la malla del elemento de tamizado 215, ya que la grasa pasa entre el rodillo 210 y el elemento de tamizado 215. El material tisular se morseliza en partículas más pequeñas al ser forzado a través de las aberturas en la malla y, además, una parte de las fibras de colágeno se separa de los otros materiales en la carga y se retiene en la malla al ser envueltas alrededor de los alambres del tamiz. También es posible que al encontrar el rodillo y ser forzadas a través del tamiz, las fibras de colágeno en el material graso sean cortadas por la malla, y por lo tanto la carga del tejido se morselice en partículas de menor tamaño. Posteriormente a que la carga sea forzada a través del tamiz, la cámara interior 103 se hace girar a continuación a una segunda velocidad para centrifugar el material morselizado, y en función de las gravedades específicas de los componentes que componen el material morselizado, separar la mezcla de líquido y grasa durante un segundo período de rotación definido. Durante este segundo período, se cree que las células multipotentes más pesadas tienden a migrar a través del líquido a las superficies más exteriores de la cámara interior. En particular, mientras la cámara interior 103 se hace girar en torno al eje 125, el campo centrífugo creado creará estratificación de los componentes constituyentes por su gravedad específica, ya que el campo centrífugo impulsará a los componentes de gravedad específica más alta alejándose del eje de rotación (es decir, hacia afuera), tras lo cual se encontrarán con las paredes cónicas de la cámara interior 103 y la superficie interior de la cuña 265. La rotación continua hará que estos componentes más densos desplacen a los componentes menos densos, ya que los componentes de gravedad específica más alta se juntan a lo largo de los lados cónicos fuera del eje de rotación, tras lo cual los componentes de gravedad específica más alta a continuación entrarán y se acumularán en la trampa 136. Cuando la rotación de la cámara interior 103 se detiene al final del segundo período definido, el líquido residual se asienta en la base 118 y se recoge dentro de la zona cóncava 250, definida por la zona que está rodeada por la cuña 265 en su perímetro, y que tiene la base 118 como superficie inferior. El material graso que se ha mantenido hacia el centro del campo centrífugo, debido a la menor gravedad específica, tendrá frecuentemente la consistencia de una pasta, y tiende tanto a permanecer pegado a la parte superior de la superficie interior de la pared lateral 134, como alternativamente el material graso se puede asentar dentro de la zona cóncava 250. El líquido que contiene células multipotentes permanece en la trampa 136, en el exterior de la cuña 265, y se puede recuperar utilizando una aguja o cánula (no mostrada) para succionar el líquido y las células de la trampa 136. Según se mencionó anteriormente, la forma de realización mostrada en la Fig. 1 también proporciona un primer puerto 275, que se puede abrir y cerrar de forma selectiva mediante valvulería, para permitir la extracción de los componentes de gravedad específica más alta de la trampa 136. Además, también se puede proporcionar un segundo puerto 280, que se puede abrir y cerrar de forma selectiva mediante valvulería, para permitir la extracción de los componentes de menor gravedad específica de la zona cóncava 250. El segundo puerto 280 se puede situar en la base de la cuña 265 dentro de la zona cóncava 250. Al abrir de forma selectiva el primer o segundo puerto durante un período de tiempo mientras la cámara se está haciendo girar, se puede hacer un ajuste fino de la gravedad específica de la fracción de concentrado celular que se recoge dentro de la cámara interior 103 de una manera similar a la descrita en la solicitud de patente de EE.UU. pendiente de aprobación S.N. 13/396,600, la cual está asignada al mismo cesionario que esta invención. La centrifugadora de esa solicitud es particularmente adecuada para obtener una fracción deseada de una mezcla de líquido biológico, tal como plasma rico en plaquetas de sangre entera, o células madre de un aspirado de médula ósea; sin embargo, esa aplicación no proporciona capacidad para morselizar la estructura del tejido en la mezcla biológica, tal como el material adiposo.

En cualquiera de las diversas formas de realización descritas en la presente memoria, en donde hay una cámara que comprende uno o más de: un elemento de cuña 265, un primer puerto 275, o un segundo puerto 280, la expulsión de una o más partes de la mezcla biológica dentro de la cámara se puede ser lograr como sigue. La mezcla biológica, que ha sido clasificada por tamaño por cualquiera de los métodos descritos en la presente



memoria, se hace girar a continuación dentro de la cámara que puede girar para hacer que los contenidos se separen por gravedad específica. Por lo tanto, se formará una banda exterior de líquido de alta densidad (con una gravedad específica más alta), al girar la cámara, en la superficie más exterior de la cámara (la más alejada del eje longitudinal 125). Se formará una banda interna de líquido de baja densidad (con una gravedad específica más baja) en el líquido más cercano al centro de la cámara (más cercano al eje longitudinal 125). Entre medio, las capas más exterior e interior tendrán al menos una capa intermedia que comprenda al menos una fracción que tenga una gravedad específica entre la de la capa más interior y la de la capa más exterior. Se contempla que la rotación de la cámara y su contenido formarán un núcleo de aire, donde no hay líquido en el eje longitudinal, siempre que el volumen de líquido en la cámara sea menor que el volumen de la propia cámara. En aquellas formas de realización, donde hay una necesidad de expulsar fuera de la cámara la fracción más pesada de la mezcla biológica, por ejemplo, donde la fracción que tiene la gravedad específica más alta no contiene casi ninguna célula multipotente, esta fracción más exterior se puede descargar a través del primer puerto 275 que se puede abrir de forma selectiva que tiene una entrada dentro de la cámara a la mayor distancia del eje longitudinal, de tal manera que cuando se abre la valvulería para el primer puerto, la rotación de la cámara creará una fuerza centrífuga que impulsa al líquido con la gravedad específica más alta a salir de la cámara a través del primer puerto 275. El primer puerto debe permanecer abierto para permitir que salga de la cámara al menos una parte de la fracción con la gravedad específica más alta, tras lo cual el primer puerto se puede cerrar, ya sea por acción del operador que supervisa la ubicación de una interfaz, en la superficie cónica de la cámara, o mediante la operación de una válvula automática. Por ejemplo, el operador puede supervisar una interfaz a color que tiene lugar entre los glóbulos rojos y la fracción multipotente de células madre, la cual se puede detectar a través de una pared lateral transparente de los dispositivos centrífugos descritos en la presente memoria. Además, en aquellas formas de realización donde hay una necesidad de expulsar la fracción más ligera de la mezcla biológica, por ejemplo, donde la fracción que tiene la gravedad específica más baja no contiene casi ninguna célula multipotente, esta fracción más interior se puede descargar a través del segundo puerto 280 que se puede abrir de forma selectiva, que tiene una entrada situada dentro de la cámara a una distancia radial que es inferior a la de la distancia radial para la entrada del primer puerto 275, de tal manera que cuando se abra la valvulería para el segundo puerto, la rotación de la cámara creará una fuerza centrífuga que impulsa a la fracción del líquido con menor gravedad específica a salir de la cámara a través del segundo puerto 280. El segundo puerto puede permanecer abierto para permitir que al menos que una parte de la fracción con la gravedad específica más baja salga de la cámara, tras lo cual el segundo puerto se puede cerrar, ya sea por acción del operador o por operación de una válvula automática. En muchos casos, se puede permitir que el segundo puerto permanezca abierto hasta que el núcleo de aire, que se expande cuando el líquido sale de la cámara, llegue a la entrada del segundo puerto 280, cortando de este modo el flujo de líquido que sale del segundo puerto. De esta manera, la banda interior del líquido de menor densidad (con una menor gravedad específica) y opcionalmente, la grasa, se puede descargar a través del segundo puerto 280 y dentro del contenedor 272, dejando la fracción de concentrado deseada dentro de la zona cóncava 250, en el centro de la cámara interior 103, una vez que cese la rotación. La al menos una fracción, que tiene una gravedad específica intermedia de la de las dos fracciones expulsadas, permanecerá dentro de la cámara, y se puede recolectar a continuación mediante la inserción de una cánula en la cámara.

La Fig. 2 muestra todavía otra forma de realización alternativa de una unidad de procesado 100E. Esa unidad, aunque estructuralmente algo diferente, funciona de forma similar a la unidad de procesado 100D que se muestra en la Fig. 1, en el sentido de que la unidad 100E incluye un tamiz y una disposición de rodillos que sirve para morselizar el material tisular, según se ha descrito anteriormente. En la forma de realización de la Fig. 2, una carga de tejido se administra a la cámara interior 103, y la cámara interior se hace girar. El campo centrífugo generado por la rotación hará que la carga de tejido se extienda a lo largo del elemento de tamizado 215, tras lo cual el tejido será forzado a través del elemento de tamizado bajo la presión del rodillo 210, que gira alrededor de un eje de rodillo 220. Como antes, el paso a través del elemento de tamizado morseliza el tejido y puede retener o cortar las fibras de colágeno en la carga. El tejido morselizado continuará girando con la rotación de la cámara interior, haciendo que la estratificación de los componentes del tejido morselizado se separe por gravedad específica, con los componentes de gravedad específica más baja que son desplazados al perímetro por los componentes de gravedad específica más alta, ya que los componentes de gravedad específica más alta son impulsados lejos del eje de rotación 125.

En esta o la otra forma de realización de la unidad de procesado que tiene un elemento de tamizado 215, se puede incluir un elemento de tamizado secundario 216 opcional. En un caso de este tipo, el tejido morselizado que ha sido dirigido a través del elemento de tamizado 215, se encontrará con el elemento de tamizado secundario 216, cuando el material es dirigido hacia afuera por la fuerza de la rotación. El elemento de tamizado secundario 216 es similar al elemento de tamizado 215, excepto que tiene un tamaño medio de abertura más pequeño. Aunque el tamiz secundario 216 puede servir para morselizar adicionalmente el tejido, pretende principalmente capturar el material fibroso que no pasa fácilmente a través de las aberturas, mientras que el material líquido y no fibroso pasa a través de ellas. La utilización de esta disposición se puede beneficiar de la reducción de la velocidad de rotación mientras el material procesado se encuentra con el tamiz secundario, con el fin de evitar que fuerzas centrífugas excesivas impulsen el material a través del tamiz, donde una rotación más lenta ayudaría a capturar el material fibroso contra el tamiz al tiempo que se impulsa el líquido a través de las aberturas.

Como se debería apreciar por los expertos en la técnica por referencia a la Fig. 2, mientras la rotación está en curso, los componentes de gravedad específica más alta, bajo la fuerza generada por la rotación de la cámara interior, se acumularán en la trampa 136. Al cesar la rotación de la cámara interior 103, todo el material que no es retenido dentro de la trampa, caerá, bajo la influencia de la gravedad, dentro de una zona cóncava 250 en el centro de la

cámara interior. Una cánula, aguja o tubo se puede insertar entonces a través de una ruta de acceso creada por los puertos 138 y 137 cerca de la parte superior del dispositivo, opcionalmente dirigida a través de una abertura proporcionada cerca de la parte superior del elemento de tamizado secundario 216 opcional, y dirigida dentro de la trampa 136, con el fin de cosechar el componente con la gravedad específica más alta, que incluye las células multipotentes, dejando al mismo tiempo los componentes no deseados dentro de la zona cóncava 250.

En las diversas formas de realización descritas en la presente memoria, el ángulo de la cámara interior y la cuña, con respecto al eje de rotación, afectará a cómo de fuerte, y por lo tanto cómo de rápido ocurrirá la estratificación de los diversos componentes. Por ejemplo, en una forma de realización donde el ángulo de la cámara interior y la cuña es pequeño, la separación de los componentes requerirá un periodo de tiempo de rotación aumentado, o alternativamente se pueden requerir velocidades de rotación más altas para impulsar la separación. Por el contrario, en una forma de realización donde la cámara interior y la cuña están en un ángulo pronunciado, fuera del eje de rotación 125, este ángulo pronunciado tenderá a producir una separación más enérgica y rápida de los componentes. El ángulo requerido se puede adaptar a la viscosidad del líquido que se está procesando. Por ejemplo, cuando la carga de tejido es de alta viscosidad, se cree que un ángulo pronunciado permitirá un movimiento más efectivo de los componentes más pesados a través del líquido. Alternativamente, cuando la carga del líquido es menos viscosa, puede ser posible emplear un ángulo pequeño, y todavía lograr una separación adecuada de los componentes. El objetivo de lograr una rápida separación de los componentes es vital, ya que se cree que la duración prolongada de la exposición de las células vivas a fuerzas G elevadas durante la separación puede afectar negativamente a la viabilidad de las células. Por lo tanto, se cree que minimizar el período de tiempo en el que las células se hacen girar a alta velocidad conducirá a una mejor viabilidad del material celular procesado. En la práctica de las diversas formas de realización descritas en la presente memoria, se anticipa que el ángulo de la cámara interior y la cuña será probablemente entre 5 grados y 30 grados, pero también pueden trabajar adecuadamente ángulos de hasta 45 o 60.

En las diversas formas de realización descritas en la presente memoria, también puede haber un beneficio en ayudar en la separación de las células multipotentes de la red de colágeno fibroso en la mezcla biológica, tal como por ejemplo añadiendo un volumen de suero salino u otros líquidos (por ejemplo, sangre, aspirado de médula ósea, u otros líquidos corporales, soluciones tampón, medios de cultivo celular, soluciones detergentes, soluciones terapéuticas tales como antibióticos o anticoagulantes, etc.), según se ha descrito anteriormente. Este líquido adicional añadido al tejido graso cosechado puede servir para disminuir la viscosidad general de la mezcla biológica, lo que a su vez proporcionará un movimiento más eficaz de los componentes de la mezcla en capas estratificadas al exponerse a las fuerzas de rotación. Además, el líquido añadido puede mejorar la separación de la concentración celular deseada de las otras partes de la muestra de tejido. Por ejemplo, la adición de sangre entera o de aspirado de médula ósea, cuando se separa por densidad, dará como resultado que la capa leuco-plaquetaria rica en plaquetas se entremezcle con las células madre multipotentes de la muestra de tejido adiposo, ya que tendrían gravedades específicas similares. Los glóbulos rojos, debido a su gravedad específica más alta en la muestra combinada, tenderían a acumularse en la capa exterior dentro de la cámara giratoria. El plasma de la sangre entera formará una capa de separación entre las células multipotentes y el tejido graso. Las plaquetas probablemente formarán una capa adyacente y/o se entremezclarán con las células multipotentes. Además, la adición de sangre entera o de aspirado de médula ósea también proporcionaría un indicador visual por color. La estratificación radial se produciría con capas que forman, en orden desde el extremo más exterior al más interior, con los glóbulos rojos más al exterior, las células multipotentes y las plaquetas al lado, el plasma transparente al lado y el tejido adiposo radialmente más al interior, con el límite de los glóbulos rojos que marca el borde de la fracción con los componentes celulares deseados. Además, la adición de un líquido al tejido adiposo probablemente serviría para diluir la epinefrina y la lidocaína que se puedan haber añadido para la recolección de la muestra de grasa.

Además, se contempla que puede haber un beneficio para las diversas formas de realización descritas en la presente memoria al proporcionar una etapa de agitación después de la etapa de morselización, en donde el dispositivo de centrifugación se opera de una manera que impartiría un suave, movimiento de mezcla a la mezcla biológica, con el fin de asegurar que las células se separan adicionalmente de la red fibrosa. La mezcla suave serviría de este modo para evitar someter a las células a los efectos potencialmente nocivos de fuerzas G elevadas y prolongadas para lograr la separación de las células de la red fibrosa, ya que se cree que los largos periodos de rotación a alta velocidad pueden ser perjudiciales para la viabilidad celular. Esta suave acción de mezclado se puede lograr mediante movimientos orbitales aleatorios, tales como balancearse fuera del eje, o alternativamente iniciando y deteniendo la rotación del dispositivo, o variando la velocidad de rotación del dispositivo. Por ejemplo, el dispositivo se puede hacer girar de forma oscilante, a baja frecuencia (por ejemplo, menos de 10 Hz, preferiblemente alrededor de 1 Hz) y someter las células a fuerzas G bajas, para liberar las células multipotentes de la red de fibras grasas y residuales, o mezclar líquido adicional en la carga de tejido. El efecto de la mezcla se puede mejorar incluyendo salientes, tales como dedos, nervios o aletas radiales, que se extiendan hacia la cámara giratoria. Dichos salientes se pueden disponer como elementos verticales, elementos en espiral, o combinaciones de los mismos, en la superficie de al menos una de la cuña 265, la superficie exterior de la malla del elemento de tamizado 215, la superficie interior de la pared lateral cónica 134, y la base 118, siempre y cuando se extienda una característica de mezcla en la zona cóncava 250. El movimiento oscilante sería muy similar durante el funcionamiento al de una lavadora de ropa convencional, donde el movimiento alternante arranque-parada y, opcionalmente, el movimiento oscilante, todo ello a velocidades mucho más bajas que las necesarias para lograr la separación centrifuga, no debería dar como resultado una reducción significativa de la viabilidad celular, todo ello al tiempo que proporciona la

ventaja de ayudar a disociar mecánicamente las células del material fibroso graso y residual y de otros componentes de la mezcla biológica.

Otra forma de realización alternativa de una unidad de procesado 100F construida de acuerdo con esta invención se muestra en la Fig. 4. La centrifugadora que utiliza esa forma de realización está diseñada para procesar el material tisular en fragmentos más pequeños morselizando el tejido, pasando el material a través de un primer tamiz 215, con la ayuda del elemento de rodillo 210, según se describió anteriormente. En esta forma de realización, sin embargo, el primer tamiz 215 se configura para morselizar el material en fragmentos más pequeños, pero no para separar las células de la estructura del material tisular, con el fin de garantizar que las células permanezcan contenidas dentro de la estructura nativa del material tisular morselizado. En esta forma de realización, el tamiz secundario 216 es una banda más pequeña más cerca de la entrada a la trampa 136, y presenta aberturas que permiten el paso de material líquido, mientras que retienen el material tisular que contiene células. De esta manera, cualquier líquido exógeno (por ejemplo, solución salina, epinefrina, lidocaína, etc.) agregado para la recolección del material tisular puede pasar a través del segundo tamiz 216, y recolectarse en la trampa 136, mientras que las células permanecerían en la estructura nativa del material tisular. Una vez que se logra la separación del líquido del tejido, el material tisular que contiene células se puede extraer del interior de la cámara interior 103, tal como mediante la aspiración con una cánula u otro instrumento luminal hueco dirigido a través de los puertos 138 y 137. Cuando a la célula que contiene el material tisular se le han extraído la mayoría de los líquidos mediante el tamiz secundario 216 y, como tal, no es adecuada para la aspiración descrita anteriormente, se contempla que el operador pueda simplemente abrir el dispositivo, utilizando técnicas que sean conocidas por los expertos en la técnica, para acceder dentro de la cámara interior 103 y recolectar manualmente el material tisular que contiene la célula.

Según se debe apreciar por los expertos en la técnica, la forma de realización de la Fig. 4 debe ser útil cuando una aplicación clínica particular justifique la adición de un andamiaje, tal como cuando sea necesario proporcionar un agente de carga a un lugar de tratamiento (por ejemplo, cirugía plástica, reducción de arrugas estéticas, etc.); o alternativamente, en procedimientos en los que sea deseable evitar el lavado de las células cosechadas, por ejemplo, en la cirugía artroscópica en la que la irrigación salina se utiliza de forma común, y sería beneficioso el mantenimiento de las células administradas en el lugar deseado.

Otra forma de realización alternativa de una unidad de procesado 100G construida de acuerdo con esta invención se muestra en la Fig. 5. La centrifugadora de esa forma de realización se diseña para procesar el material tisular en fragmentos más pequeños morselizando el tejido, donde el material tisular se pasa entre un elemento de rodillo 210' dispuesto para rodar en su sitio contra un elemento anular giratorio 215', de una manera según se ha descrito anteriormente. Se prevé que el elemento anular 215' pueda ser un material de tamizado con malla, según se describió anteriormente, o pueda presentar alternativamente una superficie impermeable. Preferiblemente, una cualquiera, o ambas, de la superficie del rodillo 210', o la superficie del elemento anular 215' presenta una topografía irregular. Esto se puede lograr proporcionando regiones bajo relieve y zonas salientes en la superficie del rodillo cilíndrico 210'. Por ejemplo, proporcionando al menos un canal en bajo relieve, y dejando zonas que sobresalgan entre los canales, y por lo tanto presentando una superficie similar a la superficie de una plancha para gofres. Alternativamente, la topografía irregular de tanto el rodillo 210' como del elemento anular 215' puede presentar protuberancias o bultos, o hoyuelos en bajo relieve. Lo que se busca es que el tejido, al ser apretado entre el elemento de rodillo 210' y el elemento anular 215', experimente mayores grados de interrupción debido a las superficies que sobresalen, y se creen de este modo fuerzas brutas concentradas en algunos de los tejidos a medida que pasan por el rodillo. Se cree que estas fuerzas brutas proporcionarán una lechada morselizada, en la que las células multipotentes se liberan de la contención del material fibroso. En estas formas de realización, se prevé que todo el material tisular que ha sido procesado sea recolectado y utilizado a continuación en una aplicación clínica, por ejemplo, como agente de carga administrado en un sitio de tratamiento, o en procedimientos en los que sea deseable evitar el lavado de las células cosechadas, según se ha descrito anteriormente con respecto a la Fig. 4. En el caso de que el elemento anular 215' sea un tamiz de malla, el tejido morselizado se recolectará de la zona cóncava 250, por medio de la vía de acceso establecida a través de los puertos 137 y 138, según se ha descrito anteriormente. Sin embargo, cuando el elemento anular 215' sea una superficie no permeable, el tejido morselizado permanecerá dentro del interior del elemento anular 215' después del procesado, y luego se podrá recolectar con una cánula o aguja insertada a través del tubo estacionario.

Debido a los métodos únicos de morselizar el tejido, según se describe en la presente memoria, al pasar el material tisular a través de un elemento de tamizado de malla, se prevé que el material tisular que se procesa se reducirá a un tamaño de partícula adecuado para la reimplantación, pero no se prevé que cause daño a los componentes celulares y a la estructura tisular, tal como puede ocurrir al procesar en exceso el tejido a un tamaño de partícula que sea demasiado pequeño. Se prevé que al proporcionar un tejido que se procesa a un tamaño de partícula adecuado, el material habrá preservado la viabilidad celular, manteniendo al mismo tiempo una estructura tisular adecuada con el fin de que no sea susceptible al lavado o a una pérdida de volumen significativa una vez implantado.

Otra forma de realización de una unidad de procesado 100J construida de acuerdo con esta invención se muestra en la Fig. 6. La forma de realización de la Fig. 6 es similar a la de la Fig. 1, con la distinción de que los siguientes elementos de la Fig. 1 están ausentes de la Fig. 6: cuña 265, trampa 136, primer puerto 275. Además, la base 118 ahora se extiende directamente a la superficie interior de la pared lateral 134, en forma de cono, en lugar de formar un elemento de cuña.

Según se puede ver en la forma de realización de ejemplo de la Fig. 6, la mezcla biológica se debe introducir en la cámara 103 y se debe clasificar por tamaño pasando por el elemento de tamizado 215, según se describe con referencia a la Fig. 1. Al girar la cámara 103, el material será impulsado a través del elemento de tamizado 215 por el elemento de rodillo 210, según se describió anteriormente. El hecho de pasar a través del tamiz puede alterar la estructura del material tisular, de modo que se liberen las células madre multipotentes de la estructura. La rotación continua de la cámara 103 provocará la separación de la mezcla biológica por gravedad específica, según se ha descrito anteriormente. En el caso de que la mezcla biológica comprenda grasa y agua o solución tumescente, al separarse, las células madre multipotentes, que tienen una gravedad específica más alta que la grasa o el agua, se acumularán en la capa más exterior dentro de la cámara giratoria. Al menos una parte de la fracción más interior se puede descargar abriendo la valvulería para el puerto 280. Se contempla que los componentes de grasa y agua serían descargados a continuación de la cámara 103 a través del puerto 280, hasta que el núcleo de aire encuentre la entrada al puerto 280, y detenga la descarga. Se contempla que la fracción de la mezcla biológica que queda dentro de la cámara incluiría las células madre multipotentes, que ahora se han concentrado mediante la extracción de grasa y agua de la mezcla biológica. Al detener la rotación de la cámara, la fracción restante se acumulará en el centro de la cámara para su recolección.

Se debe señalar fuera en esta coyuntura que cualquiera de las formas de realización de ejemplo descritas anteriormente (o cualesquiera otras formas de realización construidas de acuerdo con las enseñanzas de esta invención) producirá una fracción celular concentrada que se puede combinar de forma útil con (por ejemplo, hidratada en, mezclada con, amasada en, proporcionada como un depósito dentro, o estratificada en) un andamiaje sintético o natural o estructura que se puede implantar en un sitio de tratamiento de un ser vivo. Dicha combinación de la fracción celular con el andamiaje se puede lograr de diversas maneras, por ejemplo, hidratando el andamiaje con la fracción celular, mezclando la fracción celular con el material de andamiaje, amasando el material de andamiaje y la fracción celular juntos, proporcionando la fracción celular como un depósito contenido dentro del material de andamiaje, recubriendo el andamiaje con la fracción celular, aplicando la fracción celular como capa junto con un material de andamiaje, añadiendo secuencialmente la fracción celular a un sitio objetivo seguido de la colocación de un material de andamiaje en el sitio objetivo, o viceversa. Otros varios procedimientos para combinar un andamiaje con una fracción celular pueden ser bien conocidos por los expertos en la técnica y pueden ser adecuados para utilizar con la fracción celular creada según se describe en la presente memoria.

Además, aunque las formas de realización descritas anteriormente se han centrado en la concentración de células multipotentes, en cualquiera de las formas de realización se reconoce que se pueden concentrar varias células junto con las células multipotentes, o en lugar de ellas, lo que puede incluir a los adipocitos, así como la fracción vascular estromal (SVF) de las células, que incluye los preadipocitos, los fibroblastos, las células endoteliales vasculares y una variedad de células inmunitarias (por ejemplo, los macrófagos de tejido adiposo, etc.). Se contempla que manipulando la ubicación de los puertos de salida 275 y 280, se puede controlar el rango de gravedades específicas a ser recolectadas, de tal manera que la totalidad de la muestra, o sólo una parte seleccionada de los componentes celulares en la muestra se pueda aislar a través de la utilización de las diversas formas de realización descritas en la presente memoria.

Las formas de realización descritas anteriormente pueden estar disponibles en forma de kit, incluyendo el dispositivo de centrifugación y los accesorios necesarios para el funcionamiento del dispositivo, incluyendo las instrucciones de uso y el embalaje adecuado para el almacenamiento y la preservación de la esterilidad. En algunos casos, el kit puede proporcionar instrucciones junto con el dispositivo de centrifugación (ya sea como una sola unidad o como componentes distintos) y, opcionalmente, incluir accesorios tales como agujas, jeringas, cánulas, lidocaína, epinefrina, solución tumescente, kits de liposucción e instrucciones de uso.

Según se debería apreciar por los expertos en la técnica a partir de lo anterior, el aparato y los métodos de esta invención se pueden utilizar para proporcionar un concentrado inyectable con una cantidad más grande de células multipotentes que sea comparable o mejor que el aspirado concentrado de médula ósea del mismo volumen sin requerir la necesidad de una punción dolorosa de la cresta ilíaca para cosechar células de la misma. Además, la invención objetivo permite reducir el tiempo del procesado de obtención de una muestra de células multipotentes utilizables, a unos pocos minutos, con el fin de permitir la utilización del equipo en el operatorio *ad-hoc*, si así se requiere. Todavía adicionalmente la invención objetivo elimina la necesidad de la utilización de enzimas o productos químicos para ser añadidos a la muestra a procesar, los cuales todavía tendrían que ser lavados de la muestra, antes de ser inyectada de vuelta al paciente. Por lo tanto, la invención objetivo supera las ineficiencias de los tratamientos enzimáticos, que normalmente conducen a rendimientos celulares más bajos.

Para cualquiera de las formas de realización descritas anteriormente, se contempla incluir opcionalmente una fuente de calentamiento, para mantener la mezcla biológica a una temperatura por encima de la temperatura ambiente. Esto puede ser útil porque el aumento de la temperatura, preferiblemente a la temperatura corporal (37 °C), serviría para reducir la viscosidad del tejido adiposo. De esta manera, cuando el tejido se procesa, se puede mejorar la viabilidad celular ya que las células, por ejemplo, las células madre multipotentes, estarían expuestas a niveles más bajos de tensión de cizallamiento durante el procesado. Por el contrario, cuando el procesado se realiza a una temperatura más baja, la viscosidad del tejido adiposo aumentaría, y potencialmente dañaría la viabilidad celular debido al aumento de la tensión de cizallamiento que se produciría al ser procesado por cualquiera de las formas de realización descritas en la presente memoria.

**REIVINDICACIONES**

1. Una centrifugadora para concentrar de forma selectiva al menos un componente de una mezcla biológica que comprende tejido adiposo, teniendo los componentes diferentes gravedades específicas y pudiendo ser estratificados en un campo centrífugo producido por dicha centrifugadora, comprendiendo dicha centrifugadora una cámara interior (103) dispuesta para recibir la mezcla biológica y que tiene un eje longitudinal central (125) en torno al cual se dispone dicha cámara interior para hacerla girar, comprendiendo dicha cámara interior una pared lateral (134) con una superficie interior cónica, una base (118) y un tamiz anular (215, 215'), teniendo dicho tamiz anular (215, 215') una superficie interior y estando situado a una primera distancia radial de dicho eje longitudinal central (125), sobresaliendo dicho tamiz anular alejándose de dicha base (118), y teniendo un primer puerto (275) una entrada a una segunda distancia radial de dicho eje longitudinal,
- 5 en donde dicha cámara interior comprende además al menos un rodillo (210, 210') dispuesto para rodar de forma efectiva alrededor de superficie interior de dicho tamiz anular (215, 215') para impulsar al menos una parte de dicha mezcla biológica a través de dicho tamiz anular (215, 215') y lejos de dicho eje longitudinal central (125) y hacia dicha pared lateral cónica (134).
- 15 2. La centrifugadora de la reivindicación 1, en donde la base (118) comprende además un elemento de cuña (265) que se extiende desde dicha base (118) hacia el interior de la cámara y que tiene un extremo de cuña a una tercera distancia radial desde dicho eje longitudinal central (125).
3. La centrifugadora de la reivindicación 1, en donde la cámara interior (103) comprende además una trampa (136), estando dicha trampa (136) situada en dicha cámara interior (103) adyacente a dicha superficie interior de dicha pared lateral (134), y dicha cámara interior (103) comprende además un segundo puerto (280) que tiene una entrada a una cuarta distancia radial desde dicho eje longitudinal (125), y dicha entrada para dicho segundo puerto se sitúa dentro de dicha trampa (136).
- 20 4. La centrifugadora de la reivindicación 3, en donde dicha cuarta distancia radial es mayor que dicha tercera distancia radial, dicha tercera distancia radial es mayor que dicha segunda distancia radial y dicha segunda distancia radial es mayor que dicha primera distancia radial.
- 25 5. La centrifugadora de la reivindicación 1, en donde dicha cámara interior comprende además al menos un eje de rodillo (220) que se extiende paralelo a dicho eje longitudinal central (125), estando dispuesto dicho al menos un rodillo (210, 210') para girar en torno a dicho al menos un eje de rodillo (220) para rodar alrededor de dicha superficie interior de dicho tamiz anular (215, 215').
- 30 6. La centrifugadora de la reivindicación 5, en donde dicho al menos un eje de rodillo (220) se mantiene estacionario con respecto a dicha cámara interior (103).
7. La centrifugadora de la reivindicación 1 en donde dicho tamiz anular (215, 215') es un material perforado seleccionado a partir del grupo que consta de tamiz de malla de alambre, tamiz de malla de polímero, tubería metálica perforada y tubería de polímero perforada.
- 35 8. La centrifugadora de la reivindicación 1, que comprende además una trampa (136) y al menos un puerto (280) y una válvula para expulsar de forma selectiva de dicha trampa (136) al menos una parte de al menos una de dichas capas componentes.
9. La centrifugadora de la reivindicación 1, en donde el tamiz anular (215, 215') comprende varias aberturas en el rango de aproximadamente 0,04 pulgadas hasta aproximadamente 0,002 pulgadas.
- 40 10. La centrifugadora de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde el tamiz anular (215, 215') se configura para morselizar la mezcla biológica.
11. La centrifugadora de reivindicación 1, en donde el primer puerto (275) se puede abrir de forma selectiva para permitir la descarga de al menos una parte de un componente de la mezcla biológica de dicha cámara.
- 45 12. La centrifugadora de la reivindicación 3 o 4, en donde el primer puerto (275) se puede abrir de forma selectiva para permitir la descarga de al menos una parte de un componente de la mezcla biológica de dicha cámara.
13. La centrifugadora de la reivindicación 3 o 4, en donde el primer puerto (275) y segundo puerto (280) se pueden abrir de forma selectiva para permitir la descarga de al menos una parte de un componente de la mezcla biológica de dicha cámara.
- 50 14. La centrifugadora de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 en donde el rodillo (210, 210') se dispone para rodar contra la superficie interior del tamiz anular (215, 215').

Fig. 1

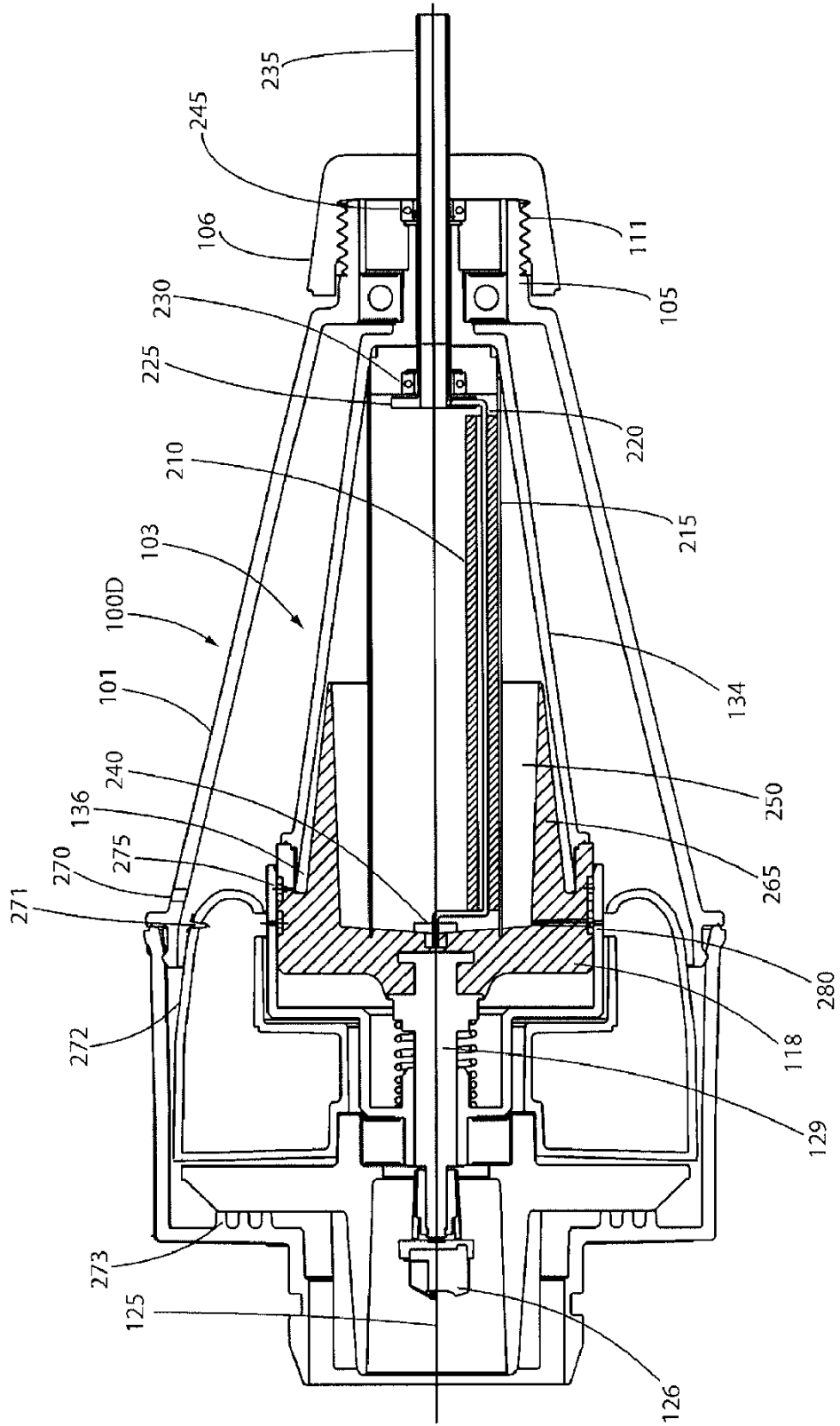


Fig. 2

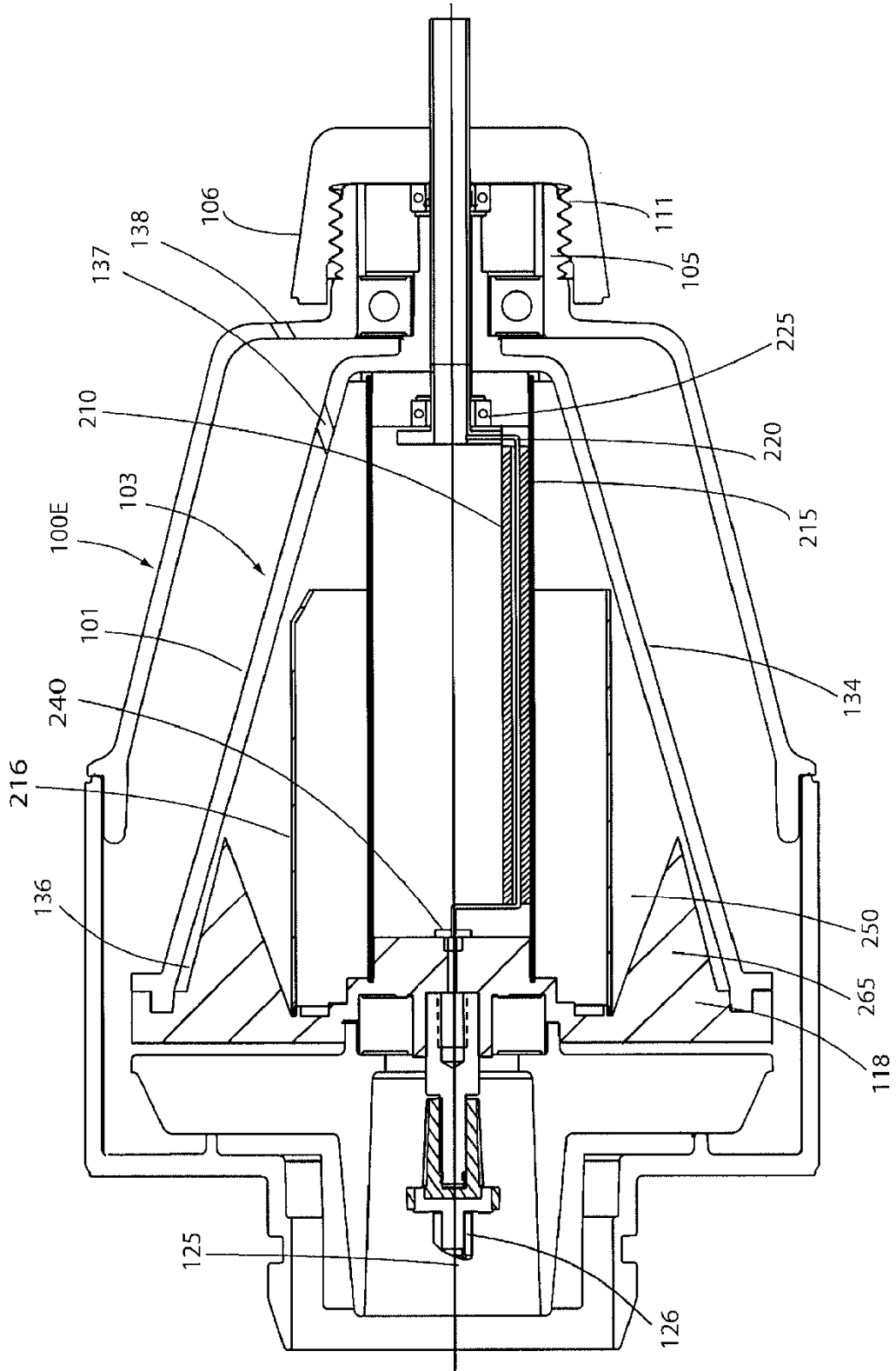


Fig. 3A

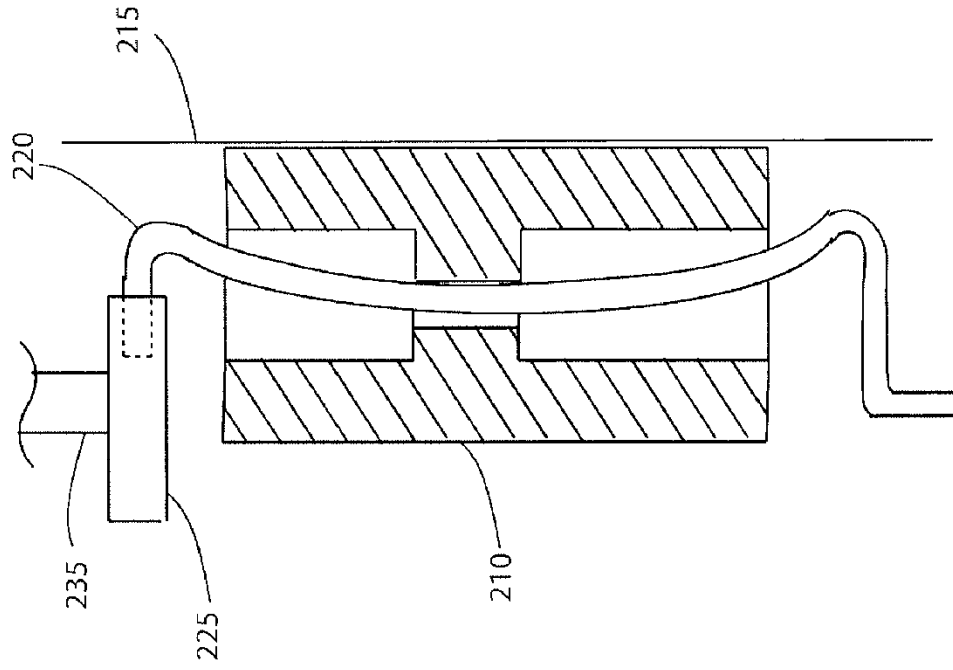


Fig. 3B

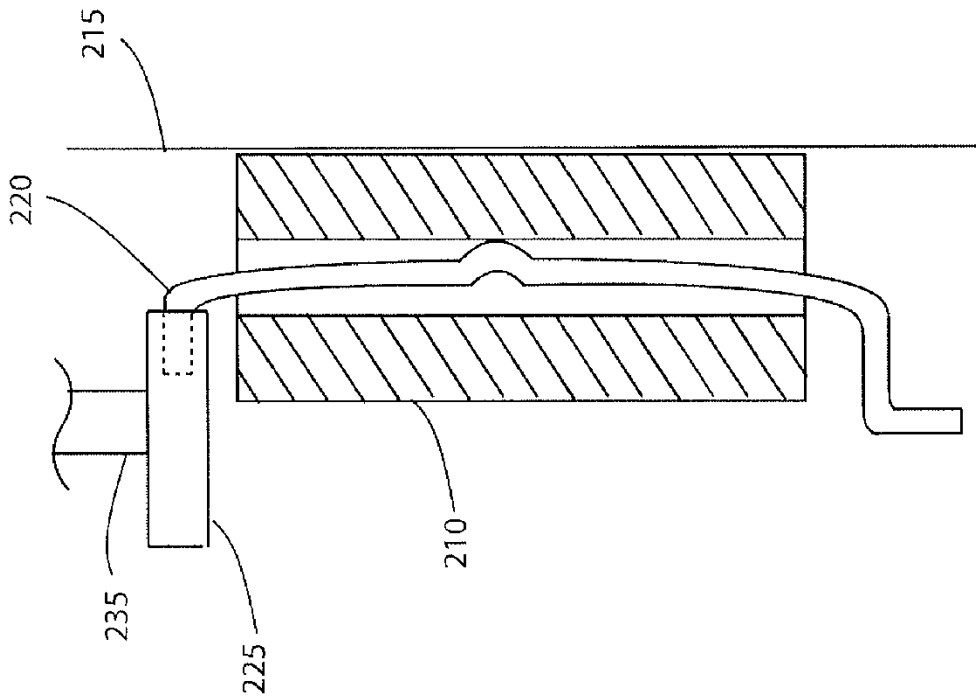




Fig. 4

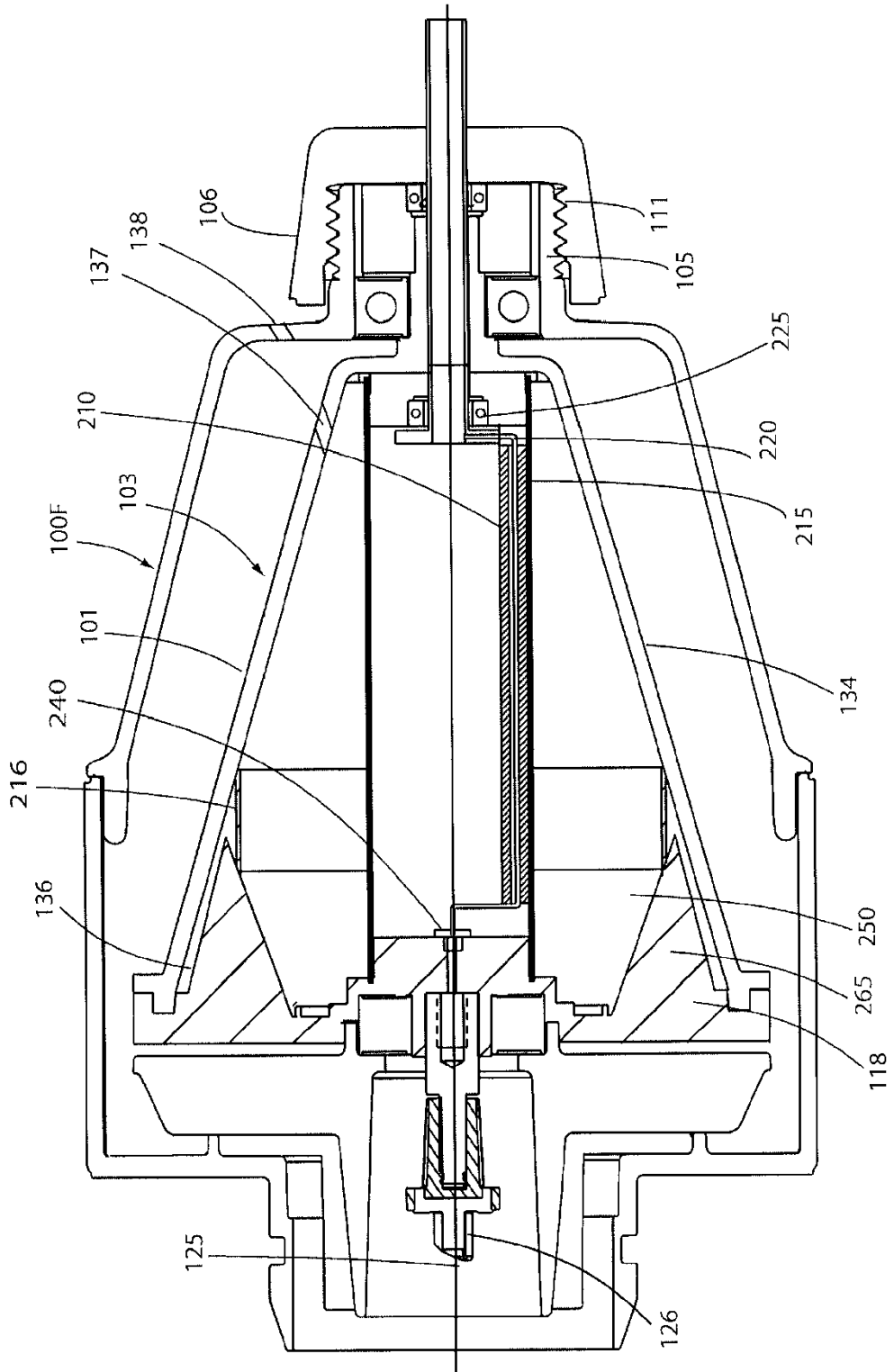


Fig. 5

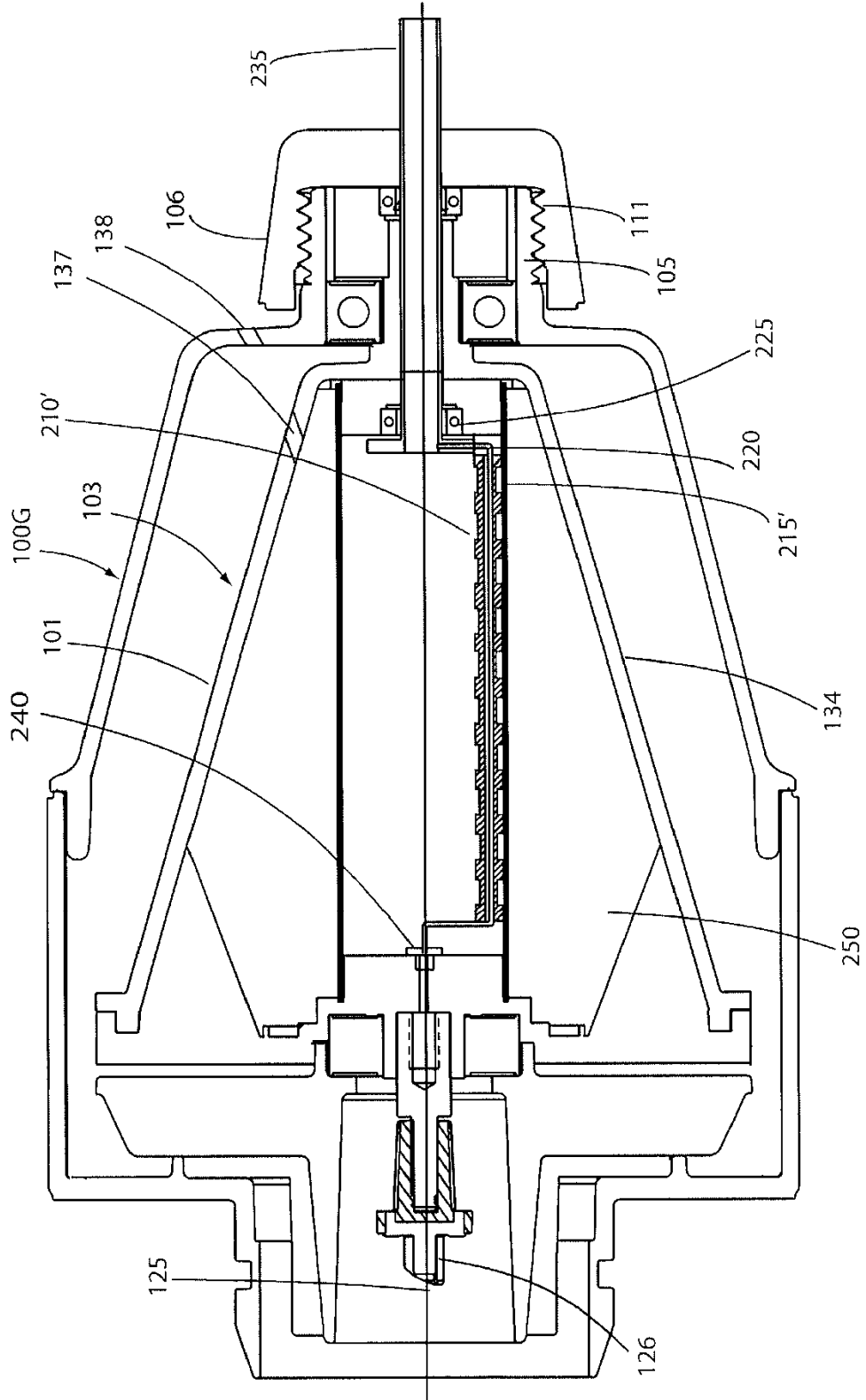


Fig. 6

