



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 351 341**

51 Int. Cl.:
C12N 5/0775 (2006.01)
C12N 5/071 (2006.01)
C12N 5/074 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04777586 .1**
96 Fecha de presentación : **01.07.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1778834**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.05.2007**

54 Título: **Procedimientos de uso de células regenerativas en el tratamiento de trastornos y enfermedades renales.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
03.02.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
03.02.2011

73 Titular/es: **CYTORI THERAPEUTICS, Inc.**
3020 Callan Road
San Diego, California 92121, US

72 Inventor/es: **Fraser, John, K.;**
Hedrick, Marc, H. y
Daniels, Eric

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 351 341 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**ANTECEDENTES DE LA INVENCION****1. Campo de la invención**

La presente invención se refiere generalmente al uso de una composición que comprende células regenerativas derivadas de tejido adiposo (por ejemplo, células madre y/o progenitoras) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente con necrosis tubular aguda (NTA), en el que dichas células regenerativas derivadas de tejido adiposo se obtienen procesando tejido adiposo de dicho paciente en un sistema, que está configurado para mantener una ruta de fluido/tejido estéril cerrada, comprendiendo dicho sistema una cámara de recogida conectada a una cámara de mezclado/procesamiento.

2. Descripción de la técnica relacionada

La insuficiencia renal aguda (IRA) se define como una disminución súbita o rápida en la función renal (del riñón). La IRA se produce cuando altos niveles de toxinas urémicas, es decir, productos de desecho del metabolismo del cuerpo, se acumulan en la sangre, y los riñones no pueden excretar la cantidad requerida de las toxinas a través de la orina. Dado que se requiere sólo un riñón para filtrar adecuadamente la sangre, la aparición de IRA indica generalmente que ambos riñones no están funcionando tal como se necesita.

La IRA puede producirse en tres situaciones clínicas que se denominan por su ubicación dentro del sistema renal, es decir, IRA prerrenal, IRA intrínseca y IRA postrenal. La IRA prerrenal es una respuesta adaptativa a la grave hipotensión y agotamiento del volumen y se caracteriza por nefronas estructural y funcionalmente intactas. La IRA postrenal es el resultado de una obstrucción al paso de la orina. La IRA intrínseca es generalmente la forma más perjudicial de IRA porque es una respuesta a ataques citotóxicos al riñón y da como resultado daño estructural y funcional que puede ser irreversible.

En el entorno hospitalario, la causa más común de IRA intrínseca es la necrosis tubular aguda (NTA). La NTA es la muerte de las células tubulares. Los túbulos son estructuras extremadamente activas en el riñón. Transportan orina a los uréteres y, en el proceso, alteran la orina y sus componentes químicos. Estudios han mostrado que por cada 200 litros de fluido que se filtra a través de los glomérulos, el 99% se reabsorbe en los túbulos. La NTA, o muerte de células tubulares, se produce cuando las células no consiguen suficiente oxígeno (NTA isquémica) o cuando se han expuesto las células a una molécula o fármaco tóxico (NTA nefrotóxica). La NTA isquémica es la causa más común de IRA en el entorno hospitalario porque los pacientes del hospital a menudo tienen problemas médicos agudos que limitan el oxígeno suministrado a los túbulos o que provocan hipoperfusión tubular (flujo sanguíneo

disminuido) (Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute Renal Failure. N. Engl J Med. 334:1448-1460).

La IRA es la causa más común de muerte en pacientes hospitalizados en los Estados Unidos. Parte de la razón de esta tasa de mortalidad se encuentra en la capacidad limitada de las células tubulares del riñón para autorrepararse tras el daño isquémico. Por tanto, los pacientes con IRA a menudo padecen riñones dañados de manera irreversible. Aunque las terapias de reemplazo renal (RRT), es decir, diálisis, pueden tratar eficazmente complicaciones potencialmente mortales de la IRA tales como convulsiones, hemorragia y coma, otros factores de riesgo prevalentes en pacientes hospitalizados (tales como edad avanzada y enfermedades subyacentes) siguen provocando una alta tasa de mortalidad a pesar de la disponibilidad de RRT.

Una alternativa a la terapia de trasplante es el uso de la medicina regenerativa para reparar y regenerar células renales dañadas, por ejemplo, células tubulares. La medicina regenerativa aprovecha, de una manera clínicamente dirigida, la capacidad de las células madre (es decir, las células maestras no especializadas del cuerpo) para autorrenovarse indefinidamente y desarrollarse en células especializadas maduras. Por ejemplo, se han usado células madre adultas (ASC) de médula ósea en estudios preclínicos para el tratamiento de la NTA (Kale S. *et al.* Bone Marrow Stem Cells Contribute to Repair of the Ischemically Injured Renal Tubule. JCL 112: 42-49, 2003; Poulson R, *et al.* Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. J Pathol; 195: 229-235. 2001).

Sin embargo, aunque se ha mostrado que las poblaciones de ASC están presentes en uno o más de médula ósea, piel, músculo, hígado y cerebro (Jiang *et al.*, 2002b; Alison, 1998; Crosby y Strain, 2001), su frecuencia en estos tejidos es baja. Por ejemplo, la frecuencia de células madre mesenquimales en la médula ósea se estima a entre 1 en 100.000 y 1 en 1.000.000 de células nucleadas (Dippolito *et al.*, 1999; Banfi *et al.*, 2001; Falla *et al.*, 1993). De manera similar, la extracción de ASC de la piel implica una serie complicada de etapas de cultivo celular a lo largo de varias semanas (Toma *et al.*, 2001) y la aplicación clínica de ASC derivadas de músculo esquelético requiere una fase de cultivo de dos a tres semanas (Hagege *et al.*, 2003). Por tanto, cualquier aplicación clínica propuesta de las ASC de tales tejidos requiere aumentar el número de células, la pureza y la madurez mediante procedimientos de purificación celular y cultivo celular.

Aunque las etapas del cultivo celular pueden proporcionar un aumento del número de células, la pureza y la madurez, lo hacen a un precio. Este precio puede incluir una o más de las siguientes dificultades técnicas: pérdida de la función celular debido a envejecimiento celular, pérdida de poblaciones de células no madre potencialmente útiles, retrasos en la

aplicación potencial de las células a los pacientes, aumento del coste monetario y aumento del riesgo de contaminación de las células con microorganismos ambientales durante el cultivo. Estudios recientes que examinan los efectos terapéuticos de las ASC derivadas de médula ósea han usado esencialmente médula completa para salvar los problemas asociados con el cultivo celular (Horwitz *et al.*, 2001; Orlic *et al.*, 2001; Stamm *et al.*, 2003; Strauer *et al.*, 2002). Sin embargo, los beneficios clínicos han estado por debajo de los óptimos, un desenlace que está casi seguro relacionado con la pureza y dosis de ASC limitadas disponibles intrínsecamente en la médula ósea.

Recientemente, se ha mostrado que el tejido adiposo es una fuente de ASC (Zuk *et al.*, 2001; Zuk *et al.*, 2002). El tejido adiposo (a diferencia de la médula, la piel, el hígado y el cerebro) es de modo análogo fácil de recoger en cantidades relativamente grandes con baja morbilidad (Commons *et al.*, 2001; Katz *et al.*, 2001b). Sin embargo, en la técnica se carece de procedimientos adecuados para recoger ASC derivadas de tejido adiposo. Los procedimientos existentes padecen varias deficiencias. Por ejemplo, los procedimientos existentes carecen de automatización parcial o total, un sistema parcial o completamente cerrado, capacidad de deshacerse de los componentes, etc.

Dado el enorme potencial terapéutico de las ASC derivadas de tejido adiposo para regenerar y reparar las células renales, existe una necesidad en la técnica de un procedimiento para recoger células del tejido adiposo que produzca una población de células madre adultas con aumento del rendimiento, la consistencia y/o pureza y lo haga tan rápida y fiablemente con una necesidad disminuida o inexistente de manipulación tras la extracción.

SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende células regenerativas derivadas de tejido adiposo, por ejemplo, células madre y progenitoras adultas en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente con necrosis tubular aguda (NTA), en el que se obtienen dichas células regenerativas derivadas de tejido adiposo procesando tejido adiposo de dicho paciente en un sistema, que está configurado para mantener una ruta de fluido/tejido estéril cerrada, comprendiendo dicho sistema una cámara de recogida conectada a una cámara de mezclado/procesamiento. Por consiguiente, en una realización general, el medicamento fabricado según la presente invención se coloca directamente dentro de un receptor junto con tales aditivos necesarios para promover, engendrar o mantener un benéfico renal terapéutico.

En realizaciones específicas, la presente invención se refiere al uso de una composición que comprende células regenerativas derivadas de tejido adiposo en la fabricación de un

medicamento para el tratamiento de un paciente con necrosis tubular aguda (NTA, en el que dichas células regenerativas derivadas de tejido adiposo se obtienen procesando tejido adiposo de dicho paciente en un sistema, que está configurado para mantener una ruta de fluido/tejido estéril cerrada, comprendiendo dicho sistema una cámara de recogida conectada a una
5 cámara de mezclado/procesamiento. Las células regenerativas pueden estar compuestas de, por ejemplo, células madre, células progenitoras o una combinación de las mismas. Puede necesitarse la administración de múltiples dosis de células regenerativas para derivar un beneficio terapéutico. Además, pueden administrarse aditivos tales como uno o más factores de crecimiento con las células regenerativas. En una realización preferida, las células
10 regenerativas se administran con factores de crecimiento angiogénicos solos o en combinación con otros aditivos. Las células regenerativas pueden administrarse también con uno o más fármacos inmunosupresores.

Las vías de administración para las células regenerativas se conocen en la técnica e incluyen vías de administración intravenosa, intraarterial o intraparenquimal. Las células puede
15 administrarse a, por ejemplo, la vasculatura renal del paciente.

Antes del uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente con necrosis tubular aguda (NTA), las células regenerativas pueden hacerse crecer en cultivo celular para, por ejemplo, promover la diferenciación hacia un fenotipo renal y/o endotelial. El cultivo celular puede realizarse en una material de soporte, por ejemplo, un soporte
20 reabsorbible, para generar un constructo bi o tridimensional que puede colocarse sobre o dentro del paciente. Antes del uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente con necrosis tubular aguda (NTA), las células pueden modificarse también mediante transferencia génica de manera que se altera la expresión de uno o más genes, por ejemplo, un gen angiogénico o un gen apoptótico, en las células regenerativas modificadas.

El sistema usado en la presente invención incluye generalmente uno o más de una cámara de recogida, una cámara de procesamiento, una cámara de desechos, una cámara de salida y una cámara de muestra. Las diversas cámaras se acoplan entre sí mediante uno o
25 más conductos de manera que los fluidos que contienen material biológico pueden pasar de una cámara a la otra en una ruta de fluido/tejido estéril, cerrada. Todo el procedimiento desde la extracción del tejido hasta el procesamiento y la colocación del dispositivo dentro del receptor puede realizarse todo en la misma instalación, de hecho, incluso dentro de la misma sala del paciente que se somete al procedimiento. Un sistema, que está configurado para mantener una ruta de fluido/tejido estéril cerrada, comprendiendo dicho sistema una cámara de recogida conectada a una cámara de mezclado/procesamiento, puede incluir un sistema de
30 extracción de tejido para extraer tejido adiposo de un paciente, teniendo el tejido adiposo una

concentración de células madre; medios para procesar al menos una parte del tejido adiposo para obtener una concentración de células regenerativas distinta de la concentración de células regenerativas del tejido adiposo antes del procesamiento y medios para administrar las células regenerativas al paciente sin extraer las células regenerativas del sistema de extracción de tejido antes de que se administre al paciente.

Dentro del alcance de la presente invención se incluye cualquier característica o combinación de características descritas en el presente documento con la condición de que las características incluidas en cualquier combinación de este tipo no sean mutuamente contradictorias tal como resultará evidente a partir del contexto, esta memoria descriptiva y el conocimiento de un experto habitual en la técnica. Ventajas y aspectos adicionales de la presente invención resultan evidentes en la siguiente descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

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

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

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

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

La figura 6 es una vista transversal de una cámara de procesamiento de un sistema para separar células regenerativas del tejido que utiliza un sistema de filtración por percolación.

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

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

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

La figura 10 es una ilustración de un sistema para separar células regenerativas del tejido utilizando presión de vacío para mover los fluidos a través del sistema. Un sistema de vacío puede construirse aplicando una bomba de vacío o una fuente de vacío en la salida del sistema, controlada a una velocidad predeterminada para extraer tejido y fluido a su

través, usando un sistema de llaves de paso, orificios de ventilación y pinzas para controlar la dirección y el ritmo del flujo.

La figura 11 es una ilustración de un sistema para separar células regenerativas del tejido utilizando presión positiva para mover los fluidos a través del sistema. Un sistema de presión positiva usa un medio mecánico tal como una bomba peristáltica para empujar o impulsar el fluido y tejido a través del sistema a una determinada velocidad, usando válvulas, llaves de paso, orificios de ventilación y pinzas para controlar la dirección y el ritmo del flujo.

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

La figura 13 es una ilustración de un conjunto desechable a modo de ejemplo para un sistema.

La figura 14 es una ilustración de un componente reutilizable a modo de ejemplo para un sistema.

La figura 15 es una ilustración de un dispositivo a modo de ejemplo que se ensambla usando un conjunto desechable similar a la figura 13 y un componente reutilizable similar a la figura 14.

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

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

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

La figura 19 representa el aumento de la restauración promedio del flujo sanguíneo en ratones con isquemia de extremidades posteriores tratados con células madre derivadas de tejido adiposo en comparación con un control negativo.

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

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona el uso de una composición que comprende células regenerativas derivadas de tejido adiposo en la fabricación de un medicamento para el

tratamiento de un paciente con necrosis tubular aguda (NTA), en el que se obtienen dichas células regenerativas derivadas de tejido adiposo procesando tejido adiposo de dicho paciente en un sistema, que está configurado para mantener una ruta de fluido/tejido estéril cerrada, comprendiendo dicho sistema una cámara de recogida conectada a una cámara de mezclado/procesamiento. La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que las células regenerativas de la invención (1) expresan factores de crecimiento angiogénicos y citocinas, incluyendo PIGF, VEGF, bFGF, IGF-II, eotaxina, GCSF, GM-CSF, IL-12 p40/p70, IL-12 p70, IL-13, IL-6, IL-9, leptina, MCP-1, M-CSF, MIG, PF-4, TIMP-1, TIMP-2, TNF- α y trombopoetina, (2) comprenden células progenitoras endoteliales (EPC) que tienen una función bien establecida en la formación de vasos sanguíneos, (3) se desarrollan para dar vasos sanguíneos *in vitro*, y (4) mantienen la supervivencia del tejido isquémico *in vivo*. Estudios han demostrado que la pérdida capilar en el riñón se correlaciona con alteraciones en la expresión de VEGF (véase por ejemplo, Kang, D.H. *et al.* Impaired angiogenesis in the aging kidney: vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in renal disease. *Am J Kidney Dis.* 2001 37 (3): 601-11). Estos y otros hallazgos indican que la angiogénesis alterada asociada con pérdida progresiva en la microvasculatura renal promueve la insuficiencia renal. Por consiguiente, el medicamento fabricado según la presente invención es útil para el tratamiento de un paciente con necrosis tubular aguda (NTA), por ejemplo, promoviendo la angiogénesis en la vasculatura renal, por ejemplo, los túbulos.

La presente invención utiliza sistemas y procedimientos rápidos y fiables para separar y concentrar células regenerativas derivadas de tejido adiposo. En una realización particularmente preferida, el medicamento que comprende las células regenerativas obtenidas es adecuado para su colocación directa dentro de un receptor que padece un trastorno o una enfermedad renal de quien se extrajo el tejido.

Preferiblemente, todo el procedimiento desde la extracción del tejido hasta la separación, concentración y preparación del medicamento se realizará todo en la misma instalación, de hecho, incluso dentro de la misma sala del paciente que se somete al procedimiento. El medicamento que comprende las células regenerativas puede usarse en un periodo de tiempo relativamente corto tras la extracción y concentración. Por ejemplo, el medicamento que comprende las células regenerativas puede estar listo para su uso en aproximadamente una hora a partir de la recogida del tejido de un paciente, y en determinadas situaciones, puede estar listo para su uso en aproximadamente de 10 a 40 minutos a partir de la recogida del tejido. En una realización preferida, el medicamento que comprende las células regenerativas puede estar listo para usar en aproximadamente 20 minutos a partir de la recogida del tejido. Toda la duración del procedimiento desde la extracción hasta la separación

y concentración puede variar dependiendo de varios factores, que incluyen el perfil del paciente, el tipo de tejido que está recogándose y la cantidad de células regenerativas requerida para una aplicación terapéutica dada. Se entiende que cualquier manipulación adicional de las células regenerativas más allá de la fase de separación y concentración del sistema requerirá tiempo adicional acorde con el modo de tal manipulación.

Con el fin de que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, en primer lugar se definen determinados términos. Durante toda la descripción detallada se exponen definiciones adicionales.

Tal como se usa en el presente documento, "células regenerativas" se refiere a cualquier célula heterogénea u homóloga que provoca o contribuye a una regeneración, restauración o sustitución completa o parcial de la estructura o función de un órgano, tejido, o sistema o unidad fisiológica para proporcionar de ese modo un beneficio terapéutico, estructural o cosmético. Los ejemplos de células regenerativas incluyen: ASC, células endoteliales, células precursoras endoteliales, células progenitoras endoteliales, macrófagos, fibroblastos, pericitos, células del músculo liso, preadipocitos, adipocitos diferenciados o desdiferenciados, queratinocitos, células progenitoras y precursoras unipotentes y multipotentes (y su progenie) y linfocitos.

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

Otro mecanismo mediante el cual las células regenerativas pueden proporcionar un beneficio terapéutico es expresando y/o secretando moléculas, por ejemplo, factores de crecimiento, que promueven la creación, retención, restauración y/o regeneración de la función de un tejido o componente de tejido dado. Por ejemplo, las células regenerativas pueden expresar y/o secretar moléculas que dan como resultado un crecimiento potenciado de tejidos o células que entonces participan directa o indirectamente en una función o estructura mejorada. Las células regenerativas pueden expresar y/o secretar factores de crecimiento, incluyendo, por ejemplo, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento placentario (PIGF), bFGF, IGF-II, eotaxina, G-CSF, GM-CSF, IL-12 p40/p70, IL-12 p70, IL-13, IL-6, IL-9, leptina, MCP-1, M-CSF, MIG, PF-4, TIMP-1, TIMP-2, TNF- α , trombopoetina y sus

isoformas, que pueden realizar una o más de las siguientes funciones: estimular el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos, es decir, promover la angiogénesis; mejorar el suministro de oxígeno de pequeños vasos sanguíneos preexistentes (colaterales) expandiendo su capacidad de llevar sangre; inducir la movilización de células regenerativas desde sitios distantes del sitio de la lesión para potenciar de ese modo el asentamiento y la migración de tales células al sitio de la lesión; estimular el crecimiento y/o promover la supervivencia de las células dentro de un sitio de lesión promoviendo de ese modo la retención de una función o estructura; administrar moléculas con propiedades antiapoptóticas reduciendo de ese modo la tasa o la probabilidad de muerte celular y pérdida permanente de función; e interaccionar con células regenerativas endógenas y/u otros mecanismos fisiológicos.

Las células regenerativas pueden usarse para la fabricación del medicamento en su forma “nativa” tal como se presentan en o separadas y concentradas a partir del tejido o pueden modificarse mediante estimulación o sensibilización con factores de crecimiento u otros modificadores de la respuesta biológica, mediante transferencia génica (transferencia transitoria o estable), mediante subfraccionamiento adicional de las población resultante basándose en sus propiedades físicas (por ejemplo, tamaño o densidad), adherencia diferencial a un material de fase sólida, expresión de moléculas intracelulares o de superficie celular, cultivo celular o otra manipulación, modificación o fraccionamiento *ex vivo* o *in vivo* tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, “composición de células regenerativas” se refiere a la composición de células normalmente presentes en un volumen de líquido después de que se lave un tejido, por ejemplo tejido adiposo, y al menos se desagregue parcialmente. Por ejemplo, un composición de células regenerativas comprende múltiples tipos diferentes de células regenerativas, incluyendo ASC, células endoteliales, células precursoras endoteliales, células progenitoras endoteliales, macrófagos, fibroblastos, pericitos, células del músculo liso, preadipocitos, adipocitos diferenciados o desdiferenciados, queratinocitos, células progenitoras y precursoras unipotentes y multipotentes (y su progenie), y linfocitos. La composición de células regenerativas también puede contener uno o más contaminantes, tales como colágeno, que pueden estar presentes en los fragmentos de tejido, o colagenasa residual u otra enzima o agente empleado en o que resulta del procedimiento de desagregación de tejido descrito en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, “medicina regenerativa” se refiere a cualquier beneficio terapéutico que se deriva de la colocación, directamente o bien indirectamente, de células regenerativas dentro de un sujeto. Tal como se usa en el presente documento, se pretende que “afección, enfermedad o trastorno renal” incluya todos los

trastornos caracterizados por función renal insuficiente, no deseada o anómala. El tratamiento de una afección, una enfermedad o un trastorno renal está dentro del ámbito de la medicina regenerativa. También se pretende que la frase signifique cualquier enfermedad, trastorno, síndrome, anomalía, patología o afección anómala del riñón o de la estructura o función de sus partes constituyentes, por ejemplo insuficiencia renal aguda (IRA), necrosis tubular aguda (NTA) (tanto NTA isquémica como NTA nefrotóxica), glomerulonefritis aguda (GNA), nefritis intersticial aguda (NIA), insuficiencia renal crónica, nefropatía diabética, hematuria, nefropatía isquémica, cáncer de riñón, síndrome nefrótico (SN), estenosis de la arteria renal (EAR) e hipertensión vascular renal. La función renal insuficiente o anómala puede ser el resultado de una enfermedad, una lesión y/o el envejecimiento.

Tal como se usa en el presente documento, el término “isquemia” se refiere a cualquier isquemia de tejido localizada debido a una reducción del flujo de entrada de sangre. La expresión “NTA isquémica” se refiere a la muerte de las células tubulares del riñón debido a la falta de oxígeno. Determinadas situaciones médicas y quirúrgicas están asociadas con un alto riesgo de desarrollar NTA isquémica, por ejemplo, hipotensión (tensión arterial baja), complicaciones obstétricas, ictericia obstructiva (piel teñida de color amarillo provocado por el flujo de bilis bloqueado), estado prerrenal prolongado, septicemia (infección en la sangre o los tejidos) y cirugía. El diagnóstico de la NTA isquémica está apoyado generalmente por una historia positiva de factores de riesgo.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “NTA nefrotóxica” se refiere a la muerte de las células tubulares del riñón debido a la exposición a una molécula o un fármaco tóxico. Algunos medicamentos y materiales clínicos que provocan NTA nefrotóxica incluyen, por ejemplo, aminoglicósidos (antibióticos antibacterianos tales como estreptomicina y gentamicina), amfotericina B (antibiótico usado para tratar algunas formas de meningitis e infecciones fúngicas sistémicas), cisplatino (agente anticancerígeno usado para tratar cánceres ováricos y testiculares en estadio tardío) y medios de contraste radioisotópicos (agentes usados en determinados estudios de obtención de imágenes). La NTA también puede producirse en personas que padecen traumatismos musculares significativos, tal como durante una lesión por aplastamiento. Al suturar una lesión de este tipo, la enzima muscular creatinina fosfoquinasa (CPK) se vierte en la sangre. Si se filtra suficiente CPK a través de los glomérulos, ésta (mediante la proteína mioglobulina) provoca en última instancia NTA nefrotóxica. La NTA también puede resultar de rabdomiolisis tras una lesión por aplastamiento del músculo significativa.

Tal como se usa en el presente documento, el término “angiogénesis” se refiere al proceso mediante el cual se generan nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura y el

tejido existentes (Folkman, 1995). La frase “reparar o remodelar” se refiere a la reformación de la vasculatura existente. El alivio de la isquemia del tejido depende fundamentalmente de la angiogénesis. El crecimiento espontáneo de nuevos vasos sanguíneos proporciona circulación colateral en y alrededor de una zona isquémica, mejora el flujo sanguíneo y alivia los síntomas provocados por la isquemia. Las enfermedades y trastornos mediados por angiogénesis incluyen infarto agudo de miocardio, cardiomiopatía isquémica, enfermedad vascular periférica, accidente cerebrovascular isquémico, necrosis tubular aguda, AFT que incluye heridas isquémicas, septicemia, enfermedad isquémica del intestino, retinopatía, neuropatía y nefropatía diabéticas, vasculitis, encefalopatía isquémica, disfunción eréctil fisiológica, lesiones de la médula espinal isquémicas o traumáticas, insuficiencia sistémica multiorgánica, enfermedad periodontal isquémica e isquemia relacionada con trasplante.

Tal como se usa en el presente documento, “célula madre” se refiere a una célula regenerativa multipotente con el potencial para diferenciarse en una variedad de otros tipos de células, que realizan una o más funciones y tienen la capacidad de autorrenovarse. Algunas de las células madre dadas a conocer en el presente documento pueden ser multipotentes.

Tal como se usa en el presente documento, “célula progenitora” se refiere a una célula regenerativa multipotente con el potencial para diferenciarse en más de un tipo de célula y tiene capacidad limitada o no de autorrenovarse. “Célula progenitora”, tal como se usa en el presente documento, también se refiere a una célula unipotente con el potencial para diferenciarse en sólo un único tipo de célula, que realiza una o más funciones específicas y tiene capacidad limitada o no de autorrenovarse. En particular, tal como se usa en el presente documento, “célula progenitora endotelial” se refiere a una célula multipotente o unipotente con el potencial para diferenciarse en células endoteliales vasculares.

Tal como se usa en el presente documento, “célula precursora” se refiere a una célula regenerativa unipotente con el potencial para diferenciarse en un tipo de célula. Las células precursoras y su progenie pueden conservar una extensa capacidad proliferativa, por ejemplo, linfocitos y células endoteliales, que pueden proliferar en condiciones apropiadas.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “factor angiogénico” o “proteína angiogénica” se refiere a cualquier proteína, péptido u otro agente conocido que puede promover el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura existente (“angiogénesis”). Los factores angiogénicos adecuados para su uso en la invención incluyen, pero sin limitarse a, factor de crecimiento placentario (Luttun *et al.*, 2002), factor estimulante de colonias de macrófagos (Aharinejad *et al.*, 1995), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (Buschmann *et al.*, 2003), factor de crecimiento endotelial vascular (VBGF)-A, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (Mints *et al.*, 2002), neuropilina

(Wang *et al.*, 2003), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)-1, FGF-2(bFGF), FGF-3, FGF-4, FGF-5, FGF-6 (Botta *et al.*, 2000), angiopoyetina 1, angiopoyetina 2 (Sundberg *et al.*, 2002), eritropoyetina (Ribatti *et al.*, 2003), BMP-2, BMP-4, BMP-7 (Carano y Filvaroff, 2003), TGF-beta (Xiong *et al.*, 2002), IGF-1 (Shigematsu *et al.*, 1999), osteopontina (Asou *et al.*, 2001), pleiotropina (Beecken *et al.*, 2000), activina (Lamouille *et al.*, 2002), endotelina-1 (Bagnato y Spinella, 2003) y combinaciones de los mismos. Los factores angiogénicos pueden actuar independientemente, o en combinación entre sí. Cuando están en combinación, los factores angiogénicos también pueden actuar sinérgicamente, mediante lo cual el efecto combinado de los factores es mayor que la suma de los efectos de los factores individuales tomados por separado. La expresión “factor angiogénico” o “proteína angiogénica” también abarca análogos funcionales de tales factores. Los análogos funcionales incluyen, por ejemplo, partes funcionales de los factores. Los análogos funcionales también incluyen anticuerpos anti-idiotípicos que se unen a los receptores de los factores y, por tanto, imitan la actividad de los factores en la promoción de la angiogénesis y/o remodelación del tejido. Los procedimientos para generar tales anticuerpos anti-idiotípicos se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en el documento WO 97/23510.

Los factores angiogénicos usados en la presente invención pueden producirse u obtenerse de cualquier fuente adecuada. Por ejemplo, los factores pueden purificarse de sus fuentes nativas, o producirse sintéticamente o mediante expresión recombinante. Los factores pueden administrarse a los pacientes como una composición de proteínas. Alternativamente, los factores pueden administrarse en forma de una plásmido de expresión que codifica los factores. La construcción de plásmidos de expresión adecuados se conoce bien en la técnica. Los vectores adecuados para construir plásmidos de expresión incluyen, por ejemplo, vectores adenovirales, vectores retrovirales, vectores virales adenoasociados, vectores de ARN, liposomas, lípidos catiónicos, vectores lentivirales y transposones.

Tal como se usa en el presente documento, el término “arteriogénesis” se refiere al proceso de potenciación del crecimiento de arterias colaterales y/u otras arterias a partir de conexiones arteriales preexistentes (Carmeliet, 2000; Scholz *et al.*, 2001; Scholz *et al.*, 2002). Más particularmente, la arteriogénesis es el reclutamiento *in situ* y la expansión de las arterias mediante la proliferación de células endoteliales y del músculo liso a partir de conexiones arteriolares preexistentes que suministran sangre al tejido isquémico, tumor o sitio de inflamación. Estos vasos crecen en gran medida fuera del tejido afectado y son importantes para el suministro de nutrientes al territorio isquémico, el tumor o el sitio de inflamación. La arteriogénesis es parte de la respuesta normal a la isquemia miocárdica (Mills *et al.*, 2000; Monteiro *et al.*, 2003). Además, la técnica quirúrgica común de un injerto de derivación de

arteria coronaria (CABG) es, en efecto, no más que la creación de un vaso colateral artificial (Sergeant *et al.*, 1997). Por tanto, los procesos que potencian la arteriogénesis tras un infarto mejoran el flujo sanguíneo al tejido isquémico dando como resultado una disminución de la muerte celular y una disminución del tamaño del infarto. Las mejoras darán como resultado una función cardíaca y un beneficio terapéutico mejorados.

Tal como se usa en el presente documento, “número de células madre” o “frecuencia de células madre” se refiere al número de colonias observadas en un ensayo clonogénico en el que se siembran en placa células derivadas de tejido adiposo (ADC) a baja densidad celular (<10.000 células/pocillo) y se hacen crecer en medio de cultivo que mantiene el crecimiento de MSC (por ejemplo, medio DMEM/F12 complementado con suero fetal bovino al 10%, suero de caballo al 5% y agentes antibióticos/antimicóticos). Se hacen crecer las células durante dos semanas tras lo que se tiñen los cultivos con hematoxilina y se cuentan las colonias de más de 50 células como CFU-F. La frecuencia de células madre se calcula como el número de CFU-F observadas por 100 células nucleadas sembradas en placa (por ejemplo; 15 colonias contadas en una placa iniciada con 1.000 células regenerativas nucleadas proporciona una frecuencia de células madre del 1,5%). El número de células madre se calcula como la frecuencia de células madre multiplicada por el número total de células ADC nucleadas obtenidas. Un alto porcentaje (~100%) de CFU-F hechas crecer a partir de células regenerativas expresan la molécula de superficie celular CD105 que también se expresa por células madre derivadas de médula (Barry *et al.*, 1999). También se expresa CD105 por células madre derivadas de tejido adiposo (Zuk *et al.*, 2002).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “tejido adiposo” se refiere a la grasa incluyendo el tejido conjuntivo que almacena la grasa. El tejido adiposo contiene múltiples tipos de células regenerativas, incluyendo ASC y células progenitoras y precursoras endoteliales.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “unidad de tejido adiposo” se refiere a una cantidad diferenciada y medible de tejido adiposo. Una unidad de tejido adiposo puede medirse determinando el peso y/o volumen de la unidad. Basándose en los datos identificados anteriormente, una unidad de lipoaspirado procesado, tal como se extrae de un paciente, tiene un componente celular en el que al menos el 0,1% del componente celular son células madre; es decir, tiene una frecuencia de células madre, determinada tal como se describió anteriormente, de al menos el 0,1%. En referencia a la descripción en el presente documento, una unidad de tejido adiposo puede referirse a toda la cantidad de tejido adiposo extraído de un paciente, o una cantidad que es menor que toda la cantidad de tejido adiposo extraído de un paciente. Por tanto, una unidad de tejido adiposo puede combinarse con otra

unidad de tejido adiposo para formar una unidad de tejido adiposo que tiene un peso o volumen que es la suma de las unidades individuales.

Tal como se usa en el presente documento, el término “parte” se refiere a una cantidad de un material que es menor que su totalidad. Una parte menor se refiere a una cantidad que es menor del 50%, y una parte mayor se refiere a una cantidad que es mayor del 50%. Por tanto, una unidad de tejido adiposo que es menor que toda la cantidad de tejido adiposo extraído del paciente es una parte del tejido adiposo extraído.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “lipoaspirado final procesado” se refiere al tejido adiposo que se ha procesado para separar el componente activo celular (por ejemplo, el componente que contiene células regenerativas) de los adipocitos maduros y el tejido conjuntivo. Esta fracción se denomina en el presente documento “células derivadas de adipocitos” o “ADC” Normalmente, ADC se refiere al sedimento de células regenerativas obtenido lavando y separando y concentrando las células a partir del tejido adiposo. El sedimento se obtiene normalmente centrifugando una suspensión de células de modo que las células se agregan en el fondo de una cámara de centrífuga o concentrador de células.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “administrar,” “introducir,” “suministrar,” “colocación” y “trasplantar” se usan de manera intercambiable en el presente documento y hacen referencia a la colocación de las células regenerativas de la invención dentro de un sujeto mediante un procedimiento o una vía que da como resultado una localización al menos parcial de las células regenerativas en el sitio deseado. El medicamento que comprende las células regenerativas puede administrarse por cualquier vía apropiada que da como resultado la administración en la ubicación deseada en el sujeto en el que al menos una parte de las células o los componentes de las células permanecen viables. El periodo de viabilidad de las células tras su administración a un sujeto puede ser tan corto como de unas pocas horas, por ejemplo, veinticuatro horas, a unos pocos días, hasta tan largo como varios años.

Tal como se usa en el presente documento, el término “tratar” incluye reducir o aliviar al menos un efecto adverso o síntoma de una enfermedad o trastorno.

Tal como se usa en el presente documento, “dosis terapéuticamente eficaz de células regenerativas” se refiere a una cantidad de células regenerativas que es suficiente para ocasionar un efecto beneficioso o efecto clínico deseado. Dicha dosis puede administrarse en una o más administraciones. Sin embargo, la determinación precisa de lo que se consideraría una dosis eficaz puede basarse en factores individuales para cada paciente, incluyendo, pero sin limitarse a, la edad del paciente, el tamaño, tipo o grado de la enfermedad, el estadio de la enfermedad, la vía de administración de las células regenerativas, el tipo o el grado de la

terapia complementaria, el proceso patológico en curso y el tipo de tratamiento deseado (por ejemplo, tratamiento agresivo frente a convencional).

Tal como se usa en el presente documento, el término “sujeto” incluye animales de sangre caliente, preferiblemente mamíferos, incluyendo seres humanos. En una realización preferida, el sujeto es un primate. En una realización incluso más preferida, el sujeto es un ser humano.

Tal como se expuso anteriormente en el presente documento, las células regenerativas, por ejemplo, las células madre y progenitoras, pueden recogerse de una amplia variedad de tejidos. Sin embargo, el tejido adiposo es una fuente especialmente rica de células regenerativas.

El tejido adiposo puede obtenerse mediante cualquier procedimiento conocido por un experto habitual en la técnica. Por ejemplo, el tejido adiposo puede extraerse de un paciente mediante liposucción (con jeringuilla o asistida) o mediante lipectomia, por ejemplo, lipoplastia asistida por succión, lipoplastia asistida por ultrasonidos y lipectomia excisional o combinaciones de las mismas. El tejido adiposo se extrae y se recoge y puede procesarse tal como se describe en el presente documento. La cantidad de tejido recogido depende de numerosos factores, incluyendo el índice de masa corporal y la edad del donante, el tiempo disponible para la recogida, la disponibilidad de sitios de recogida de tejido adiposo accesibles, los medicamentos y estados concomitantes y preexistentes (tal como terapia anticoagulante), y el fin clínico para el que está recogiendo el tejido. Por ejemplo, el porcentaje de células regenerativas de 100 ml de tejido adiposo extraído de un individuo delgado es mayor que el extraído de un donante obeso (tabla 1). Esto refleja probablemente un efecto de dilución del aumento del contenido en grasa en el individuo obeso. Por tanto, puede ser deseable obtener mayores cantidades de tejido de donantes con sobrepeso en comparación con las cantidades que se extraerían de pacientes más delgados. Esta observación también indica que la fuente de células regenerativas derivadas de tejido adiposo no se limita a individuos con grandes cantidades de tejido adiposo.

Tabla 1: Efecto del índice de masa corporal en el rendimiento de células y tejidos

Estado del índice de masa corporal	Cantidad de tejido obtenido (g)	Rendimiento total de células regenerativas ($\times 10^7$)
Normal	641 ± 142	$2,1 \pm 0,4$
Obeso	1.225 ± 173	$2,4 \pm 0,5$
Valor de p	0,03	0,6

Tras procesarse el tejido adiposo, las células regenerativas resultantes están sustancialmente libres de adipocitos maduros y tejido conjuntivo y comprenden una pluralidad heterogénea de células regenerativas derivadas de tejido adiposo que pueden usarse para fines terapéuticos. En una realización preferida, las células son adecuadas para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente con necrosis tubular aguda (NTA) para su colocación o reinfusión dentro del cuerpo de dicho paciente.

Se hará referencia ahora en detalle a las realizaciones actualmente preferidas del sistema, cuyos ejemplos se ilustran en los dibujos adjuntos. Siempre que sea posible, se usan números de referencia iguales o similares en los dibujos y la descripción para hacer referencia a partes iguales o similares. Debe observarse que los dibujos están en forma simplificada y no están a escala precisa. En referencia a la descripción en el presente documento, para fines de conveniencia y claridad sólo, términos direccionales tales como parte superior, parte inferior, izquierda, derecha, arriba, abajo, sobre, encima de, debajo de, por debajo de, parte trasera, parte delantera, distal y proximal se usan con respecto a los dibujos adjuntos. No debe interpretarse que tales términos direccionales limitan el alcance del sistema de ninguna manera.

Aunque la descripción en el presente documento se refiere a determinadas realizaciones ilustradas, ha de entenderse que estas realizaciones se presentan a modo de ejemplo y no a modo de limitación. La intención de la siguiente descripción detallada, a pesar de comentar realizaciones a modo de ejemplo, ha de interpretarse como que cubre todas las modificaciones, alternativas y equivalentes de las realizaciones que pueden encontrarse dentro del espíritu y el alcance de la invención tal como se define mediante las reivindicaciones adjuntas. La presente invención puede utilizarse conjuntamente con diversos procedimientos médicos que se usan convencionalmente en la técnica.

Haciendo referencia ahora a las figuras, un sistema 10 generalmente está compuesto de uno o más de una cámara 20 de recogida de tejido, una cámara 30 de procesamiento, una cámara 40 de desechos, una cámara 50 de salida y una cámara 60 de muestra. Las diversas cámaras están acopladas entre sí mediante uno o más conductos 12 de manera que los fluidos que contienen material biológico pueden pasar de una cámara a la otra mientras que se mantiene una ruta de fluido/tejido estéril, cerrada. Los conductos pueden comprender cuerpos rígidos o flexibles denominados de manera intercambiable en el presente documento luces y tubos, respectivamente. En determinadas realizaciones, los conductos están en forma de tubos flexibles, tales como tubos de polietileno usados convencionalmente en la práctica clínica, silicona o cualquier otro material conocido en la técnica. Los conductos 12 pueden variar en tamaño dependiendo de si se desea el paso de fluido o tejido. Los conductos 12 también

pueden variar en tamaño dependiendo de la cantidad de tejido o fluido que se recircula a través del sistema. Por ejemplo, para el paso de fluido, los conductos pueden tener un diámetro que oscila entre aproximadamente 0,15 mm (0,060 pulgadas) y aproximadamente 1,9 mm (0,750 pulgadas) y para el paso de tejido, los conductos pueden tener un diámetro que oscila entre 0,79 y 1,9 mm (0,312 y 0,750 pulgadas). Generalmente, se selecciona el tamaño de los conductos para equilibrar el volumen que los conductos pueden alojar y el tiempo requerido para transportar el tejido o los fluidos a través de dichos conductos. En realizaciones automatizadas del sistema, los parámetros anteriores, es decir, volumen y tiempo para el transporte, deben identificarse de manera que puedan transmitirse las señales apropiadas al dispositivo de procesamiento del sistema. Esto permite que el dispositivo mueva volúmenes precisos de líquido y tejido de una cámara a la otra. Los tubos flexibles usados deben poder resistir la presión negativa para reducir la probabilidad de plegado. Los tubos flexibles usados también deben poder resistir la presión positiva que se genera por, por ejemplo, una bomba de desplazamiento positivo, que puede usarse en el sistema.

Todas las cámaras del sistema pueden estar compuestas de uno o más orificios, por ejemplo, orificios 21 de entrada o 22 de salida, que aceptan conexiones de tubos de succión y jeringuilla de tipo IV convencionales. Los orificios pueden ser un orificio sellado tal como un orificio 51 de acceso de aguja de jeringuilla cerrado con pared de goma. Los orificios de entrada pueden acoplarse a una o más cánulas (no mostradas) a modo de conductos. Por ejemplo, un orificio 21 de entrada de tejido puede acoplarse a una cánula de liposucción de uso único integrada y el conducto puede ser un tubo flexible. Generalmente, los conductos se colocan para proporcionar pasos de fluido de una cámara del sistema a la otra. Para este fin, los conductos y orificios pueden acoplarse a, por ejemplo, un dispositivo de succión (no mostrado) que puede hacerse funcionar manual o automáticamente. El dispositivo de succión puede ser, por ejemplo, una jeringuilla o una bomba eléctrica. El dispositivo de succión debe poder proporcionar suficiente presión negativa para aspirar tejido de un paciente. Generalmente, puede usarse cualquier dispositivo de succión conocido para un experto habitual en la técnica, por ejemplo, un cirujano.

Los conductos 12 pueden comprender además una o más pinzas (no mostradas) para controlar el flujo de material entre diversos componentes del sistema. Las pinzas son útiles para mantener la esterilidad del sistema sellando eficazmente diferentes regiones del sistema. Alternativamente, los conductos 12 pueden comprender una o más válvulas 14 que controlan el flujo de material a través del sistema. Las válvulas 14 se identifican como círculos abiertos en las figuras. En realizaciones preferidas, las válvulas pueden ser válvulas de manguito electromecánicas. En otra realización, las válvulas pueden ser válvulas neumáticas. Aún en

otras realizaciones, las válvulas pueden ser válvulas hidráulicas o válvulas mecánicas. Tales válvulas preferiblemente se activan mediante un sistema de control que puede acoplarse a palancas. Las palancas pueden manipularse manualmente de manera que se activen las palancas. En realizaciones automatizadas, el sistema de control puede acoplarse a las palancas así como a un dispositivo de procesamiento que puede activar las válvulas en condiciones de activación predeterminadas. En determinadas realizaciones automatizadas, la activación de las válvulas puede estar parcialmente automatizada y someterse parcialmente a la preferencia del usuario de manera que el procedimiento puede optimizarse. Aún en otras realizaciones, pueden activarse determinadas válvulas manualmente y otras automáticamente a través del dispositivo de procesamiento. Las válvulas 14 también pueden usarse conjuntamente con una o más bombas, por ejemplo, bombas 34 peristálticas o bombas de desplazamiento positivo (no mostradas). Los conductos 12 y/o las válvulas 14 también pueden estar compuestos de sensores 29, por ejemplo, sensores ópticos, sensores ultrasónicos, sensores de presión u otras formas de detectores conocidos en la técnica que pueden distinguir entre los diversos componentes del fluido y niveles de fluido que fluyen a través del sistema. En una realización preferida, los sensores 29 pueden ser sensores ópticos.

El sistema también puede incluir una pluralidad de filtros 36. En determinadas realizaciones, los filtros pueden estar dentro de una cámara del sistema 28. Las diferentes cámaras dentro del sistema pueden estar compuestas de diferentes filtros. Los filtros son eficaces para separar las células regenerativas, por ejemplo, las células madre y/o células progenitoras, de células no deseadas y agentes de desagregación que pueden usarse según el sistema. En una realización, un conjunto 36 de filtros incluye un dispositivo de filtración de fibra hueca. En otra realización, el conjunto 36 de filtros incluye un dispositivo de filtración por percolación, que puede usarse o no con un procedimiento de sedimentación. En una realización adicional, el conjunto 36 de filtros comprende un dispositivo de centrifugación, que puede usarse o no con un procedimiento y dispositivo de elutriación. Aún en otra realización, el sistema comprende una combinación de estos dispositivos de filtración. Las funciones de filtración de la presente invención pueden ser dobles, extrayendo algunos filtros elementos de la concentración final tales como colágeno, lípido libre, adipocitos libres y colagenasa residual, y usándose otros filtros para concentrar el producto final. Los filtros del sistema pueden estar compuestos de una pluralidad de poros que oscila en diámetros y/o longitud entre 20 y 800 μm . En una realización preferida, la cámara 20 de recogida tiene un filtro 28 prefijado con una pluralidad de poros que oscilan entre 80 y 400 μm . En otra realización preferida, la cámara 20 de recogida tiene un filtro 28 prefijado con una pluralidad de poros de 265 μm . En otras realizaciones, los filtros pueden ser desmontables y/o desechables.

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

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

Puede extraerse tejido de un paciente mediante cualquier procedimiento reconocido en la técnica. El tejido aspirado puede extraerse antes de colocarse en el sistema para su procesamiento. Normalmente se transfiere el tejido aspirado a la cámara 20 de recogida a través de los conductos 12 mediante un orificio de entrada sellado, tal como un orificio de acceso de aguja de jeringuilla cerrado con pared de goma (no mostrado en la cámara de recogida). Alternativamente, la etapa de extracción del tejido puede ser parte del sistema. Por ejemplo, la cámara 20 de recogida puede estar compuesta de una línea 11 de vacío que facilita la extracción del tejido usando una cánula convencional insertada dentro del paciente. Por tanto, en esta realización, todo el sistema está unido al paciente. El tejido puede introducirse en la cámara 20 de recogida a través de un orificio 21 de entrada mediante un conducto tal como 12a que son parte de una ruta estéril cerrada. La cámara 20 de recogida puede estar compuesta de una pluralidad de cilindros o botes flexibles o rígidos o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, la cámara 20 de recogida puede estar compuesta de uno o más botes rígidos de tamaños variables. La cámara 20 de recogida también puede estar compuesta de una o más bolsas flexibles. En tales sistemas, la bolsa está dotada preferiblemente de un soporte, tal como en una estructura interna o externa, que ayuda a reducir la probabilidad de que la bolsa se pliegue tras la aplicación de la succión a la bolsa. La cámara 20 de recogida

está dimensionada para contener la cantidad requerida de solución salina para lavar y desagregar apropiadamente el tejido antes de la fase de lavado y concentración del procedimiento realizado en la cámara 30 de procesamiento. Preferiblemente, el volumen de tejido o fluido presente en la cámara 20 de recogida 20 puede determinarse fácilmente a simple vista. Por ejemplo, para obtener células regenerativas del tejido adiposo, una cámara de recogida adecuada tiene la capacidad de contener 800 ml de lipoaspirado y 1200 ml de solución salina. Por consiguiente, en una realización, la cámara 20 de recogida tiene una capacidad de al menos 2 litros. En otra realización, para separar y concentrar glóbulos rojos de la sangre, la cámara 20 de recogida tiene una capacidad de al menos 1,5 litros. Generalmente, el tamaño de la cámara 20 de recogida variará dependiendo del tipo y la cantidad de tejido recogido del paciente. La cámara 20 de recogida puede dimensionarse para contener tan sólo aproximadamente 5 ml hasta aproximadamente 2 litros de tejido. Para volúmenes de tejido más pequeños, por ejemplo, de 5 ml a 100 ml, puede reunirse el tejido en una jeringuilla antes de su transferencia a la cámara 20 de recogida.

La cámara 20 de recogida puede construirse usando cualquier material biocompatible que pueda esterilizarse. En una realización preferida, la cámara 20 de recogida se construye de material desechable que cumple los requisitos de biocompatibilidad para el contacto intravascular tal como se describen en la norma ISO 10993. Por ejemplo, puede usarse policarbonato acrílico o ABS. La trayectoria del fluido de la cámara 20 de recogida preferiblemente está libre de pirógenos, es decir, es adecuado para su uso con sangre sin peligro de transmisión de enfermedades. En una realización, la cámara 20 de recogida se construye de un material que permite al usuario determinar visualmente el volumen aproximado de tejido presente en la cámara. En otras realizaciones, el volumen de tejido y/o fluido en la cámara 20 de recogida se determina mediante sensores 29 automatizados. La cámara 20 de recogida preferiblemente se diseña de manera que en una realización automatizada el sistema puede determinar el volumen de tejido y/o fluido dentro de la cámara con un grado de precisión razonable. En una realización preferida, el sistema percibe el volumen dentro de la cámara 20 de recogida con una precisión de más o menos el quince por ciento.

En una realización particular proporcionada a modo de ejemplo sólo, la cámara 20 de recogida está en forma de una cámara rígida, por ejemplo, una cámara construida de un policarbonato de calidad médica que contiene un filtro 28 prefijado aproximadamente cónico de poliéster de calidad médica con un tamaño de malla de 265 μm (véase la figura 5). El recipiente de recogida de tejido rígido puede tener un tamaño de aproximadamente 20,32 cm (ocho pulgadas) de alto y aproximadamente 12,7 cm (cinco pulgadas) de diámetro, el espesor de la pared puede ser de aproximadamente 0,31 cm (0,125 pulgadas). Puede accederse al interior

del cilindro a través de, por ejemplo, uno o más orificios para el tubo de succión, uno o más orificios con tubos para conexión mediante tecnología de acoplamiento estéril, y/o uno o más orificios para el acceso mediante punción con aguja a través de una pared de goma. El filtro 28 prefijado en el interior de la cámara 20 de recogida preferiblemente está estructurado para retener el tejido adiposo y para hacer pasar el tejido no adiposo a medida que, por ejemplo, se extraen los tejidos del paciente. Más específicamente, el filtro 28 puede permitir el paso de lípido libre, sangre y solución salina, mientras que retiene fragmentos de tejido adiposo durante, o en otra realización tras, la recogida inicial del tejido adiposo. En ese aspecto, el filtro 28 incluye una pluralidad de poros, de tamaños iguales o bien de tamaños diferentes, pero que oscilan en tamaño entre aproximadamente 20 μm y 5 mm. En una realización preferida, el filtro 28 incluye una pluralidad de poros de 400 μm . En una realización preferida, el filtro 28 es una malla de poliéster de calidad médica de aproximadamente 200 μm de espesor con un tamaño de poro de aproximadamente 265 μm y aproximadamente un área abierta del 47%. Este material mantiene el tejido durante el aclarado pero permite que las células pasen hacia fuera a través de la malla tras la desagregación del tejido. Por tanto, cuando se aspiran los tejidos del paciente, puede separarse el tejido no adiposo del tejido adiposo. Puede lograrse la misma funcionalidad con diferentes materiales, tamaño de malla y el número y tipo de orificios. Por ejemplo, tamaños de poro de malla menores de 100 μm o tan grandes como varios miles de micrómetros lograrían el mismo fin de permitir el paso de solución salina y células sanguíneas mientras que se retienen agregados y fragmentos de tejido adiposo. De manera similar, el mismo fin podría lograrse mediante el uso de un material plástico rígido alternativo, o mediante muchas otras modificaciones que serían conocidas para los expertos en la técnica.

El sistema 10 puede estar compuesto de una o más fuentes 22 de disolución. La fuente de disolución puede comprender una fuente 23 de disolución de lavado, y una fuente 24 de agente de desagregación tisular, tal como colagenasa. La cámara 20 de recogida está compuesta de rutas de fluido cerradas que permiten que se añadan disoluciones o agentes de lavado y desagregación al tejido de una manera aséptica.

Los recipientes para la disolución 23 de lavado y los agentes 24 de desagregación pueden ser cualquier recipiente adecuado que pueda contener sus contenidos de una manera estéril, por ejemplo, una bolsa plegable, tal como una bolsa IV usada en la práctica clínica. Estos recipientes pueden tener conductos 12, tal como el conducto 12e, acoplados a la cámara 20 de recogida de modo que pueda suministrarse la disolución de lavado y el agente de desagregación al interior de la cámara 20 de recogida. La disolución de lavado y el agente de desagregación pueden suministrarse al interior de la cámara 20 de recogida mediante cualquier manera reconocida en la técnica, incluyendo presión por gravedad simple aplicada al exterior

de los recipientes de solución 23 salina y/o los agentes 24 de desagregación o mediante la colocación de una bomba de desplazamiento positivo en los conductos, por ejemplo, el conducto 12d en la figura 4. En realizaciones automatizadas, el dispositivo de procesamiento del sistema calcula diversos parámetros, por ejemplo, el volumen de solución salina y el tiempo o el número de ciclos requeridos para lavar, así como la concentración o cantidad de agente de desagregación y el tiempo requerido para la desagregación basándose en la información introducida inicialmente por el usuario (por ejemplo, volumen de tejido que está procesándose). Alternativamente, el usuario puede manipular manualmente las cantidades, los tiempos, etc.

El tejido y/o fluido dentro de la cámara de recogida debe mantenerse a una temperatura que oscila entre 30°C y 40°C. En una realización preferida, la temperatura de la suspensión dentro de la cámara de recogida se mantiene a 37°C. En determinadas realizaciones, si se necesita retrasar el procedimiento quirúrgico o la aplicación terapéutica, el tejido seleccionado puede almacenarse en la cámara de recogida para su uso posterior. El tejido puede almacenarse a o aproximadamente a temperatura ambiente o aproximadamente a 4°C durante hasta 96 horas.

La disolución de lavado puede ser cualquier disolución conocida para el experto en la técnica, incluyendo solución salina o cualquier otra disolución de electrolitos tamponada o no tamponada. Los tipos de tejido que están procesándose dictarán los tipos o las combinaciones de disoluciones de lavado usadas. Normalmente, la disolución de lavado, tal como solución salina, se introduce en la cámara 20 de recogida tras haberse extraído el tejido adiposo del paciente y haberse colocado en la cámara de recogida. Sin embargo, la disolución de lavado puede suministrarse a la cámara 20 de recogida antes de que se extraiga el tejido adiposo, o puede suministrarse a la cámara 20 de recogida simultáneamente con el tejido adiposo. En la cámara 20 de recogida, la disolución de lavado y el tejido adiposo extraído pueden mezclarse mediante cualquier medio incluyendo los procedimientos descritos a continuación.

Por ejemplo, el tejido puede lavarse mediante agitación (que maximiza la viabilidad celular y minimiza la cantidad de lípido libre liberado). En una realización, se agita el tejido rotando toda la cámara 20 de recogida a través de un arco de grados variables (por ejemplo, a través de un arco de aproximadamente 45° a aproximadamente 90°) a velocidades variables, por ejemplo, aproximadamente 30 revoluciones por minuto. En otras realizaciones, se agita el tejido rotando toda la cámara 20 de recogida, estando compuesta la cámara 20 de recogida de una o más paletas o protuberancias unidas rígidamente a una superficie interior de la cámara de recogida, a través de un arco de grados variables (por ejemplo, a través de un arco de aproximadamente 45° a aproximadamente 90°) a velocidades variables, por ejemplo, aproximadamente 30 revoluciones por minuto. La rotación de la cámara 20 de recogida

descrita anteriormente puede llevarse a cabo mediante un mecanismo de accionamiento unido a o en proximidad con la cámara 20 de recogida. El mecanismo de accionamiento puede ser una correa o un engranaje sencillo u otro mecanismo de accionamiento conocido en la técnica. La velocidad de la rotación puede ser, por ejemplo, 30 revoluciones por minuto. Generalmente, se ha encontrado que mayores velocidades generan mayores volúmenes de lípidos libres y pueden no ser óptimas.

En otras realizaciones, se agita el tejido colocando un eje 25 rotatorio dentro de la cámara 20 de recogida, en la que el eje rotatorio está compuesto de una o más paletas 25a o protuberancias unidas rígidamente al eje 25 rotatorio que pasa a través de la mezcla como eje que está rotando. En determinadas realizaciones, el eje 25 rotatorio con paletas 25a rígidamente unidas puede apoyarse en la parte inferior de la cámara 20 de recogida. Esto puede lograrse, por ejemplo, colocando el dispositivo de tipo paleta dentro de un campo magnético giratorio (por ejemplo, agitador magnético). Alternativamente, la agitación del tejido puede lograrse usando un agitador sencillo conocido en la técnica, es decir un dispositivo que implementa la agitación de arriba abajo sin rotación. Además, el tejido puede lavarse usando cualquier otro medio reconocido en la técnica incluyendo balanceo, agitación, inversión, etc.

Tras una cantidad deseada de ciclos de lavado, puede suministrarse un agente de desagregación tisular a la cámara 20 de recogida para separar las células regenerativas de los componentes de tejido adiposo restantes. El agente de desagregación puede ser cualquier agente de desagregación conocido para el experto en la técnica. Los agentes de desagregación que pueden usarse incluyen proteasas neutras, colagenasa, tripsina, lipasa, hialuronidasa, desoxiribonucleasa, miembros de la familia de mezcla enzimática Blendzyme, por ejemplo, liberasa H1, pepsina, energía ultrasónica u otra energía física, láseres, microondas, otros dispositivos mecánicos y/o combinaciones de los mismos. Un agente de desagregación preferido de la invención es colagenasa. Los agentes de desagregación pueden añadirse con otras disoluciones. Por ejemplo, puede añadirse solución salina, tal como solución salina suministrada a partir de una fuente 23 de solución salina tal como se describió anteriormente, al tejido adiposo junto con o inmediatamente tras la adición de colagenasa. En una realización, se mezcla el tejido adiposo lavado con una disolución enzimática que contiene colagenasa a o aproximadamente a 37°C durante aproximadamente 20-60 minutos. En otras realizaciones, puede añadirse una concentración mayor de colagenasa o un agente similar para disminuir el tiempo de digestión. Entonces, pueden agitarse el tejido adiposo lavado y el agente de desagregación tisular de maneras similares a los procedimientos de agitación descritos anteriormente, hasta que se desagregue el tejido adiposo lavado. Por ejemplo, pueden agitarse el tejido adiposo lavado y el agente de desagregación tisular rotando toda la

cámara de recogida a través de un arco de aproximadamente 90°, teniendo un eje que contiene una o más paletas que pasan a través de la disolución a medida que se rota el eje, y/o rotando toda la cámara de recogida que contiene paletas o protuberancias en la superficie interna de la cámara de recogida.

5 Dependiendo del fin para el que se usarán las células derivadas de tejido adiposo, el tejido adiposo puede desagregarse parcialmente o bien desagregarse completamente. Por ejemplo, si van a combinarse células derivadas de tejido adiposo con una unidad de tejido adiposo, puede ser deseable desagregar parcialmente el tejido adiposo recogido, extraer una parte del tejido adiposo parcialmente desagregado, y entonces continuar desagregando la
10 parte restante del tejido adiposo que queda en la cámara de recogida. Alternativamente, puede extraerse una parte del tejido adiposo lavado y apartarse en un recipiente de muestra antes de cualquier digestión. El tejido adiposo recogido puede desagregarse parcialmente para concentrar las células antes de que se reintroduzcan de nuevo en el paciente. Por ejemplo, el tejido adiposo se mezcla con un agente de desagregación tisular durante un periodo de tiempo
15 generalmente menor de aproximadamente 20 minutos. Entonces puede extraerse una parte del tejido parcialmente desagregado de la cámara de recogida, y puede desagregarse adicionalmente el tejido parcialmente desagregado restante mezclando el tejido adiposo con un agente de desagregación tisular durante 40 minutos más. Cuando van a usarse las células derivadas de tejido adiposo como población esencialmente pura de células regenerativas, el
20 tejido adiposo puede desagregarse completamente.

Tras la digestión, se deja sedimentar la disolución de tejido y agente de desagregación durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que los componentes flotantes y no flotantes de la disolución se diferencien dentro de la cámara de recogida. Normalmente, el tiempo oscila entre aproximadamente 15 segundos y varios minutos pero otras veces puede
25 implementarse en realizaciones modificadas. La capa flotante está compuesta de las células regenerativas que requieren lavado y concentración adicional. La capa no flotante comprende sangre, colágeno, lípidos y otros componentes de células no regenerativas del tejido. Debe extraerse la capa no flotante hacia la cámara de desechos.

Por consiguiente, la cámara 20 de recogida está compuesta preferiblemente de un
30 orificio 22 de salida en el punto más bajo de la cámara de manera que puedan drenarse la sangre y otros componentes no flotantes del tejido a uno o más recipientes 40 de desecho mediante uno o más conductos 12. La cámara 20 de recogida generalmente está en (o puede colocarse en) una posición vertical de manera que los orificios 22 de salida se ubiquen en la parte inferior de la cámara de recogida. El drenaje puede ser pasivo o activo. Por ejemplo, los
35 componentes no flotantes descritos anteriormente pueden drenarse usando la gravedad,

aplicando presión positiva o negativa, mediante el uso de bombas 34 o mediante el uso de orificios 32 de ventilación. En realizaciones automatizadas, el dispositivo de procesamiento puede señalar que determinadas válvulas y/o bombas drenen la capa no flotante de la cámara 20 de recogida. Las realizaciones automatizadas también pueden estar compuestas de
5 sensores 29 que pueden detectar cuándo se ha alcanzado la superficie de separación entre los líquido flotantes y no flotantes. Las realizaciones automatizadas también pueden estar compuestas de un sensor 29, por ejemplo, un sensor óptico, que puede detectar un cambio en la refracción de la luz del afluente que fluye en el conducto que conduce fuera de la cámara de recogida. El cambio apropiado en la refracción de la luz puede señalar la presencia de la capa
10 flotante en los conductos de salida, lo que indica que se ha drenado la capa no flotante. Entonces, el sensor 29 puede señalar que el dispositivo de procesamiento avance a la siguiente etapa.

El tejido puede procesarse para recuperar el componente de células no regenerativas del tejido. Por ejemplo, en determinadas aplicaciones terapéuticas o de investigación, puede
15 desearse colágeno, proteínas, componentes del estroma o la matriz, lípidos, adipocitos u otros componentes del tejido. En tales realizaciones, es la capa flotante que comprende las células regenerativas la que debe extraerse tal como se describió anteriormente hacia la cámara de desechos. Entonces, se retiene la capa no flotante en el sistema para su procesamiento adicional según se necesite.

Una vez que se ha extraído la capa no flotante, la capa flotante que comprende las células regenerativas puede lavarse una o más veces para extraer contaminantes residuales. Por consiguiente, la cámara 20 de recogida normalmente incluye uno o más orificios 21 para
20 permitir que se sumistre la disolución de lavado al interior de la cámara, y uno o más orificios 22 para permitir que se dirijan el desecho y otros materiales fuera de la cámara 20 de recogida. Por ejemplo, la cámara de recogida puede incluir uno o más orificios de entrada sellados tal como se describen en el presente documento. La cámara 20 de recogida también puede incluir una o más tapas (no mostradas), tal como una tapa superior y una tapa inferior para garantizar
25 que el sistema permanece estéril mientras que se suministra disolución de lavado dentro de la cámara de recogida y/o se transporta hacia fuera el desecho. Los orificios 21 pueden proporcionarse en las tapas de la cámara de recogida o en una pared lateral de la cámara de recogida.

El procedimiento de lavado con disolución de lavado nueva puede repetirse hasta que el contenido residual de contaminantes no flotantes en la disolución alcance un nivel
35 predeterminado. En otras palabras, el material restante en la cámara 20 de recogida, que comprende el material flotante de la mezcla descrita anteriormente, incluyendo fragmentos de

tejido adiposo, puede lavarse una o más veces adicionales hasta que se reduzca la cantidad de material no deseado hasta un nivel predeterminado deseado. Un procedimiento de determinación del punto final del lavado es medir la cantidad de glóbulos rojos en la disolución de tejido. Esto puede llevarse a cabo midiendo la luz absorbida en la longitud de onda de 540 nm. En una realización preferida, un intervalo entre aproximadamente 0,546 y aproximadamente 0,842 se considera aceptable.

Durante el lavado y/o la desagregación, pueden añadirse uno o más aditivos a los diversos recipientes según se necesite para mejorar los resultados. Algunos ejemplos de aditivos incluyen agentes que optimizan el lavado y la desagregación, aditivos que potencian la viabilidad de la población de células activas durante el procesamiento, agentes antimicrobianos (por ejemplo, antibióticos), aditivos que lisan adipocitos y/o glóbulos rojos, o aditivos que enriquecen poblaciones de células de interés (mediante adherencia diferencial a restos de fase sólida o promoviendo de otro modo la reducción o el enriquecimiento sustancial de las poblaciones celulares). Otros aditivos posibles incluyen los que promueven la recuperación y la viabilidad de las células regenerativas (por ejemplo, inhibidores de caspasas) o que reducen la probabilidad de reacción adversa en la infusión o el emplazamiento (por ejemplo, inhibidores de la reagregación de células o tejido conjuntivo).

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

La cámara 30 de procesamiento está colocada preferiblemente dentro del sistema de manera que la composición de células regenerativas se mueve desde la cámara 20 de recogida hasta la cámara 30 de procesamiento por medio del tubo 12, las válvulas 14 y la bomba 34 de una manera estéril. La cámara de procesamiento está dimensionada para alojar

mezclas de tejido/fluido que oscilan entre 10 ml y 1,2 l. En una realización preferida, la cámara de procesamiento está dimensionada para alojar 800 ml. En determinadas realizaciones, se dirige toda la composición de células regenerativas desde la cámara 20 de recogida hasta la cámara 30 de procesamiento. Sin embargo, en otras realizaciones, se dirige una parte de la composición de células regenerativas a la cámara 30 de procesamiento, y se dirige otra parte a una región diferente del sistema, por ejemplo, la cámara 60 de muestra, para recombinarse con células procesadas en la cámara 30 de procesamiento en un momento posterior.

La cámara 30 de procesamiento puede construirse usando cualquier material biocompatible adecuado que pueda esterilizarse. En una realización preferida, la cámara 30 de procesamiento se construye de material desechable que cumple los requisitos de biocompatibilidad para el contacto intravascular, tal como se describen en la norma ISO 10993. Por ejemplo, puede usarse policarbonato, acrílico, ABS, acetato de etilenvinilo o copolímeros de estireno-butadieno (SBC). En otra realización, la trayectoria del fluido de la cámara de procesamiento desechable está libre de pirógenos. La cámara de procesamiento puede estar en forma de una bolsa de plástico, tal como las usadas convencionalmente en el procesamiento de sangre en bancos de sangre; o en otras realizaciones, puede ser estructuralmente rígida (figura 6). En una realización, la cámara 30 de procesamiento puede ser similar a la cámara de procesamiento dada a conocer en la solicitud estadounidense de propiedad conjunta n.º 10/316.127, presentada el 7 de diciembre de 2001 y la solicitud estadounidense n.º 10/325.728, presentada el 20 de diciembre de 2002.

La cámara 30 de procesamiento puede construirse de cualquier manera adecuada para separar y concentrar células, incluyendo filtración y centrifugación y/o combinaciones de las mismas. En determinadas realizaciones, la composición de células regenerativas de la cámara 20 de recogida se introduce en la cámara 30 de procesamiento en la que la composición puede filtrarse para separar y/o concentrar una población de células regenerativas particular. La filtración celular es un procedimiento de separación de componentes particulares y células de otros componentes o tipos de células diferentes. Por ejemplo, la composición de células regenerativas comprende múltiples tipos diferentes de células, incluyendo células madre, células progenitoras y adipocitos, así como uno o más contaminantes, tales como colágeno, que estaba presente en fragmentos de tejido adiposo, o colagenasa residual del procedimiento de desagregación tisular. Los filtros 36 presentes en la cámara 30 de procesamiento pueden permitir la separación y concentración de una subpoblación particular de células regenerativas, por ejemplo, células madre o células progenitoras endoteliales, etc.

Algunas variables que se asocian con la filtración de células a partir de un líquido incluyen, pero sin limitarse a, el tamaño de poro de los medios de filtro, la geometría (forma) del

poro, el área superficial del filtro, la dirección del flujo de la disolución que está filtrándose, la presión transmembrana, la dilución de la población celular particular, el tamaño y la forma del particulado así como el tamaño celular y la viabilidad celular. Según la descripción en el presente documento, las células particulares que se desean separar o filtrar normalmente son células madre derivadas normalmente de tejido adiposo. Sin embargo, en determinadas realizaciones, las células particulares pueden incluir células progenitoras derivadas de tejido adiposo, tales como células precursoras endoteliales, solas o en combinación con las células madre.

La composición de células regenerativas puede dirigirse a través de un conjunto de filtros, tal como el conjunto 36 de filtros. En determinadas realizaciones, el conjunto 36 de filtros comprende una pluralidad de filtros que están estructurados para realizar diferentes funciones y separar la composición de células regenerativas en partes o componentes distintos. Por ejemplo, uno de los filtros puede configurarse para separar el colágeno de la composición de células regenerativas, uno de los filtros puede configurarse para separar adipocitos y/o componentes lipídicos de la composición de células regenerativas, y uno de los filtros puede configurarse para separar enzimas residuales, tales como el agente de desagregación tisular, de la composición de células regenerativas. En determinadas realizaciones, uno de los filtros puede realizar dos funciones, tales como la separación del colágeno y el agente de desagregación tisular de la composición. Normalmente, la pluralidad de filtros se dispone en serie; sin embargo, al menos una parte de los filtros también puede disponerse en paralelo. En la figura 2 se muestra una disposición en serie de los filtros del conjunto 36 de filtros. En la figura 3 se muestra una disposición en paralelo de los filtros del conjunto 36 de filtros.

En una realización, el conjunto 36 de filtros comprende un primer filtro, un segundo filtro y un tercer filtro. El primer filtro está configurado para eliminar partículas de colágeno presentes en la composición de células regenerativas. Normalmente, estas partículas de colágeno son de aproximadamente 0,1 micrómetros de diámetro y puede ser de hasta 20 micrómetros de largo. Las partículas de colágeno pueden ser de tamaños variables dependiendo de la digestión. También puede ser fibrillas, lo que significa que tienen giros y vueltas. Cualquiera de los filtros descritos en el presente documento puede estar hecho de poliétersulfona, poliéster, PTFE, polipropileno, PVDF, o posiblemente celulosa. Existen dos posibilidades para filtrar el colágeno. Una es tratar de extraer en primer lugar las partículas más grandes, dejando que las células pasen a través, lo que requeriría por ejemplo un filtro probablemente en el intervalo de 10 micrómetros. El segundo procedimiento es usar un filtro de menor tamaño, tal como de 4,5 micrómetros, con la intención de que el colágeno se digiriera bien, de modo que atrape las células y deje que el colágeno pase a través. Esto requeriría un medio para hacer flotar las

células de nuevo fuera del filtro. También existe una posibilidad de implementar un filtro que atraería y retendría las fibras de colágeno.

El segundo filtro está configurado para extraer adipocitos inmaduros libres que no flotan en la composición de células regenerativas. En una realización, el segundo filtro puede construirse de poliéster y tener un tamaño de poro entre aproximadamente 30 y aproximadamente 50 micrómetros, siendo un tamaño de poro preferido aproximadamente 40 micrómetros. Aunque se denomina como segundo filtro, la colocación de un dispositivo de este tipo puede ser en una primera en lugar de una segunda posición para facilitar una eliminación inicial de células y partículas grandes. El tercer filtro está configurado para eliminar la colagenasa no usada o residual u otro agente de desagregación tisular presente en la composición. En una implementación preferida, la colagenasa puede degenerarse con el tiempo. En una realización, el tercer filtro comprende una pluralidad de poros que tienen un diámetro, o longitud menor de 1 μm . En determinadas realizaciones, los poros pueden tener diámetros que son menores de 1 μm . En otras realizaciones, los poros tienen diámetros entre 10 kD y 5 micrómetros. En determinadas realizaciones, el tercer filtro puede configurarse para concentrar la población de células regenerativas en un volumen pequeño de solución salina u otra disolución de lavado, tal como se trata en el presente documento. Tal como se prefiere en la actualidad, sólo el filtro final es la unidad de fibra hueca. No es necesario que cualquiera de los filtros sea del tipo de fibra hueca. La unidad de fibra hueca se usa para el filtro final en una implementación preferida porque es el más eficaz en la eliminación de colagenasa con el menor efecto perjudicial para las células regenerativas. En una realización en la que el dispositivo es una colección de elementos disponibles en el mercado, los tres filtros están en alojamientos separados. Es factible tener los filtros primero y segundo combinados en un alojamiento si se usa una unidad de fibra hueca para el tercer filtro. Si el filtro final no es un sistema de fibra hueca entonces, los tres filtros pueden contenerse en un alojamiento.

Los filtros del conjunto 36 de filtros pueden ubicarse en la cámara 30 de procesamiento o pueden proporcionarse como componentes separados de la cámara 30 de procesamiento. Además, los filtros del conjunto 36 de filtros pueden proporcionarse en múltiples cámaras de procesamiento o de una manera en línea. En determinadas realizaciones, los conductos o los tubos pueden actuar como cámara o cámaras de procesamiento. La cámara de procesamiento puede reducirse en tamaño de manera que se convierta en el volumen interior de los conductos que conectan los filtros. Este tipo de sistema funcionará correctamente si el volumen de la disolución de tejido se dimensiona apropiadamente. Por tanto, los conductos pueden actuar como cámara de procesamiento conteniendo el fluido con las células a medida que se hace pasar a través de los filtros. Debe tenerse cuidado al minimizar el volumen de los conductos de

modo que no se pierdan innecesariamente células/tejido en el proceso de cebado o ejecución del sistema.

Haciendo referencia a la realización descrita anteriormente, la composición de células regenerativas, que contiene las células lavadas y colágeno residual, adipocitos y/o agente de desagregación tisular no digerido, puede dirigirse a través del primer filtro para eliminar al menos una parte de y preferiblemente de manera sustancial todas las partículas de colágeno de la composición de modo que estén presentes menos, y preferiblemente ninguna, partícula de colágeno en la disolución filtrada. Entonces, la composición de células regenerativas filtrada que contiene los adipocitos y/o el agente de desagregación tisular no digerido puede dirigirse a través del segundo filtro para extraer al menos una parte de y preferiblemente de manera sustancial todos los adipocitos libres de la composición de células regenerativas filtrada. Posteriormente, la composición de células regenerativas filtrada dos veces, que contiene el agente de desagregación tisular no digerido, puede dirigirse a través del tercer filtro, tal como un dispositivo de filtración de fibra hueca, tal como se trata en el presente documento, para eliminar o reducir el agente de desagregación tisular no digerido de la composición de células regenerativas.

Entonces, la composición de células regenerativas filtrada tres veces (es decir, la composición que queda tras haberse pasado a través de los filtros primero, segundo y tercero) puede dirigirse a múltiples salidas, que pueden incluir una parte de la cámara 30 de procesamiento que comprende múltiples salidas. Estas salidas pueden servir para mantener la presión necesaria, así como para proporcionar conexiones mediante conductos a otros recipientes que pueden incluir la cámara 20 de recogida, la cámara 50 de salida y/o el recipiente 40 de desechos.

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

de filtro pueden oscilar entre aproximadamente 10 kiloDaltons y aproximadamente 5 micrómetros siendo un tamaño de poro preferido aproximadamente 0,5 micrómetros.

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

Al usar un flujo tangencial de fluido, puede potenciarse la eficacia de filtración de las células madre en relación con otras técnicas de filtración. Por ejemplo, según algunas técnicas de filtración, los poros de los medios de filtro están colocados de tal manera que el filtro se orienta perpendicular al flujo del fluido de modo que los medios de filtro bloquean la trayectoria del fluido que está filtrándose, tal como se ilustra en la figura 12B. En este tipo de filtración, las partículas que están filtrándose fuera de la composición de células regenerativas, por ejemplo, las células madre, tienden a acumularse en un lado del filtro y bloquean el flujo del fluido a través de los poros. Este bloqueo puede reducir la eficacia del filtro. Además, las células se comprimen constantemente por la presión del flujo de fluido así como el peso de las células que se acumulan en el lado aguas arriba del filtro. Esto puede conducir a un aumento de lisis de células madre. Por tanto, en tales técnicas de filtración en las que el flujo de fluido es paralelo a la orientación de los poros en el filtro, tanto las células grandes como las partículas pequeñas pueden dirigirse de manera no deseable contra los medios de filtro a medida que el fluido pasa a través de los poros. En consecuencia, productos más grandes en el líquido tales como células pueden bloquear los poros, disminuyendo de ese modo el efecto de filtración y aumentando la aparición de ruptura o lesión celular.

Por el contrario, en la configuración de fibra hueca del presente sistema 10, el fluido que está filtrándose fluye dentro de la luz del tubo hueco. La parte del fluido que tiene la capacidad de pasar a través de los poros del cuerpo del filtro lo hace con la ayuda de la presión positiva del fluido en el interior del cuerpo así como una presión negativa que se aplica en el exterior del cuerpo. En esta realización, normalmente las células no se someten a la presión del flujo de fluido o el peso de otras células y, por tanto, se reducen las fuerzas de corte sobre las células

madre. Por tanto, pueden potenciarse la eficacia y la efectividad de la filtración mediante la reducción de las tasas de obstrucción y la reducción en la lisis de células regenerativas. Debido al tamaño de las moléculas de la solución salina y las proteínas no deseadas, durante la filtración, estas moléculas y otros componentes pequeños pasan a través de los poros de los cuerpos de los tubos huecos hacia el exterior de los tubos huecos y se dirigen hacia el recipiente 40 de desechos. En una realización, la filtración se potencia generando un vacío en el exterior de los medios de filtro de tubos huecos. Debido al tamaño de las células regenerativas, por ejemplo, células madre o células progenitoras, estas células normalmente no pueden pasar a través de los poros del cuerpo y por tanto permanecen en el interior del filtro de tubos huecos (por ejemplo, en las luces de los tubos) y se dirigen de nuevo a la cámara 30 de procesamiento mediante un conducto entre el filtro y la cámara de procesamiento, o a la cámara 50 de salida.

En una realización específica, el filtro de fibra hueca tiene aproximadamente un tamaño de poro de 0,05 micrómetros, y contiene aproximadamente 550 cm² de área superficial de medios de filtro. Un tubo de medios individuales normalmente tiene un diámetro de aproximadamente 0,5 mm. En el procesamiento de 130 ml de la composición de células regenerativas, pueden añadirse aproximadamente 120 ml de solución salina adicional a la composición. El procesamiento o el tiempo de filtración puede ser de aproximadamente 8 minutos. El diferencial de las presiones en cualquier lado del cuerpo del tubo de fibra hueca (por ejemplo, la presión dentro de la luz del cuerpo, y fuera del cuerpo) se considera la presión transmembrana. La presión transmembrana puede oscilar entre aproximadamente 1 mmHg y aproximadamente 500 mmHg siendo una presión preferida aproximadamente 200 mmHg. La viabilidad y recuperación de células nucleadas promedio usando la filtración con fibras huecas puede ser de aproximadamente el 80% de células viables.

La cantidad de colagenasa que normalmente se elimina en un sistema de este tipo corresponde a una reducción logarítmica de tres. Por ejemplo, si la concentración inicial de colagenasa en la composición de células regenerativas que se transfiere de la cámara de recogida a la cámara de procesamiento es de 0,078 U/ml, la concentración de colagenasa de la composición de células regenerativas final sería de 0,00078 U/ml. Se elimina la colagenasa en el filtro de fibra hueca, y el filtro de fibra hueca corresponde al tercer filtro comentado anteriormente.

En las figuras se muestran cámaras de procesamiento que ilustran uno o más procedimientos de filtración celular descritos anteriormente, particularmente las figuras 1-3. Haciendo referencia a las figuras 1-3, entre la cámara 30 de procesamiento y la cámara de filtración del conjunto 36 de filtros, puede proporcionarse una bomba, tal como una bomba 34.

Además, pueden proporcionarse un orificio de ventilación y sensores de presión, tales como el orificio 32 de ventilación y el sensor 39 de presión, en línea con la cámara 30 de procesamiento y el conjunto 36 de filtros. También pueden proporcionarse montajes para la cámara 50 de salida. Estos componentes opcionales (por ejemplo, la bomba 34, el orificio 32 de ventilación, el sensor 39 de presión y los montajes para la cámara 50 de salida) pueden proporcionarse entre la cámara 30 de procesamiento y el conjunto 36 de filtros de modo que el líquido contenido en la cámara 30 de procesamiento puede fluir a uno o más de estos componentes opcionales antes de que fluya a través del conjunto 36 de filtros. Por ejemplo, el líquido puede fluir a través de la bomba 34 antes de que pase al conjunto 36 de filtros. O, el líquido puede pasar a través del sensor 39 de presión antes de que pase a través del conjunto de filtros para obtener una presión de líquido prefiltro en el sistema. En determinadas situaciones, uno o más de estos componentes también pueden proporcionarse como un elemento de la cámara 30 de procesamiento, tal como el orificio 32 de ventilación tal como se ilustra en la figura. 6. En la realización ilustrada, el sensor 39 de presión está en línea para determinar la presión de la composición de células regenerativas que se genera mediante la bomba 34 a medida que se introduce en la cámara de filtración del conjunto 36 de filtros. Esta construcción puede facilitar el control de la presión transmembrana a través de la membrana de filtro. Puede añadirse solución salina adicional u otro tampón y disolución de lavado a la composición de células regenerativas para ayudar en la eliminación de proteínas no deseadas a medida que se filtra la composición a través del conjunto 36 de filtros. Este lavado repetido puede realizarse múltiples veces para potenciar la pureza de las células regenerativas. En determinadas realizaciones, puede añadirse la solución salina en cualquier etapa según se considere necesario para potenciar la filtración.

En una realización específica, que se proporciona a modo de ejemplo y no de limitación, se extraen las proteínas no deseadas y la solución salina u otra disolución de lavado de la siguiente manera. Se recircula la composición con las células regenerativas, así como partículas o fragmentos de tejido conjuntivo y colágeno, adipocitos y colagenasa, a través de una serie de filtros hasta que se alcanza un volumen mínimo. El volumen mínimo es una función del volumen de retención total del sistema y alguna constante predeterminada. El volumen de retención es el volumen de líquido que está contenido en los tubos y los conductos si todas las cámaras de procesamiento están vacías. En una realización, el volumen mínimo es de 15 ml. Cuando se alcanza el volumen mínimo, se introduce un volumen predeterminado de disolución de lavado en el sistema para mezclarse con la composición de células regenerativas. Entonces, se recircula esta mezcla de disolución de lavado y la composición de células regenerativas a través de los filtros hasta que se alcanza de nuevo el volumen mínimo.

Este ciclo puede repetirse múltiples veces para potenciar la pureza de las células regenerativas, o en otras palabras, para aumentar la proporción de células regenerativas en la composición con respecto a los otros materiales en la composición. Véanse las figuras 10 y 11.

Tras haberse determinado que la composición de células regenerativas se ha limpiado de proteínas no deseadas y se ha concentrado suficientemente (en realizaciones ejemplares, pueden usarse concentraciones mínimas dentro de un intervalo de aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 1×10^7 células/ml y, en una realización preferida, la concentración mínima puede ser de aproximadamente 1×10^7 células/ml), puede conectarse una cámara 50 de salida, tal como una bolsa de salida, a un orificio de salida de la cámara 30 de procesamiento y/o el conjunto 36 de filtros, dependiendo de la realización específica. Un orificio de ventilación, tal como el orificio 32 de ventilación, puede abrirse entonces para facilitar la salida de las células regenerativas concentradas. En una implementación, esta determinación de cuándo se ha alcanzado una concentración mínima se realiza empíricamente tras haberse realizado experimentos y haberse programado en los controles electrónicos del dispositivo. La determinación puede ser una entrada en el procedimiento de lo que se desea producir, es decir, cuántas células madre/progenitoras se desean, o el intervalo de concentración celular. Basándose en datos científicos, es necesario obtener y colocar en el sistema una cantidad predefinida de tejido adiposo para lograr el resultado deseado. Con el orificio 32 de ventilación abierto, una bomba, tal como la bomba 34, puede funcionar para transferir las células regenerativas concentradas en la bolsa de salida. En una realización, la bolsa 50 de salida es similar a una bolsa de sangre vacía que tiene un tubo con un montaje en un extremo. De una manera estéril, puede unirse el montaje en la bolsa de salida al orificio de salida, y las células regenerativas concentradas pueden transferirse a la bolsa de salida.

Tal como se ilustra en las figuras 1-3, puede proporcionarse una bomba 26 de vacío en el sistema 10 para cambiar la presión en el sistema, entre otras cosas. Por ejemplo, puede acoplarse la bomba 26 de vacío a la cámara 20 de recogida mediante un conducto, tal como el conducto 12b, para provocar una disminución en la presión dentro de la cámara 20 de recogida. También puede acoplarse la bomba de vacío 26 a la cámara 30 de procesamiento, por medio de un conducto, tal como el conducto 12g. Por lo que se refiere al funcionamiento de la bomba 26 de vacío en relación con la bomba 34, pueden implementarse dos bombas o fuentes de vacío separadas, o puede implementarse una sola usando válvulas que dirigen el arrastre de vacío a los diferentes conductos que lo necesitan en puntos específicos en el procedimiento. Además, puede acoplarse la bomba 26 de vacío al recipiente 40 de desechos mediante un conducto, tal como el conducto 12f.

Haciendo referencia a las figuras 10 y 11, puede usarse la presión generada por la

bomba 26 de vacío para dirigir el flujo de fluidos, incluyendo las células regenerativas, a través de los conductos 12. Esta presión puede suministrarse en direcciones múltiples, por ejemplo, controlando automática o manualmente la posición de una o más válvulas 14 en el sistema 10. El sistema 10 puede fabricarse para funcionar apropiadamente con el uso de presión positiva o a través del uso de presión negativa, o combinaciones de las mismas. Por ejemplo, las células regenerativas pueden arrastrarse a través de los filtros primero y segundo descritos anteriormente al interior de un recipiente de lados blandos que está conectado al tercer filtro. El recipiente de lados blandos puede estar conectado en línea (en serie) delante del tercer filtro. La cámara de salida final puede ser un recipiente de lados blandos que está en el otro lado (por ejemplo, el lado aguas abajo) del tercer filtro. En esta realización, se usa presión para mover las células regenerativas desde un recipiente de lados blandos hasta un segundo recipiente de lados blandos a través del filtro.

En otra realización del sistema 10, la filtración de las células madre y/o las células progenitoras derivadas de tejido adiposo puede lograrse usando una combinación de filtración por percolación y sedimentación. Por ejemplo, un sistema de este tipo usa solución salina que se hace pasar a través de una composición de células regenerativas de tejido (por ejemplo, la composición que contiene las células madre y/o las células progenitoras derivadas de tejido adiposo) y luego a través de un filtro. Algunas de las variables que están asociadas con la filtración por percolación de una composición de células regenerativas incluyen, pero sin limitarse a, el tamaño de poro de los medios de filtro, la geometría o forma del poro, el área superficial del filtro, la dirección de flujo de la composición de células regenerativas que está filtrándose, el caudal de la solución salina infundida, la presión transmembrana, la dilución de la población celular, el tamaño y la viabilidad celular.

En una realización del sistema 10, la cámara 30 de procesamiento usa un conjunto 36 de filtros que implementa filtración por percolación y sedimentación para separar y concentrar las células regenerativas. A modo de ejemplo, y no a modo de limitación, se define la cámara 30 de procesamiento como un cuerpo generalmente cilíndrico que tiene una pared 30a lateral, una superficie 30b superior y una superficie 30c inferior, tal como se muestra en la figura 6. Se proporciona un orificio 32 de ventilación estéril en la superficie 30b superior.

En la realización de la figura 6, se ilustra la cámara 30 de procesamiento incluyendo un conjunto 36 de filtros, que incluye tres filtros, tales como el filtro 36a de poros grandes y el filtro 36b de poros pequeños. Los tamaños de poro de los filtros 36a y 36b normalmente están en un intervalo entre aproximadamente 0,05 micrómetros y aproximadamente 10 micrómetros. El filtro 36a de poros grandes puede comprender poros con un diámetro de aproximadamente 5 μm , y el filtro 36b de poros pequeños puede comprender poros con un diámetro de aproximadamente

1-3 μm . En una realización, los filtros tienen un área superficial de aproximadamente 785 mm^2 . Los filtros 36a y 36b dividen un interior de la cámara 30 de procesamiento para incluir una primera cámara 37a, una segunda cámara 37b y una tercera cámara 37c. Tal como se muestra en la figura 6, la primera cámara 37a se ubica entre la segunda cámara 37b y la tercera cámara 37c. Además, se muestra la primera cámara 37a como la región de la cámara 30 de procesamiento que tiene un orificio 31a de entrada y un orificio 31b de salida. La cámara 30 de procesamiento ilustrada incluye una pluralidad de orificios que proporcionan trayectorias de comunicación desde un exterior de la cámara 30 de procesamiento hasta el interior de la cámara 30 de procesamiento, tales como los orificios 31a, 31b y 31c. Los orificios 31a, 31b y 31c, se ilustran dispuestos en la pared lateral 30a de un cuerpo de la cámara 30 de procesamiento. Sin embargo, los orificios 31a, 31b y 31c también pueden colocarse en otras regiones. El orificio 31a se ilustra como un orificio de entrada de muestra, que se construye para que esté acoplado a un conducto de modo que una composición que contiene células regenerativas puede pasar al interior de la cámara 30 de procesamiento. El orificio 31b se ilustra como un orificio de salida construido para acoplarse a un conducto de modo que puedan extraerse las células separadas y concentradas del interior de la cámara 30 de procesamiento. El orificio 31c se ilustra como un orificio de entrada construido para acoplarse a un conducto para el suministro de una disolución de lavado nueva, tal como solución salina al interior de la cámara 30 de procesamiento.

En uso, las células regenerativas pueden introducirse en la cámara 37a central mediante el orificio 31a de entrada. Se introduce solución salina u otro tampón en la cámara 37b inferior a través del orificio 31c de entrada. La solución salina puede dirigirse a través de la composición de células regenerativas en la cámara 37a a una velocidad de aproximadamente 10 ml/min . El caudal de la solución salina es tal que contrarresta la fuerza de la gravedad. El flujo de solución salina proporciona a las células en la cámara la capacidad de separarse basándose en la densidad de las células. Normalmente, a medida que la solución salina se fuerza hacia arriba a través de la composición, las células más grandes en la composición sedimentarán en la parte inferior de la cámara 37a central, y las células y proteínas más pequeñas se transportarán a través del segundo filtro 36b al interior de la cámara 37c superior. Este filtrado se logra ajustando el caudal de la solución salina de manera que las células más grandes se hacen rodar en su sitio, lo que permite que se liberen las partículas más pequeñas y se las lleve la solución salina. El orificio 32 de ventilación estéril se incluye en la cámara 30 para garantizar que se mantiene el gradiente de presión correcto en las tres cámaras dentro de la unidad de procesamiento. La cámara 37c superior puede comprender un medio absorbente. El fin de los medios absorbentes es atrapar las proteínas no deseadas en la

disolución para garantizar que no cruzan los medios de filtro de nuevo hacia la disolución de procesamiento, si, por ejemplo, disminuye el caudal de solución salina. Un medio absorbente puede ser un tipo de material de filtro que es absorbente, o atrae materiales o componentes que van a filtrarse. Puede añadirse un orificio de descarga por encima del filtro superior para ayudar a retirar el desecho. Otra realización de esto puede ser aplicar un vacío suave desde la parte superior para ayudar a sacar el desecho. Pueden implementarse medios absorbentes cuando, tal como en la realización ilustrada, los caudales son relativamente pequeños. Entonces se transportan solución salina y proteínas en exceso a un recipiente de desechos.

Tal como se comenta en el presente documento, cuando las células más grandes, (por ejemplo, las células madre y/o células progenitoras derivadas de tejido adiposo) se han separado suficientemente de proteínas y células más pequeñas, puede concentrarse la composición que contiene las células separadas. La composición puede concentrarse más tras haberse extraído de la cámara 37a a través del orificio 31b de salida, o mientras que está en la cámara 37a. En una realización, la concentración de células en la composición se aumenta de la siguiente manera. Tras haberse separado las células suficientemente, pueden moverse los filtros entre sí, tales como los filtros 36a y 36b. Este movimiento tiene el efecto de reducir el volumen entre los dos filtros (por ejemplo, el volumen de la cámara 37a). También puede proporcionarse un elemento de vibración en conexión con la cámara 30 de procesamiento para facilitar la concentración de las células en la composición. En una realización, puede acoplarse el elemento de vibración al filtro 36b (por ejemplo, el filtro de poros pequeños). La vibración puede reducir una incidencia de células que quedan atrapadas en los filtros. La reducción en volumen de la composición permite que se extraiga el exceso de solución salina como desecho y que las células se concentren en un volumen más pequeño.

En otra realización, la concentración de las células regenerativas se logra de la siguiente manera. Tras haberse separado las células suficientemente, puede transferirse la composición de células regenerativas a otra cámara (no mostrada) que usa la gravedad para filtrar el exceso de solución salina. En una realización preferida, la sedimentación puede producirse al mismo tiempo que la percolación. Esta sedimentación puede llevarse a cabo introduciendo la composición en la parte superior de un filtro que tiene un tamaño de poro que oscila entre aproximadamente 10 kD y aproximadamente 2 micrómetros. En una realización, un filtro adecuado tiene un tamaño de poro de aproximadamente 1 micrómetro. La fuerza de la gravedad permitirá que la solución salina y partículas más pequeñas pasen a través del filtro mientras que se evita que las células en la composición fluyan a través del filtro. Tras haberse obtenido la concentración deseada de células, y tras haberse extraído las partículas más pequeñas filtradas por debajo del filtro, puede agitarse la composición de células regenerativas

para extraer las células del filtro y, posteriormente, las células regenerativas concentradas pueden transferirse a la bolsa de salida. Pueden retirarse las partículas más pequeñas como desecho a través de una salida.

En una realización particular, la composición de células regenerativas de la cámara 20 de recogida se transporta a la cámara 30 de procesamiento en la que la composición puede centrífugarse para separar y concentrar las células regenerativas. Los principios de centrifugación se conocen bien en la técnica y no se repetirán en el presente documento con el fin de brevedad. En el presente documento se utilizan dispositivos, componentes y parámetros de centrifugación reconocidos en la técnica, convencionales. En las figuras 7 y 8 se muestra una cámara de procesamiento ejemplar para su uso como parte de un dispositivo de centrífuga. Normalmente, un dispositivo de centrífuga provoca que una cámara de centrífuga (tal como la mostrada en la figura 7) gire alrededor de un eje aumentando de ese modo la fuerza sobre las células en la disolución para que sea mayor que la gravedad. Normalmente, los materiales más densos o más pesados en la disolución sedimentan en un extremo de la cámara de centrífuga, es decir, una cámara 50 de salida de la figura 7, para formar un sedimento de células regenerativas. Entonces el sedimento puede resuspenderse para obtener una disolución con una concentración deseada de células y/o un volumen deseado de células y medio. La cámara de procesamiento mostrada en la figura 7 se construye para separar y concentrar células usando tanto fuerzas centrífugas como gravitatorias. Específicamente, durante la centrifugación, la fuerza centrífuga dirige los componentes más densos de la composición de células regenerativas, por ejemplo, las células regenerativas, hacia los extremos exteriores de la cámara de centrífuga. A medida que la cámara de centrífuga disminuye su velocidad y finalmente se detiene, la fuerza gravitatoria ayuda a las células regenerativas a permanecer en los extremos exteriores de la cámara de centrífuga y formar un sedimento celular. Por consiguiente, pueden eliminarse los componentes no deseados de la composición de células regenerativas, es decir, el desecho, sin alterar el sedimento celular.

Aún en otra realización, la cámara de procesamiento puede estar compuesta de un concentrador celular en forma de un filtro de membrana giratorio. En otra realización del procedimiento de centrifugación, también puede aplicarse elutriación centrífuga. En esta realización, las células pueden separarse basándose en la velocidad de sedimentación celular individual de manera que la fuerza direccional (por ejemplo, hacia el exterior) aplicada mediante la centrifugación provoca que las células y los solutos sedimenten a diferentes velocidades. En la elutriación, la velocidad de sedimentación de la población de células diana se contrapone a un caudal opuesto (por ejemplo, hacia el interior) aplicado bombeando la disolución en la dirección opuesta a la fuerza centrífuga. Este contraflujo se ajusta de modo

que las células y las partículas dentro de la disolución se separan. La elutriación se ha aplicado en muchos casos de separación celular (Inoue, Carsten *et al.* 1981; Hayner, Braun *et al.* 1984; Noga 1999) y los principios y prácticas usados para optimizar el flujo y los parámetros centrífugos pueden aplicarse en el presente documento en vista de la presente descripción por un experto en la técnica.

La figura 9 ilustra los principios asociados con una implementación de la elutriación según la presente invención. La realización de la elutriación puede ser similar a la implementación de la centrifugación en el grado de que se aplica una fuerza a la disolución usando un rotor giratorio. Algunas de las variables que están asociadas con la separación por elutriación mostrada a modo de realización en este momento incluyen, pero sin limitarse a, el tamaño y la forma de la cámara giratoria, el diámetro del rotor, la velocidad del rotor, el diámetro de los tubos de contraflujo, el caudal del contraflujo, así como el tamaño y la densidad de las partículas y células que van a eliminarse de la disolución. Como en la centrifugación, las células regenerativas pueden separarse basándose en las densidades celulares individuales.

En una realización, la composición de células regenerativas, por ejemplo, la disolución que contiene las células regenerativas y la colagenasa, se introduce en una cámara de un rotor giratorio, tal como se muestra en la figura 9.1. Tras añadirse la disolución a la cámara, se añade solución salina adicional a un caudal predeterminado. El caudal de la solución salina puede determinarse como una función de la velocidad del rotor, el diámetro celular y la constante de la cámara que se ha establecido empíricamente. El caudal se controlará, por ejemplo, con un dispositivo similar a una bomba IV. Un fin de la solución salina adicional es proporcionar una condición dentro de la cámara del rotor en la que las partículas más grandes se moverán a un lado de cámara y las partículas más pequeñas se moverán al otro, tal como se ilustra en la figura 9.2. El flujo se ajusta de modo que, en esta aplicación, las partículas más pequeñas saldrán de la cámara y se moverán hacia un recipiente de desechos, tal como se muestra en la figura 9.3. Este movimiento da como resultado que la disolución en la cámara del rotor tenga una población sustancialmente homogénea de células, tales como células madre. Tras haberse determinado que las células madre se han separado del resto de elementos en la disolución (habiéndose extraído proteínas no deseadas y lípidos libres de la cámara), se detiene el contraflujo. Las células dentro de la cámara formarán entonces un sedimento concentrado en la pared exterior de la cámara. Se invierte el contraflujo y se transfiere el sedimento celular a la bolsa de salida.

Tal como se expuso anteriormente, la cámara 30 de procesamiento o la cámara 50 de salida puede incluir uno o más orificios, por ejemplo, los orificios 51 ó 52. Puede diseñarse uno o más de estos orificios para transportar las células regenerativas obtenidas usando cualquier

combinación de los procedimientos descritos anteriormente, o una parte de los mismos, mediante conductos a otros dispositivos quirúrgicos, dispositivos de cultivo celular, dispositivos de maceración células, dispositivos de terapia génica o dispositivos de purificación. Estos orificios también pueden diseñarse para transportar las células regenerativas mediante conductos a cámaras o recipientes adicionales dentro del sistema o como parte de otro sistema para los mismos fines descritos anteriormente. Los orificios y conductos también pueden usarse para añadir uno o más aditivos, por ejemplo, factores de crecimiento, fluidos de resuspensión, reactivos de cultivo celular, reactivos de expansión celular, reactivos de conservación celular o reactivos de modificación celular incluyendo agentes que transfieran genes a las células. También pueden usarse los orificios y conductos para transportar las células regenerativas a otras dianas tales como materiales de implante (por ejemplo, estructuras o fragmentos óseos) así como otros implantes y dispositivos quirúrgicos.

El procesamiento adicional de las células también puede iniciarse reconfigurando las interconexiones de los conjuntos desechables del sistema existente, reprogramando el dispositivo de procesamiento del sistema existente, proporcionando recipientes y/o cámaras diferentes o adicionales para el sistema existente, transportando las células a uno o más sistemas o dispositivos adicionales y/o cualquier combinación de los mismos. Por ejemplo, el sistema puede reconfigurarse mediante cualquiera de los medios descritos anteriormente de manera que las células regenerativas obtenidas usando el sistema puedan someterse a uno o más de lo siguiente: expansión celular (de uno o más tipos de células regenerativas) y mantenimiento celular (incluyendo aclarado de láminas de células y cambio de medios); subcultivo; siembra celular; transfección transitoria, medición de la viabilidad celular; aplicaciones de terapia celular; aplicaciones de terapia génica, medición del crecimiento celular; lisis; inoculación, infección o inducción.

Por ejemplo, si se requiere la expansión de una población de células regenerativas para una aplicación particular, podría usarse un enfoque que usa condiciones de cultivo para expandir preferencialmente la población mientras que otras poblaciones o bien se mantienen (y se reducen de ese modo por dilución con las células seleccionadas en crecimiento) o bien se pierden debido a la ausencia de condiciones de crecimiento requeridas. Sekiya *et al* han descrito las condiciones que pueden emplearse a este respecto para células madre derivadas de médula ósea (Sekiya *et al.*, 2002). Este enfoque (con o sin adherencia diferencial al plástico del cultivo tisular) puede aplicarse a una realización adicional de esta invención. En esta realización, se extrae el sedimento de células regenerativas final de la cámara de salida y se coloca en un segundo sistema que proporciona el componente de cultivo celular. Este puede estar en forma de un incubador de cultivo tisular de laboratorio convencional o un dispositivo de

estilo biorreactor tal como aquél descrito por Tsao *et al.*, patente estadounidense n.º 6.001.642, o en Armstrong *et al.*, patente estadounidense n.º 6.238.908. El componente de expansión celular o de cultivo celular puede añadirse al sistema existente, por ejemplo, dentro de la cámara de salida, lo que permite la adherencia a corto plazo y/o el cultivo celular de las poblaciones de células derivadas de tejido adiposo. Esta realización alternativa permitiría la integración del componente de cultivo celular y/o de expansión celular al sistema y eliminaría la necesidad de extraer las células de este sistema y su colocación dentro de otro.

Durante el procesamiento uno o más aditivos pueden añadirse a o proporcionarse a las diversas cámaras o recipientes según sea necesario para mejorar los resultados. Estos aditivos también pueden proporcionarse como parte de otro sistema asociado con el sistema existente o separarse del sistema existente. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, se añaden o se proporcionan los aditivos sin necesidad de extraer las células regenerativas del sistema. Los aditivos pueden añadirse o proporcionarse conectando un nuevo recipiente o cámara que comprende los aditivos dentro de un orificio no usado del sistema de una manera estéril. Alternativamente, se añaden o se proporcionan los aditivos en un segundo sistema o dispositivo que no está conectado al sistema de la presente invención. Algunos ejemplos de aditivos incluyen agentes que optimizan el lavado y la desagregación, aditivos que potencian la viabilidad de la población de células activas durante el procesamiento, agentes antimicrobianos (por ejemplo, antibióticos), aditivos que lisan adipocitos y/o glóbulos rojos, o aditivos que enriquecen poblaciones de células de interés (mediante adherencia diferencial a restos de fase sólida o para promover de otro modo la reducción o el enriquecimiento sustancial de poblaciones de células) tal como se describen en el presente documento.

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

El enfoque de adherencia diferencial puede incluir el uso de anticuerpos y/o combinaciones de anticuerpos que reconocen moléculas de superficie que se expresan de

manera diferencial en células regenerativas diana y células no deseadas. La selección basada en la expresión de marcadores de superficie celular específicos (o combinaciones de los mismos) es otra técnica aplicada comúnmente en la que se unen anticuerpos (directa o indirectamente) a una estructura de soporte de fase sólida (Geiselhart *et al.*, 1996; Formanek *et al.*, 1998; Graepler *et al.*, 1998; Kobari *et al.*, 2001; Mohr *et al.*, 2001).

El sedimento celular puede resuspenderse, ponerse en capas sobre (o debajo) de un material fluido formado dentro de un gradiente de densidad continuo o discontinuo y colocado en una centrífuga para la separación de poblaciones de células basándose en la densidad celular. También pueden emplearse enfoques de flujo continuo tales como aféresis (Smith, 1997) y elutriación (con o sin contracorriente) (Lasch *et al.*, 2000) (Ito y Shinomiya, 2001).

Otros ejemplos de aditivos pueden incluir componentes biológicos o estructurales adicionales, tales como factores de diferenciación celular, promotor de crecimiento, agentes inmunosupresores, dispositivos médicos o cualquier combinación de los mismos, tal como se comenta en el presente documento. Por ejemplo, pueden añadirse otras células, tejido, fragmentos de tejidos, factores de crecimiento tales como VEGF y otros factores de crecimiento angiogénicos y arteriogénicos conocidos, compuestos biológicamente activos o inertes, soportes reabsorbibles, u otros aditivos destinados a mejorar la administración, la eficacia, tolerabilidad o función de la población de células regenerativas. También puede modificarse la población de células regenerativas mediante la inserción de ADN o mediante la colocación en un sistema de cultivo celular (tal como se describe en el presente documento o se conoce en la técnica) de tal manera que cambie, potencie o complemente la función de las células regenerativas para la derivación de un fin estructural o terapéutico. Por ejemplo, expertos habituales en la técnica conocen técnicas de transferencia génica para células madre, tal como se da a conocer en (Morizono *et al.*, 2003; Mosca *et al.*, 2000), y pueden incluir técnicas de transfección viral, y más específicamente, técnicas de transferencia génica de virus adenoasociados, tal como se da a conocer en (Walther y Stem, 2000) y (Athanasopoulos *et al.*, 2000). También pueden realizarse técnicas no basadas en virus tal como se da a conocer en (Muramatsu *et al.*, 1998). También puede añadirse un gen que codifica uno o más factores de diferenciación celular, por ejemplo, un factor de crecimiento) o una(s) citocina(s). Los ejemplos de diversos agentes de diferenciación celular se dan a conocer en (Gimble *et al.*, 1995; Lennon *et al.*, 1995; Majumdar *et al.*, 1998; Caplan y Goldberg, 1999; Ohgushi y Caplan, 1999; Pittenger *et al.*, 1999; Caplan y Bruder, 2001; Fukuda, 2001; Worster *et al.*, 2001; Zuk *et al.*, 2001). También pueden añadirse genes que codifican factores o agentes antiapoptóticos. La adición del gen (o combinación de genes) puede ser mediante cualquier tecnología conocida en la técnica incluyendo, pero sin limitarse a, transducción adenoviral, “pistolas génicas”,

transducción mediada por liposomas y transducción mediada por retrovirus o lentivirus, plásmido, virus adenoasociado. Entonces pueden implantarse estas células regenerativas junto con un material portador que lleva un vehículo de administración génica que puede liberar y/o presentar genes a las células con el tiempo de manera que pueda continuar o iniciarse la transducción *in situ*.

Cuando el medicamento de la invención es para su administración a un paciente distinto del paciente de quien se obtuvieron las células y/o el tejido, pueden administrarse uno o más agentes inmunosupresores al paciente que recibe las células y/o el tejido para reducir, y preferiblemente evitar, el rechazo del trasplante. Tal como se usa en el presente documento, la expresión “fármaco o agente inmunosupresor” pretende incluir agentes farmacéuticos que inhiben o interfieren con la función inmunitaria normal. Los ejemplos de agentes inmunosupresores adecuados con los procedimientos dados a conocer en el presente documento incluyen agentes que inhiben rutas de coestimulación de células T/células B, tales como agentes que interfieren con el acoplamiento de las células T y células B mediante las rutas de CTLA4 y B7, tal como se da a conocer en la publicación de patente estadounidense n.º 20020182211. Un agente inmunosupresor preferido es ciclosporina A. Otros ejemplos incluyen miofenilato mofetilo, rapamicina y globulina antitimocítica. Puede administrarse el fármaco inmunosupresor con al menos un agente terapéutico más. El fármaco inmunosupresor se administra en una formulación que es compatible con la vía de administración y se administra a un sujeto a una dosificación suficiente para lograr el efecto terapéutico deseado. El fármaco inmunosupresor puede administrarse de manera transitoria durante un tiempo suficiente para inducir tolerancia a las células regenerativas de la invención.

El medicamento que comprende las células regenerativas puede ponerse en contacto, combinarse, mezclarse o añadirse a los aditivos mediante cualquier manera reconocida en la técnica, incluyendo dispositivos tales como los dispositivos de agitación y procedimientos asociados descritos en el presente documento. Por ejemplo, pueden usarse rodillos que se mueven o impulsados por compresión, inversión o balanceo.

Al menos una parte de las células regenerativas separadas y concentradas puede criopreservarse, tal como se describe en la solicitud de patente estadounidense n.º 10/242.094, titulada PRESERVATION OF NON EMBRYONIC CELLS FROM NON HEMATOPOIETIC TISSUES, presentada el 12 de septiembre de 2002, que reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional estadounidense 60/322.070 presentada el 14 de septiembre de 2001.

Al final del tratamiento, el medicamento que comprende las células regenerativas puede recuperarse manualmente de la cámara de salida. El medicamento que comprende las células puede cargarse en un dispositivo de administración, tal como una jeringuilla, para su colocación

en el receptor por vía subcutánea, intramuscular o bien otra técnica que permita la administración de las células al sitio diana dentro del paciente. En otras palabras, el medicamento que comprende las células puede colocarse en el paciente mediante cualquier medio conocido para los expertos habituales en la técnica, incluyendo la colocación mediante
5 aguja o catéter, o mediante implante quirúrgico directo. El medicamento que comprende las células puede transportarse automáticamente hasta una cámara de salida que puede estar en forma de un recipiente, una jeringuilla o un catéter, etc., que puede usarse para colocar las células en el paciente. El recipiente también puede usarse para almacenar las células para su uso posterior o para su crioconservación. Todos los procedimientos de recuperación se
10 realizan de manera estéril.

Los componentes del sistema pueden ser desechables (denominados en el presente documento “conjunto(s) desechable(s)”), de manera que pueden eliminarse partes del sistema tras un solo uso. Esta implementación puede ayudar a garantizar que cualquier superficie que
entre en contacto con el tejido del paciente se eliminará apropiadamente tras usarse. Un
15 conjunto desechable a modo de ejemplo se ilustra en la figura 13. En una realización preferida, los componentes desechables del sistema se esterilizan previamente y se empaquetan de modo que puedan usarse “prefabricados” que sean fáciles de usar y fáciles de cargar y que eliminen la necesidad de muchas conexiones de tubos. Tales componentes desechables son relativamente económicos para su fabricación, y por tanto, no crean un gasto sustancial debido
20 a su eliminación. En una realización, el sistema desechable (denominado indistintamente en el presente documento “conjunto(s) desechable(s)”) comprende, consiste esencialmente en, la cámara 20 de recogida, la cámara 30 de procesamiento, la cámara 40 de desechos, la cámara 50 de salida, los conjuntos 36 de filtros, la bolsa 60 de muestra y los conductos 12 o tubos asociados. En realizaciones preferidas de los conjuntos desechables del sistema, la cámara 20
25 de recogida y la cámara 30 de procesamiento están conectadas por medio de conductos 12 que se alojan en una estructura rígida. La red de sellado que rota (figuras 7 y 8) de una cámara 30 de procesamiento también puede alojarse en la misma estructura rígida. En otra realización preferida, las diversas cámaras y recipientes del conjunto desechable están compuestos por las interfaces necesarias que pueden comunicarse con el dispositivo de procesamiento del
30 sistema de manera que se activen o desactiven de manera apropiada las bombas, válvulas, sensores y otros dispositivos que automatizan el sistema según sea necesario sin la intervención del usuario. Las interfaces también reducen el tiempo y la pericia requerida para configurar el sistema y también reducen los errores indicando cómo configurar apropiadamente el sistema y alertando al usuario en caso de una configuración errónea.

35 La mayoría de los conjuntos desechables de la invención tendrán muchos elementos

comunes. Sin embargo, el experto habitual reconocerá que diferentes aplicaciones del sistema pueden requerir componentes adicionales que pueden ser parte de los conjuntos desechables. Por consiguiente, los conjuntos desechables pueden comprender además una o más agujas o jeringuillas adecuadas para obtener tejido adiposo u otro tejido del paciente y devolver células regenerativas al paciente. El número y la variedad de tipos de las agujas y jeringuillas incluidas dependerán del tipo y la cantidad de tejido que va a procesarse. Los conjuntos desechables pueden comprender además uno o más recipientes rígidos o flexibles para contener los fluidos de lavado y otros reactivos de procesamiento usados en el sistema. Por ejemplo, los conjuntos desechables pueden comprender recipientes para contener solución salina, enzimas y cualquier otro fluido de tratamiento o de reemplazo requeridos para el procedimiento. Además, los conjuntos desechables pueden dotarse de las disoluciones de lavado, fluidos de resuspensión, aditivos, agentes o materiales de trasplante adecuados para su uso junto con los sistemas y procedimientos de la invención.

Cualquier combinación de los componentes, equipos o suministros del sistema descritos en el presente documento o requeridos de otro modo para poner en práctica la invención puede proporcionarse en forma de un kit. Por ejemplo, un kit de la invención puede incluir, por ejemplo, la aguja de tamaño y calibre óptimos para la liposucción a base de jeringuilla y jeringuillas estériles que contienen los medios de filtro preferidos que permite el procesamiento de pequeños volúmenes de tejido. Otros suministros y equipo a modo de ejemplo que pueden usarse con la invención y pueden incluirse también con los kits de la invención se enumeran en las tablas II y III.

La tabla II a continuación identifica ejemplos de suministros que pueden usarse para obtener células regenerativas derivadas de tejido adiposo según los sistemas y procedimientos de la presente invención:

Tabla II

Descripción	Vendedor	Cantidad	Nota
Jeringuilla de 10 ml	Becton-Dickinson	según se requiera	Opcional, usada para liposucción
Aguja de punta roma 14GA		según se requiera	Opcional, usada para liposucción
Paquete de sangre individual (600 ml)	Baxter Fenwal	1	Bolsa de procesamiento de células principal; la bolsa tiene adaptador de punta en línea y dos puertos de puntas

Paquete de transferencia con acoplador (150 ml)	Baxter Fenwal	1	Conjunto de bolsas cuádruple
Paquete de transferencia con acoplador (1 l)	Baxter Fenwal	1	Bolsa de desechos
Acoplador de sitio de muestra	Baxter Fenwal	2	
Solución salina al 0,9% (para inyección)	Baxter Fenwal	1	
Aguja afilada 14 GA	Monoject	según se requiera	Para añadir tejido de liposucción a la bolsa
Aguja afilada 20GA	Monoject	3	Para añadir colagenasa y extraer células de PLA
Filtro Sterflip de 0,2 µm	Millipore	1	Para filtrar colagenasa
Presillas de sellado de aluminio Teruflex	Terumo	4	ME*ACS121 para sellar tubos temporalmente
Almohadilla de preparación de povidona yodada	Triadine	según se requiera	10-3201
Liberasa H1 colagenasa	Roche		Véase procedimiento nota 1
Obleas de TSCD	Terumo	2	1SC*W017 para su uso con soldador de tubos estéril TSCD

La tabla III, a continuación, identifica el equipo que puede usarse con los sistemas y procedimientos dados a conocer en el presente documento.

5

Tabla III

Descripción	Vendedor	Cantidad	Nota
Centrífuga Sorvall Legend T Easy Set	Fisher Scientific	1	75-004-367
Rotor	Kendro/Sorvall	1	rotor TTH-750
Cubetas de Rotor	Kenro/Sorvall	4	cubetas redondas 75006441
Adaptador para bolsas de 150 ml	Kendro/Sorvall	4	00511
Extractor de plasma	Baxter Fenwal	1	4R4414
Sellador de tubos	Sebra	1	Modelo 1060

Soldador de tubos estéril TSCD	Terumo	1	3ME*SC201AD
Balancín térmico LabLine	LabLine	1	4637
Pinzas de estilo de hemostato de plástico “desechables”	Davron	3	
Conjuntos de bolsas de equilibrio		2	Bolsas llenadas con agua usadas para equilibrar la centrífuga
Cámara de materiales cortopunzantes de riesgo biológico		1	
Cámara de desechos de riesgo biológico		1	

El componente reutilizable del sistema comprende, está constituido esencialmente por, o está constituido por el mecanismo de agitación para la cámara de recogida, la bomba y una variedad de sensores que activan las válvulas y los controles de bomba, el motor de la centrífuga, la estructura rotatoria del motor de la centrífuga, la pantalla de interfaz de usuario y los puertos USB, un dispositivo de interconexión o acoplamiento o configuración para conectar el conjunto desechable de manera que el conjunto desechable se una de forma segura a y se interconecte con el componente del hardware reutilizable y otros dispositivos asociados. En la figura 14, se ilustra un componente reutilizable a modo de ejemplo. En realizaciones preferidas, el componente reutilizable incluye un medio para separar y concentrar las células regenerativas de la composición de células regenerativas, por ejemplo, una centrífuga rotatoria. En esta realización, el componente reutilizable se diseña para conectar a e interconectar con una parte de la cámara de procesamiento (que comprende una cámara de centrífuga) del conjunto desechable tal como se muestra en la figura 15A. Se entiende que el medio para separar y concentrar las células regenerativas en el componente reutilizable no se limita a una centrífuga giratoria sino que también puede incluir cualquier otra configuración descrita en el presente documento, incluyendo un filtro de membrana giratorio. El componente reutilizable también puede alojar el dispositivo de procesamiento descrito en el presente documento que contiene el software preprogramado para llevar a cabo varios procedimientos de procesamiento de tejido diferentes y activar selectivamente las diversas bombas y válvulas del sistema en consecuencia. El procesador también puede incluir la capacidad de almacenamiento de datos para almacenar la información del donante/paciente, procesar o recoger información y otros

datos para su descarga o compilación posterior. El componente reutilizable puede usarse con una variedad de conjuntos desechables. El conjunto desechable está conectado al componente reutilizable mediante, por ejemplo, un dispositivo o configuración de interconexión para conectar el conjunto desechable de manera que el conjunto desechable se una de forma segura a e interconecte con el componente de hardware reutilizable de una manera que el dispositivo de procesamiento presente en el componente reutilizable pueda controlar, es decir, enviar y recibir señales a y desde los diversos componentes del conjunto desechable así como diversos componentes del componente reutilizable y otros dispositivos y sistemas asociados.

Los componentes desechables del sistema son fáciles de colocar en el dispositivo. En la figura 15a, se ilustra una ilustración de un conjunto desechable utilizado ensamblado junto con un componente reutilizable correspondiente. El sistema preferiblemente se diseña de manera que pueda detectar un componente desechable cargado de manera inapropiada. Por ejemplo, los componentes de cada conjunto desechable pueden tener marcas de guía de color para alinear e insertar de manera apropiada los tubos, las cámaras, etc. dentro de lugares apropiados en el sistema. En un ejemplo, el sistema utilizado en el presente documento es una unidad portátil. Por ejemplo, la unidad portátil puede poder moverse desde una ubicación en la que se ha producido la recogida del tejido adiposo, hasta otra ubicación para la recogida del tejido adiposo. En determinadas implementaciones, la unidad portátil es adecuada para recoger y procesar el tejido adiposo a pie de cama del paciente. Por tanto, una unidad portátil puede ser parte de un sistema que puede moverse de paciente a paciente. Por consiguiente, la unidad portátil puede estar sobre ruedas que se bloquean en su sitio y, por tanto, puede colocarse y usarse fácilmente en una ubicación conveniente en una posición estable y segura en todo el procedimiento. En otras realizaciones, la unidad portátil se diseña para su configuración y operación sobre una superficie plana tal como un tablero. La unidad portátil también puede contenerse en una unidad de alojamiento. La unidad portátil puede además estar compuesta por colgadores, ganchos, etiquetas, balanzas y otros dispositivos para ayudar en el procedimiento. Todos los componentes reutilizables descritos en el presente documento del sistema tales como la centrífuga, el dispositivo de procesamiento, la pantalla de visualización pueden montarse en la unidad portátil del sistema.

Una realización manual del sistema puede ponerse en práctica según las siguientes etapas e información, que se proporcionan a modo de ejemplo y no a modo de limitación. En primer lugar, se recoge tejido adiposo de un paciente. Se abre una línea de recuperación de tejido, o acoplador del sitio de toma de muestras y se inserta una punta dentro de un orificio lateral de la bolsa de sangre de 600 ml. Se recogen aproximadamente 10 ml de tejido adiposo en una jeringuilla de 10 ml mediante una cánula de punta roma. Se reemplaza la cánula de

punta roma con una aguja relativamente afilada (14G). Se limpia el sitio de toma de muestras con un paño yodado. Se inyecta el tejido adiposo dentro de la bolsa de 600 ml a través del sitio de toma de muestras. Entonces, se desechan la jeringuilla y la aguja en una cámara de objetos punzantes. Se repiten estas etapas hasta colocar suficiente tejido dentro de la bolsa. Se determina el tejido suficiente caso a caso basándose en las especificaciones clínicas del paciente y su aplicación.

En segundo lugar, se lava el tejido adiposo aspirado. Se engancha la bolsa de solución salina precalentada (37°C) por encima de la superficie de trabajo. Se coloca una pinza hemostática azul en el tubo entre la bolsa de 600 ml y la punta. Se cierra la pinza para sellar el tubo. Se usa la punta en la bolsa de 600 ml para entrar en la bolsa de solución salina (en esta configuración, usar la aguja en la bolsa de 600 ml para entrar en la bolsa de solución salina a través de la pared de caucho, limpiar la pared con yodo antes de la inserción de la aguja). Se libera la pinza azul y se deja que entren aproximadamente 150 ml de solución salina en la bolsa de 600 ml. Se cierra la pinza azul cuando ha entrado el volumen deseado de solución salina en la bolsa de 600 ml. Se invierte la bolsa de 600 ml 10-15 veces durante aproximadamente 15 segundos. Se aplica una segunda pinza azul al tubo que conduce desde la bolsa de desechos de 3 l hasta la punta. Se usa la punta en la bolsa de 3 l para entrar en la bolsa de 600 ml. Se cuelga invertida la bolsa de 600 ml por encima de la superficie de trabajo, y se deja reposar durante aproximadamente 1 minuto. Se libera la pinza azul que conduce a la bolsa de 3 l. Se deja que el fluido de desechos fluya hacia el interior de la bolsa de 3 l. Se aplica la bolsa azul para detener el flujo antes que el tejido entre en el tubo. Se baja la bolsa de 600 ml hasta la superficie de trabajo. Estas etapas se repiten dos veces más. Si el desecho de solución salina aún parece notablemente rojo, se indica un tercer ciclo adicional. Se usa un termosellador para sellar el tubo entre la bolsa de desechos de 3 l y la bolsa de 600 ml. El sellado se realiza aproximadamente a la mitad del tubo. Se extrae la bolsa de desechos de 3 l y se desecha. Se devuelve la bolsa de 600 ml a la superficie de trabajo.

En tercer lugar, se digiere el tejido adiposo lavado. Se libera la pinza azul en el tubo entre la solución salina y la bolsa de 600 ml para dejar que entren aproximadamente 150 ml de solución salina en la bolsa de 600 ml. Se limpia el sitio de toma de muestras en la bolsa de 600 ml con un paño yodado. Se inyecta colagenasa a través del sitio de toma de muestras a la bolsa de 600 ml. Se prepara la colagenasa descongelando un vial de colagenasa en un baño de agua a 37°C o equivalente, que no sea en microondas. Se inserta una jeringuilla de 1 ml con una aguja 22G en el vial. Se extrae la colagenasa dentro de la aguja. Se retira la aguja y se reemplaza con un filtro de 0,2 µm y una segunda aguja 22G. Entonces, se expulsa la colagenasa de la jeringuilla a través del filtro de 0,2 µm y la aguja. Se realiza la digestión del

tejido adiposo a una concentración de colagenasa final de 0,1-0,2 unidades Wünsch/ml. Se coloca la almohadilla térmica en el balancín. Durante este tiempo, la bolsa de solución salina, mientras que está aún unida, se coloca al lado del balancín. Se tiene cuidado de garantizar que el tubo que conduce a la bolsa de solución salina se coloque de tal manera que no quede atrapada en el balancín cuando este en movimiento. El controlador de la almohadilla térmica se ajusta a 37°C. Se coloca la bolsa de 600 ml en el balancín. Se ajusta el balancín al máximo. Se observa la bolsa para garantizar que está estable y se deja balancear durante aproximadamente 1 hora (55±10 minutos).

En cuarto lugar, se recupera la composición de células regenerativas. Se extrae la bolsa del balancín. Se aplica una pinza azul al tubo cerrado que condujo anteriormente hasta la bolsa de desechos. Se usa el dispositivo de conexión estéril para unir el conjunto de bolsas cuádruple (preparadas previamente según las siguientes instrucciones) al tubo que se unía anteriormente a la bolsa de desechos. El paquete cuádruple puede observarse como dos paquetes cuádruples unidos. Identificar los tubos dividiéndolos en dos paquetes, plegar los tubos de nuevo sobre sí mismos, y deslizar una presilla de metal sobre el tubo plegado (sobre ambas partes del tubo). Deslizar la presilla hacia abajo aproximadamente 1,27 cm (0,5 pulgadas). La estrechez formada en la curva actúa sellando el tubo. Usar un hemostato para fijar parcialmente por presión la presilla cerrada. La presilla no se fija por presión demasiado fuerte porque será necesario extraer la presilla durante el procesamiento. Se cuelga invertida la bolsa de 600 ml por encima de la superficie de trabajo y se deja reposar durante aproximadamente 3 minutos. Se libera la pinza azul en el tubo que conduce al conjunto cuádruple para extraer la fracción celular (la capa bajo la capa de grasa de color amarillo/naranja) hacia el conjunto cuádruple. Se tiene cuidado de evitar que la capa de grasa entre en el tubo. Durante este procedimiento, el tubo puede fijarse por presión manualmente para ralentizar el flujo a medida que la capa de grasa se acerque al tubo. Entonces se cierra el tubo que conduce al conjunto de bolsas cuádruple con una pinza azul, se devuelve la bolsa de 600 ml a la superficie de trabajo y se cuelga la bolsa de solución salina. Se libera la pinza azul en el tubo entre la solución salina y la bolsa de 600 ml para dejar que entren aproximadamente 150 ml de solución salina en la bolsa de 600 ml. Se invierte la bolsa de 600 ml aproximadamente 10-15 veces durante aproximadamente 15 segundos. Entonces, la bolsa de 600 ml se cuelga invertida por encima de la superficie de trabajo y se deja reposar durante aproximadamente 3-5 minutos. Se libera la pinza azul en el tubo que conduce al conjunto cuádruple, y se extrae la fracción celular (la capa debajo de la capa de grasa de color amarillo/naranja) hacia el conjunto cuádruple. Se tiene cuidado de evitar que la capa de grasa entre en el tubo. Por ejemplo, puede ralentizarse el flujo a medida que la capa de grasa se

acerca al tubo fijando por presión el tubo manualmente. Se cierra el tubo que conduce al conjunto de bolsas cuádruple con una pinza azul. Entonces se sella por calor el tubo que conduce desde el conjunto cuádruple hasta la bolsa de 600 ml. Entonces, se extrae y se desecha la bolsa de 600 ml.

5 En quinto lugar, se lava la composición de células regenerativas. Se coloca una abrazadera de metal en el tubo entre las dos bolsas llenas para sellar el tubo. Se coloca el conjunto cuádruple en una balanza. Se añade agua al segundo conjunto cuádruple de “simulación” para equilibrar el conjunto cuádruple. Se colocan el conjunto cuádruple y el conjunto equilibrado en cubetas opuestas de la centrífuga. Para el filtro hueco, se lavan las
10 células y se colocan en la bolsa, se sella el tubo entre la bolsa y el montaje de filtro de fibra hueca descrito anteriormente. Usando una bomba peristáltica, se hace pasar el fluido a través del montaje de filtro y se recoge el concentrado celular en una bolsa en el extremo aguas abajo. Se tiene cuidado de asegurarse de que las bolsas del conjunto cuádruple no esté comprimido y esté vertical. Se hace funcionar la centrífuga a 400xg durante 10 minutos. Se
15 extrae el conjunto cuádruple de la centrífuga y se coloca en el extractor de plasma. Se tiene cuidado de colocar las bolsa en el extractor de tal manera que el tubo duro en la parte superior de la bolsa esté justo en la parte superior de la placa posterior. Si la bolsa está demasiado alta, se retendrá demasiada solución salina, si está demasiado baja el tubo interferirá con la capacidad de la placa delantera de cerrar y de nuevo se retendrá demasiada solución salina.
20 Se aplica una sujeción azul a cada una de las líneas que conducen desde el conjunto cuádruple lleno al vacío. Se extraen las presillas de metal y las pinzas azules para dejar que el sobrenadante fluya hacia el conjunto cuádruple vacío. Se extrae hacia fuera tanta solución salina como sea posible, pero se tiene cuidado de no sacar el sedimento celular. Se sella por calor el tubo que pasa hacia el interior de cada una de las bolsas que contienen el
25 sobrenadante. Se retiran las bolsas de desechos que contienen el sobrenadante. Se aplican pinzas azules al tubo que conduce a cada una de las bolsas del conjunto cuádruple que contienen células. Se sacan las bolsas fuera del extractor de plasma. Se usa un dispositivo de conexión estéril para conectar el tubo que conduce al paquete cuádruple a la bolsa de solución salina. Se extrae la pinza azul que conduce a una de las bolsas del conjunto cuádruple para
30 dejar que fluyan aproximadamente 150 ml de solución hacia el interior de la bolsa, y entonces se vuelve a aplicar la pinza para detener el flujo de solución salina. Entonces, se invierte la bolsa del conjunto cuádruple llena aproximadamente 10-15 veces durante aproximadamente 15 segundos. Entonces, se retira la pinza azul que conduce a la bolsa del conjunto cuádruple vacía y se extrae todo el contenido de la bolsa llena hacia la bolsa vacía. Se vuelve a aplicar la
35 pinza de presilla de metal para sellar el tubo entre dos bolsas del conjunto cuádruple.

Entonces, se sella por calor el tubo y se retira la bolsa de solución salina. Entonces se invierte la bolsa del conjunto cuádruple llena aproximadamente 10-15 veces durante aproximadamente 15 segundos. Se coloca otro conjunto cuádruple de simulación en una balanza y se reequilibra con el conjunto cuádruple de células. Entonces se colocan las bolsas del conjunto cuádruple (una llena, una vacía) en la centrífuga de modo que las bolsas del conjunto cuádruple no estén comprimidas y estén verticales.

Se hace funcionar la centrífuga a aproximadamente 400xg durante 10 minutos. Entonces, se retira el conjunto cuádruple de la centrífuga y se coloca cuidadosamente en el extractor de plasma de tal manera que el tubo duro en la parte superior de la bolsa esté justo en la parte superior de la placa posterior. Si la bolsa está demasiado alta se retendrá demasiada solución salina, si está muy baja el tubo interferirá con la capacidad de la placa delantera para cerrar y de nuevo se retendrá demasiada solución salina. Se retira la presilla de metal para extraer todo el sobrenadante de la bolsa llena hacia la bolsa vacía teniendo cuidado de no sacar el sedimento de células regenerativas. Se sella el tubo entre las bolsas, y se retira y desecha la bolsa (de desechos) llena. Entonces se inserta un nuevo acoplador de sitio de toma de muestras dentro de la bolsa restante. Entonces, se resuspenden las células del sedimento celular en la solución salina residual (si hay alguna) para obtener una concentración de células regenerativas. La resuspensión puede realizarse mediante manipulación suave de la bolsa (por ejemplo, apretar y frotar).

En la figura 4 se muestra un ejemplo particular del sistema utilizado en la presente invención. La figura 4 ilustra un sistema y un procedimiento automatizado para separar y concentrar células regenerativas a partir de tejido, por ejemplo, tejido adiposo, adecuado para su reinfusión dentro de un paciente. En determinadas realizaciones del sistema mostrado en la figura 4, el sistema incluye además una etapa automatizada para aspirar una cantidad dada de tejido del paciente. El sistema mostrado en la figura 4 está compuesto por el conjunto desechable mostrado en la figura 13 que está conectado con el componente reutilizable del sistema mostrado en la figura 14 para llegar a una realización automatizada del sistema mostrado en la figura 15A. El conjunto desechable está conectado con el componente reutilizable mediante, por ejemplo, un dispositivo o configuración de interconexión o de acoplamiento, que conecta el conjunto desechable al componente reutilizable de manera que el conjunto desechable se una de forma segura a y se asocie con el componente de hardware reutilizable de una manera que el dispositivo de procesamiento presente en el componente reutilizable pueda controlar e interconectar con, es decir, enviar y recibir señales a y desde los diversos componentes del conjunto desechable así como diversos componentes del componente reutilizable y otros dispositivos y sistemas asociados.

El usuario puede conectar el conjunto desechable al componente reutilizable, introducir determinados parámetros usando la interfaz de usuario, por ejemplo, el volumen de tejido que va recogerse, unir el sistema al paciente, y el sistema realiza automáticamente todas las etapas mostradas en la figura 4 en una secuencia ininterrumpida usando parámetros preprogramados y/o de entrada del usuario. En la figura 15B se ilustra una secuencia de este tipo. Alternativamente, el tejido puede aspirarse manualmente desde el paciente por el usuario y transportarse al sistema para su procesamiento, es decir, separación y concentración de células regenerativas.

Específicamente, tal como se muestra en la figura 4, puede extraerse tejido, por ejemplo, tejido adiposo, del paciente usando el conducto 12 e introducirse dentro de la cámara 20 de recogida. En la figura 5 se muestra una ilustración detallada de la cámara de recogida de la figura 4. Tal como se ilustra en la figura 5, la cámara 20 de recogida puede estar compuesta por una línea 11 de vacío que facilita la extracción del tejido usando una cánula convencional. El usuario puede introducir el volumen estimado de tejido dirigido a la cámara 20 de recogida en este punto. El tejido se introduce en la cámara 20 de recogida a través de un orificio 21 de entrada que es parte de una ruta de fluido cerrada que permite que se añada tejido, solución salina y otros agentes al tejido de una manera aséptica. Un sensor óptico del sistema, por ejemplo, el sensor 29, puede detectar cuando el volumen de tejido de entrada del usuario está presente en la cámara 20 de recogida. En determinadas realizaciones, si está presente menos tejido en la cámara de recogida que la entrada del usuario, el usuario tendrá la opción de comenzar a procesar el volumen de tejido que está presente en la cámara 20 de recogida. En determinadas realizaciones, una parte del tejido extraído del paciente puede dirigirse a la cámara 60 de muestra mediante el uso de una bomba, por ejemplo, una bomba peristáltica, por medio de un conducto, que puede activarse por medio de la entrada del usuario utilizando la interfaz de usuario.

Un sensor 29 puede enviar una señal al dispositivo de procesamiento presente en el componente reutilizable para activar las etapas necesarias para lavar y desagregar el tejido. Por ejemplo, el dispositivo de procesamiento puede introducir un volumen preestablecido del agente de lavado basándose en el volumen del tejido recogido usando válvulas y bombas automatizadas. Este ciclo puede repetirse en la cámara de recogida hasta el que sensor óptico determine que el líquido efluente sea suficientemente claro y carezca de material no deseado. Por ejemplo, un sensor 29 óptico junto con el conducto que conduce hacia fuera de la cámara 12b o 12d de recogida puede detectar que se han retirado los materiales no deseados y puede enviar una señal al dispositivo de tratamiento para cerrar las válvulas requeridas e iniciar la siguiente etapa.

A continuación, el dispositivo de procesamiento puede introducir una cantidad preprogramada del agente de desagregación basándose en el volumen del tejido recogido. El dispositivo de procesamiento también puede activar la agitación del tejido en la cámara de recogida durante un periodo de tiempo predeterminado basándose en el volumen inicial del tejido recogido o basándose en la entrada del usuario en la realización mostrada en la figura 4, una vez que se añade el agente de desagregación, por ejemplo, colagenasa, a la cámara 20 de recogida mediante la fuente 24 de colagenasa, el motor en la cámara 20 de recogida se activa mediante el dispositivo de procesamiento. El motor activa el eje 25 rotatorio que está compuesto por un agitador magnético y un dispositivo de tipo paleta en el que una o más paletas 25a están fijadas de manera rígida a la caja 27 de filtro de un filtro prefijado a la cámara 28 de recogida. Las paletas agitan el en presencia del agente de desagregación de manera que las células regenerativas se separan del tejido.

Se deja que la disolución en la cámara 20 de recogida sedimente durante un periodo de tiempo preestablecido. Se deja que la parte flotante de la disolución se eleve hasta la parte superior de la disolución. Una vez transcurrido el periodo de tiempo preestablecido, se activan las válvulas y bombas necesarias con el dispositivo de procesamiento para extraer la parte no flotante a la cámara 40 de desechos. La transferencia hacia la cámara 40 de desechos continúa hasta que un sensor 29 junto con el conducto que conduce hacia afuera de la cámara 12b o 12d de recogida pueda detectar que la fracción flotante de la disolución esté a punto de transferirse a la cámara 30 de desechos. Por ejemplo, un sensor 29 junto con el conducto que conduce hacia afuera de la cámara 12b o 12d de recogida puede detectar que se han extraído los materiales no deseados y puede enviar una señal al dispositivo de procesamiento para cerrar las válvulas requeridas.

En este momento, la fracción no flotante de la disolución, es decir, la composición de células regenerativas, se mueve hacia la cámara 30 de procesamiento. Esto se lleva a cabo mediante el uso de las válvulas y bombas peristálticas necesarias. En determinadas realizaciones, antes de la transferencia de la composición de células regenerativas a la cámara 30 de procesamiento, puede añadirse un volumen adicional de solución salina a la fracción flotante de la disolución que permanece en la cámara 20 de recogida. Puede repetirse otro ciclo de lavado. Tras este ciclo, se deja que la disolución sedimente y se transporta la fracción no flotante (que contiene las células regenerativas) a la cámara 30 de procesamiento, y se drena la fracción flotante a la cámara 40 de desechos. Se usa el ciclo de lavado adicional para optimizar la transferencia de todas células regenerativas separadas a la cámara 30 de procesamiento.

Una vez que la composición de células regenerativas se transporta hacia la cámara 30

de procesamiento por medio de conductos 12, la composición puede someterse a una o más etapas de lavado adicionales antes del inicio de la fase de concentración. Esto garantiza la eliminación de desechos y contaminantes residuales de la cámara 20 de recogida. De manera similar, posterior a la etapa de concentración, la composición de células regenerativas puede someterse a una o más etapas de lavado adicionales para extraer contaminantes residuales. Pueden extraerse los materiales no deseados de la cámara 30 de procesamiento hacia la cámara 40 de desechos de la misma manera, es decir, controlar las válvulas y bombas por medio de señales desde el dispositivo de tratamiento, tal como se describió anteriormente.

Las diversas realizaciones de la cámara 30 de procesamiento mostradas en la figura 4 se describen en detalle a continuación. La cámara 30 de procesamiento mostrada en la figura 4 está en forma de una cámara de centrífuga. En las figuras 7 y 8 se muestra una ilustración detallada de la cámara de procesamiento de la figura 4. Generalmente, una cámara 30 de procesamiento de este tipo se compone de una red 30.1 de sellado que rota que comprende una carcasa 30.2 externa, uno o más sellos 30.3, uno o más cojinetes 30.4 y un punto 30.6 de unión para conectar la cámara de procesamiento al dispositivo de centrífuga presente en el componente reutilizable del sistema; una o más trayectorias 30.5 de fluido en forma de conductos que se extienden desde el sello rotatorio y que terminan en una cámara de centrífuga en cada extremo que está en forma de una cámara 50 de salida alojada en un marco 53 estando el marco compuesto por uno o más orificios 52 y una o más asas para reposicionar manualmente la cámara 50 de salida.

Se incluye la red 30.1 de sellado que rota para garantizar que las trayectorias del fluido de la cámara de procesamiento pueden mantenerse en una condición estéril. Además, puede accederse de manera estéril a las trayectorias del fluido de la cámara de procesamiento (por ejemplo, para añadir agentes o disolución de lavado) en cualquier momento, incluso mientras está girando la cámara de centrífuga de la cámara de procesamiento.

La red 30.1 de sellado que rota mostrada en las figuras 7 y 8 incluye un eje rotatorio compuesto por dos o más cojinetes 30.4, tres o más sellos 30.3 de labios, y una carcasa 30.2 externa. En esta realización, los cojinetes 30.4 comprenden además un eje externo e interno (no mostrado) denominado en el presente documento anillos de rodadura. Estos anillos de rodadura pueden separarse mediante esferas de fricción de precisión. Preferiblemente, los anillos de rodadura y las esferas que comprenden los cojinetes se fabrican con material adecuado para entrar en contacto con fluidos corporales, o se revisten con material adecuado para entrar en contacto con fluidos corporales. En una realización preferida, los anillos de rodadura y las esferas se fabrican usando, por ejemplo, nitruro de silicona o circonia. Además, en esta realización, los tres sellos de labios se componen de un canal en forma de “U” circular

(no mostrado) así como un resorte circular (no mostrado). Preferiblemente, el canal en forma de “U” circular se fabrica usando material flexible de tal manera que se forma un empalme a prueba de fugas con el eje rotatorio de la red 30.1 de sellado que rota. Adicionalmente, los sellos de labios se orientan preferiblemente de manera que la presión de la composición de células regenerativas que fluye a través de la cámara de procesamiento provoca que el conjunto de sellos estreche su unión con el eje rotatorio por medio de la tensión aumentada. Pueden fijarse los sellos en su posición por medio de una o más abrazaderas circulares (no mostradas) que pueden expandirse y/o plegarse según sea necesario con el fin de enganchar una muesca en la carcasa 30.2 externa de la red 30.1 de sellado que rota. El calor generado por o cerca de la red 30.1 de sellado que rota debe controlarse para impedir la lisis de las células en la disolución que se mueve a través del paso. Esto puede lograrse, por ejemplo, seleccionando un material duro para construir el eje rotatorio, puliendo la zona del eje rotatorio que entra en contacto con los sellos y minimizar el contacto entre el árbol rotatorio y el sello.

En otra realización la red 30.1 de sellado que rota se compone de un solo sello 30.3 de caucho y una junta de aire (no mostrada). Este sello y junta proporcionan una trayectoria tortuosa para cualquier materia biológica que pudiera comprometer la esterilidad del sistema. En otra realización la red 30.1 de sellado que rota se compone de sellos 30.3 cargados de resortes múltiples que aíslan las trayectorias individuales del fluido. Los sellos 30.3 se fabrican de un material que puede esterilizarse así como sellar el eje rotatorio sin lubricante. En otra realización la red 30.1 de sellado que rota se compone de un par de discos de cerámica (no mostrados) que crean las diferentes trayectorias del fluido y pueden resistir la rotación del sistema y no provocan lisis celular. En otra realización la trayectoria del fluido es flexible y puede enrollarse y desenrollarse con respecto a la cámara de procesamiento. Esto se logra haciendo rotar la trayectoria del fluido flexible una revolución por cada dos revoluciones de la cámara 30 de procesamiento. Esto elimina totalmente la necesidad de un sello rotatorio.

Se bombea la composición de células regenerativas desde la cámara 20 de recogida a lo largo de una trayectoria del fluido a través del eje de rotación de la red 30.1 de sellado que rota y entonces se divide en un mínimo de dos trayectorias 30.5 de fluido cada una de las cuales irradia hacia el exterior desde el eje central de la cámara 30 de procesamiento y termina cerca de los extremos externos de la cámara 30 de procesamiento, es decir, dentro de las cámaras de centrífuga que alojan las cámaras 50 de salida (figuras 7 y 8). Por consiguiente, en una realización preferida, la cámara 30 de procesamiento se compone de dos o más cámaras 50 de salida tal como se muestra en las figuras 7 y 8. Estas cámaras 50 de salida se sitúan de manera que están en una orientación durante el tratamiento 30.7 y en otra orientación para la recuperación de células 30.8 regenerativas concentradas. Por ejemplo, los cambios de salida

se inclinan en un ángulo durante el procesamiento y en otro ángulo durante la recuperación celular. El ángulo de recuperación celular es más vertical que el ángulo de procesamiento. Las dos posiciones de la cámara 50 de salida pueden manipularse manualmente a través de un asa 53 que sobresale fuera de la cámara 30 de procesamiento. Las células regenerativas pueden recuperarse manualmente desde las cámaras 50 de salida cuando están en la orientación 30.8 de recuperación usando una jeringuilla. En otra realización, la trayectoria 30.5 de fluido se construye de manera que se divide fuera de la cámara de procesamiento y después se conecta a los extremos externos de la cámara 30 de procesamiento, es decir, dentro de las cámaras de centrífugas que alojan las cámaras 50 de salida (no mostradas). En esta realización, pueden transportarse grandes volúmenes de composición de células regenerativas y/o aditivos, disoluciones etc. hacia la cámara de centrífuga y/o las cámaras de salida directamente.

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

Los sensores detectan la presencia de la composición de células regenerativas en las cámaras de centrífuga y activan el dispositivo de centrífuga a través de la comunicación con el dispositivo de procesamiento del sistema. Entonces la composición de células regenerativas se somete a una carga preprogramada durante un tiempo preprogramado basándose en la cantidad de tejido originalmente recogido y/o entrada del usuario. En determinadas realizaciones, puede repetirse esta etapa automáticamente o bien a través de la entrada del usuario. Por ejemplo, se somete la composición a una carga de aproximadamente 400 veces la fuerza de la gravedad durante un periodo de aproximadamente 5 minutos. La cámara 50 de salida se construye de tal manera que los extremos externos de la cámara forman un depósito pequeño para las partículas densas y las células. La cámara 50 de salida retiene las partículas densas en lo que se denomina un "sedimento celular", mientras que permite que el sobrenadante menos denso se extraiga a través de una trayectoria de fluido, por ejemplo, una trayectoria de fluido que está a lo largo del eje de rotación de la red 30.1 de sellado que rota y viaja desde el punto bajo en el centro de la cámara 30 de procesamiento a través de la red 30.1 de sellado que rota hasta el recipiente 40 de desechos. Las válvulas 14 y bombas 34 envían una señal al dispositivo de procesamiento para activar etapas para extraer el sobrenadante

hacia el recipiente 40 de desechos sin alterar el sedimento celular presente en la cámara 50 de salida.

El sedimento celular que se obtiene usando el sistema mostrado en la figura 4 comprende las células regenerativas concentradas de la invención. En algunas realizaciones, tras extraerse el sobrenadante y dirigirse hacia la cámara 40 de desechos, puede usarse una trayectoria 30.5 de fluido para resuspender el sedimento celular que se forma tras la centrifugación con disoluciones y/o otros aditivos adicionales. De esta manera, la resuspensión del sedimento celular permite el lavado adicional de las células regenerativas para extraer proteínas y compuestos químicos no deseados así como para aumentar el flujo de oxígeno hacia las células. Puede someterse la suspensión resultante a otra carga de aproximadamente 400 veces la fuerza de la gravedad durante otro periodo de aproximadamente 5 minutos. Tras formarse un segundo sedimento celular, y extraerse el sobrenadante resultante hacia la cámara 40 de desechos, puede realizarse un lavado final de la manera descrita anteriormente con solución salina o alguna otra disolución tampón apropiada. Puede realizarse este lavado repetido múltiples veces para mejorar la pureza de la disolución de células regenerativas. En determinadas realizaciones, puede añadirse la solución salina en cualquier etapa según se considere necesario para mejorar el procesamiento. Las concentraciones de células regenerativas obtenidas usando el sistema mostrado en la figura 4 pueden variar dependiendo de la cantidad de tejido recogido, edad del paciente, perfil del paciente etc. En la tabla 1 se proporcionan rendimientos a modo de ejemplo.

Entonces puede recuperarse el sedimento final presente en la cámara 50 de salida de una manera aséptica usando una jeringuilla apropiada tras haber situado la cámara 50 de salida en la orientación apropiada para la recuperación celular. En otras realizaciones, puede moverse automáticamente el sedimento final hacia un recipiente en la cámara 50 de salida que puede extraerse y almacenarse o usarse según sea necesario. Este recipiente puede ser de cualquier forma o tamaño apropiados. Por ejemplo, el recipiente puede ser una jeringuilla. En determinadas realizaciones, el propio recipiente 50 de salida puede termosellarse (automática o bien manualmente) y puede aislarse a partir de los otros componentes de la cámara de procesamiento para la recuperación posterior y el uso de las células regenerativas tal como se describe en el presente documento. También pueden someterse las células a procesamiento adicional tal como se describe en el presente documento antes de la recuperación desde la cámara de salida o bien tras la transferencia a un segundo sistema o dispositivo. El componente reutilizable mostrado en la figura 14 se construye de manera que puede conectarse a uno o más sistemas o dispositivos adicionales para el procesamiento adicional según sea necesario.

Uso de una composición que comprende células regenerativas derivadas de tejido adiposo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente con necrosis tubular aguda (NTA).

5 Tal como se describe en el presente documento, las células regenerativas derivadas de tejido adiposo obtenidas usando los sistemas descritos en el presente documento se usan en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente con necrosis tubular aguda (NTA). Esto se basa en las propiedades de las células regenerativas derivadas de tejido adiposo tal como se describe en los ejemplos. Por ejemplo, las células regenerativas tienen la
10 capacidad de sintetizar y secretar factores de crecimiento que estimulan la formación de nuevos vasos sanguíneos, la capacidad de sintetizar y secretar factores de crecimiento que estimulan la supervivencia y proliferación celular y la capacidad de proliferar y diferenciarse en células que participan directamente en la formación de nuevos vasos sanguíneos. Por consiguiente, las células regenerativas se obtienen del tejido adiposo de un donante usando los
15 sistemas descritos en el presente documento y se usan en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente con necrosis tubular aguda (NTA) para obtener un beneficio terapéutico para tejido renal dañado o degenerado a través de uno o más de los mecanismos demostrados en el presente documento. Pueden obtenerse las células regenerativas del tejido adiposo de la persona en la que van a implantarse, reduciendo de ese modo posibles
20 complicaciones potenciales asociadas con respuestas antigénicas y/o inmunogénicas al trasplante. Normalmente, se evalúan los pacientes para evaluar el daño o enfermedad renal mediante uno o más de los siguientes procedimientos realizados por un médico u otro personal médico: historia clínica, examen físico del paciente, y datos objetivos incluyendo, pero sin limitarse a creatinina sérica, nitrógeno ureico sanguíneo sérico, perfiles químicos séricos,
25 análisis de orina, tasa de filtración glomerular y ultrasonido.

El procedimiento de recogida se realiza con frecuencia antes de que el paciente reciba cualquier producto diseñado para reducir la coagulación sanguínea en conexión con el tratamiento del trastorno renal. Sin embargo, algunas veces el paciente puede haber recibido aspirina antes del procedimiento de recogida. La recogida de tejido adiposo se obtiene con
30 frecuencia antes de cualquier intento de procedimiento. Sin embargo, tal como entienden los expertos en la técnica, se espera que varíe el momento de la recogida y dependerá de varios factores incluyendo, entre otras cosas, la estabilidad del paciente, el perfil de coagulación del paciente, disponibilidad del personal, y los criterios de calidad de atención. Por último, el momento de la recogida se determinará por el médico responsable de proporcionar atención al
35 paciente afectado.

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

Las células regenerativas derivadas de tejido adiposo pueden extraerse por adelantado y almacenarse de una manera crioconservada o pueden extraerse en o alrededor del momento de necesidad definida. Tal como se da a conocer en el presente documento, pueden administrarse las células al paciente, o aplicarse directamente al tejido dañado, o en proximidad del tejido dañado, sin procesamiento adicional o procedimientos adicionales siguientes para purificar, modificar, estimular, o cambiar de otro modo adicionalmente las células. Por ejemplo, pueden usarse las células obtenidas de un paciente sin cultivar las células. La recogida del tejido adiposo puede realizarse a pie de cama de un paciente. Puede usarse el control hemodinámico para controlar el estado clínico del paciente.

Según la invención, pueden usarse las células regenerativas en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente poco después de obtener el tejido adiposo del paciente. Por ejemplo, el medicamento puede ser para la administración a dicho paciente inmediatamente tras la fabricación del medicamento. El momento preferido de administración debe tener lugar en el orden de horas a días tras la insuficiencia renal. Alternativamente, el momento de administración puede ser relativamente más prolongado si las células que van a usarse se someten a modificación, purificación, estimulación, u otra manipulación adicional, tal como se comenta en el presente documento. Además, las células regenerativas pueden administrarse múltiples veces. Por ejemplo, puede administrarse el medicamento de manera continua durante un periodo de tiempo prolongado (por ejemplo, horas), o puede administrarse en múltiples inyecciones en bolos extendidas a lo largo de un periodo de tiempo. Por ejemplo, puede administrarse una administración inicial de células en el plazo de aproximadamente 12 horas tras la insuficiencia renal, tal como a las 6 horas, y pueden administrarse una o más dosis de células a intervalos de 12 horas.

El número de células que va a administrarse a un paciente puede relacionarse con, por ejemplo, el rendimiento celular tras el tratamiento del tejido adiposo. Una parte del número total de células puede retenerse para su uso posterior o crioconservarse. Además, la dosis administrada dependerá de la vía de administración de las células al paciente. En una realización de la invención, se espera que el número de células regenerativas comprendidas en el medicamento sea de aproximadamente $5,5 \times 10^4$ células. Sin embargo, puede ajustarse este

número en órdenes de magnitud para lograr el efecto terapéutico deseado.

El medicamento también puede aplicarse con aditivos para potenciar, controlar, o dirigir de otro modo el efecto terapéutico pretendido. Por ejemplo y tal como se describe en el presente documento, pueden purificarse adicionalmente las células mediante el uso de selección celular positiva y/o negativa mediada por anticuerpos para enriquecer la población celular para aumentar la eficacia, reducir la morbilidad, o para facilitar la facilidad del procedimiento. De la misma manera, pueden administrarse células tras la manipulación genética de tal manera que expresan productos génicos que se cree que o están destinados a promover la(s) respuestas(s) terapéutica(s) proporcionada(s) por las células. Los ejemplos de manipulaciones incluyen manipulaciones para controlar (aumentar o disminuir) la expresión de factores que promueven la angiogénesis o vasculogénesis (por ejemplo VEGF). Las células también pueden someterse a cultivo celular en un material de estructura antes de implantarse tal como se describe en el presente documento.

Puede preferirse un medicamento para administración directa en el sitio de beneficio pretendido. Las vías de administración conocidas por un experto en la técnica, incluyen, pero no se limitan a, intravenosa, intraarterial, intraparenquimal y pueden o no pueden incluir un mecanismo de suministro a base de catéter. El medicamento puede ser para la administración en un único bolo, a través de infusión lenta, o a través de una serie escalonada de aplicaciones separadas por varias horas o, las células proporcionadas se almacenan apropiadamente, varios días o semanas. Tal como se expuso anteriormente, el medicamento también puede ser para la administración mediante el uso de cateterismo de manera que las células se administran directamente dentro del parénquima renal a través de la arteria renal. Tal como con el acceso venoso periférico, el medicamento puede ser para inyección a través de los catéteres en un único bolo o en múltiples alícuotas más pequeñas. El medicamento también puede ser para la administración directamente al parénquima renal en el momento de la exploración abierta o por medio de administración con catéter percutáneo.

Por ejemplo, la vía de administración puede incluir administración intravenosa a través de un catéter intravenoso periférico convencional o un catéter venoso central. Puede controlarse el flujo de células mediante inflamamiento/desinflamamiento en serie de balones distal y proximal ubicados dentro de la vasculatura del paciente, creando de ese modo zonas sin flujo temporales que promueven el injerto celular o la acción terapéutica celular. Además, el medicamento podría administrarse a través de las siguientes vías, solo, o en combinación con uno o más de los enfoques identificados anteriormente: subcutánea, intramuscular, sublingual, o mediante una máquina de diálisis. En un ejemplo, el medicamento es para la administración al paciente como una infusión cronometrada o inyección en bolo dentro del vaso.

La dosis celular comprendida en el medicamento para la administración al paciente dependerá de la cantidad de tejido adiposo obtenido y el índice de masa corporal del donante (como medida de la cantidad de tejido adiposo disponible). También se determinará la cantidad de tejido obtenido mediante el grado de la enfermedad o degeneración renal. El medicamento para tratamientos múltiples usando múltiples recogidas de tejido o usando una única recogida con almacenamiento apropiado de células entre aplicaciones está dentro del alcance de esta invención.

Pueden almacenarse partes del lipoaspirado procesado. Para almacenamiento a corto plazo (menos de 6 horas) pueden almacenarse las células a o por debajo de la temperatura ambiente en un recipiente sellado con o sin complementación con una disolución nutritiva. Preferiblemente, el almacenamiento a medio plazo (menos de 48 horas) se realiza a 2-8°C en una disolución tamponada, isoosmótica, (por ejemplo Plasmalyte®) en un recipiente compuesto de o revestido con un material que impide la adhesión celular. Preferiblemente, el almacenamiento a largo plazo se realiza mediante crioconservación apropiada y almacenamiento de células en condiciones que promueven la retención de la función celular, tal como se da a conocer en la solicitud PCT número PCT/US02/29207, transferida y de titularidad conjunta, presentada el 13 de septiembre de 2002 y solicitud provisional estadounidense número 60/322,070, presentada el 14 de septiembre de 2001.

Según un aspecto de la invención, las células derivadas de tejido adiposo que se administran a un paciente pueden actuar como vehículos de administración de factores de crecimiento. Por ejemplo, modificando mediante ingeniería las células para expresar uno o más factores de crecimiento adecuados para aliviar síntomas asociados con un trastorno o enfermedad renal, las células pueden administrarse a un paciente, y modificarse mediante ingeniería genética para liberar uno o más de los factores de crecimiento. Puede proporcionarse la liberación de una manera controlada durante periodos de tiempo prolongados. Por ejemplo, puede controlarse la liberación de modo que se libera(n) el/los factor(es) de crecimiento de una manera pulsada o periódica de manera que hay elevaciones locales en el factor de crecimiento, y/o recesiones locales en la cantidad de factor de crecimiento en proximidad a una zona lesionada de tejido.

El medicamento no sólo ayuda a reestablecer la función a tejidos dañados o no sanos de otro modo, sino que también facilita la remodelación de los tejidos dañados.

El medicamento puede ser para la administración al paciente en las siguientes ubicaciones: clínica, consulta, departamento de urgencias, hospital, unidad de cuidados intensivos, quirófano, áreas de cateterismo, y áreas de radiología.

Los efectos del medicamento se demostrarían mediante, pero sin limitarse a, una de las

siguientes medidas clínicas: disminución aguda de la creatinina sérica y el nitrógeno ureico sanguíneo, y evidencias de perfusión aumentada al parénquima renal tal como se evidencia mediante la producción de orina aumentada, y GFR aumentado. Los efectos de la terapia celular pueden ser evidentes durante el transcurso de días a semanas tras el procedimiento. Sin embargo, pueden observarse efectos beneficiosos tan pronto como en varias horas tras el procedimiento, y puede persistir durante varios años.

Normalmente, se controlan los pacientes antes de y durante el suministro de las células. Los procedimientos de monitorización incluyen, y no se limitan a: estudios de coagulación, saturación de oxígeno y monitorización hemodinámica. Tras la administración del medicamento, los pacientes pueden requerir un periodo de monitorización de aproximadamente 24 horas para acontecimientos adversos.

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

EJEMPLOS

Las ADC o células regenerativas usadas en todos los ejemplos expuestos a continuación pueden obtenerse mediante el/los procedimiento(s) descrito(s) en la presente descripción y/o el/los procedimiento(s) descrito(s) en la solicitud estadounidense n.º de serie 10/316.127, titulada SYSTEMS AND METHODS FOR TREATING PATIENTS WITH PROCESSED LIPOASPIRATE CELLS, presentada el 9 de diciembre de 2002, que reivindica prioridad para la solicitud provisional estadounidense n.º de serie 60/338.856, presentada el 7 de diciembre de 2001, así como los procedimientos descritos en la solicitud de patente estadounidense n.º _____ titulada, SYSTEMS AND METHODS FOR SEPARATING AND CONCENTRATING REGENERATIVE CELLS FROM TISSUE, presentada el 25 de junio de 2004, que reivindica prioridad para la solicitud estadounidense n.º de serie 10/316.127, titulada SYSTEMS AND METHODS FOR TREATING PATIENTS WITH PROCESSED LIPOASPIRATE CELLS, presentada el 9 de diciembre de 2002, las cuales están transferidas legalmente.

EJEMPLO 1: Expresión del factor de crecimiento angiogénico, VEGF, mediante células regenerativas

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es uno de los reguladores clave de la angiogénesis (Nagy *et al.*, 2003; Folkman, 1995). El factor de crecimiento placentario, otro miembro de la familia VEGF, desempeña un papel similar ambos, en la angiogénesis y en la arteriogénesis. Específicamente, el trasplante de células (PIGF +/+) de tipo natural dentro de

un ratón deficiente en PIGF reestablece la capacidad para inducir la recuperación rápida de isquemia de extremidades posteriores (Scholz *et al.*, 2003).

Dada la importancia de la angiogénesis y arteriogénesis en el proceso de revascularización, se examinó la expresión de PIGF y VEGF por las células regenerativas de la presente invención usando un ensayo de ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN) usando células regenerativas derivadas de tejido adiposo de tres donantes. Un donante tenía una historia de hiperglicemia y diabetes tipo 2 (una afección altamente asociada con enfermedad microvascular y macrovascular). Se sembraron en placas células regenerativas de cada donante a 1.000 células/cm² en medio DMEM/F-12 complementado con FCS al 10% y HS al 5% y se hicieron crecer hasta la confluencia. Se tomaron muestras de sobrenadante y se sometieron a ensayo para detectar la expresión de la proteína VEGF y PIGF. Tal como se muestra en las figuras 16A y 16B, los resultados demuestran expresión robusta de ambos, VEGF (figura 16A) y PIGF (figura 16B) por las células regenerativas derivadas de tejido adiposo de la invención.

En un estudio separado, se midió la cantidad relativa de citocinas relacionadas con la angiogénesis secretadas por células regenerativas cultivadas de ratones adultos normales. Se cultivaron las células regenerativas en alfa-MEM con FBS al 10% hasta cinco días más allá de la confluencia celular, momento en el que se recogió el medio de cultivo celular y se evaluó mediante el análisis de matriz de anticuerpos (matriz II de anticuerpos frente a citocinas de ratón RayBio® (RayBiotech, Inc.). Se detectaron los siguientes factores de crecimiento relacionados con la angiogénesis: factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), bFGF, IGF-II, eotaxina, G-CSF, GM-CSF, IL-12 p40/p70, IL-12 p70, IL-13, IL-6, IL-9, leptina, MCP-1, M-CSF, MIG, PF-4, TIMP-1, TIMP-2, TNF- α , y trombopoetina. Los siguientes factores de crecimiento o citocinas relacionados con la angiogénesis se elevaron al menos dos veces en comparación con el medio de control en blanco con FBS al 10%: factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), eotaxina, G-CSF, IL-6, MCP-1 y PF-4.

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

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

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

Se aislaron ADC mediante digestión enzimática de tejido adiposo subcutáneo humano. Se incubaron las ADC (100 ul) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contiene suero bovino fetal (FBS) al 0,2%, y se incubaron durante 20 a 30 minutos a 4°C con anticuerpos marcados con fluorescencia dirigidos hacia los marcadores endoteliales humanos CD-31 (marcador celular endotelial diferenciado) y CD-34 (marcador de EPC), así como ABCG2 humano (transportador de casete de unión a ATP), que se expresa selectivamente en células multipotentes. Tras el lavado, se analizaron las células en un clasificador FACSaria (Beckton Dickenson - Immunocytometry). Entonces se realizaron la adquisición y los análisis de datos mediante el software FACSDiva (BD-Immunocytometry, CA). Los resultados (no mostrados) mostraron que las células regenerativas derivadas de tejido adiposo de un adulto sano expresaron el marcador de EPC CD-34 y ABCG2, pero no el marcador celular endotelial CD-31. Se detectaron las células que expresan el marcador de EPC, CD-34 y ABCG2 a frecuencia similar en células regenerativas derivadas de un donante con historia de diabetes.

Para determinar la frecuencia de las EPC en células regenerativas derivadas de tejido adiposo humano tras su cultivo en medio de diferenciación celular endotelial, se sembraron en placas células regenerativas sobre placas recubiertas con fibronectina y se cultivaron en medio celular endotelial durante tres días para eliminar células endoteliales maduras. Se extrajeron las células no adheridas y se volvieron a sembrar en placa. Tras 14 días, se identificaron las colonias mediante tinción con aglutinina-1 del *Ulex europaeus* conjugada con FITC (Vector Labs, Burlingame, CA) y LDL acetilada marcada con Dil (Molecular Probes, Eugene, OR). Tal como se muestra en la figura 17, los resultados indican una frecuencia de EPC de aproximadamente 500 EPC/106 ADC.

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

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

Un ensayo reconocido en la técnica para detectar la angiogénesis es uno en el que las células endoteliales cultivadas en una capa alimentadora de fibroblastos desarrollan una red compleja de tubos CD31-positivos reminiscentes de una red capilar naciente (Donovan *et al.*, 2001). Puesto que las células degenerativas derivadas de tejido adiposo contienen células endoteliales, las EPC y otro precursor celular del estroma, se sometió a prueba la capacidad de estas células regenerativas para formar estructuras similares a capilares en ausencia de una capa alimentadora. Las células regenerativas obtenidas de almohadillas de grasa inguinal de ratones normales desarrollaron redes capilares dos semanas tras el cultivo (figura 18A). Particularmente, las células regenerativas de ratones hiperglicémicos con diabetes tipo 1 inducida por estreptozotocina (STZ) ocho semanas tras la administración de STZ formaron redes capilares equivalentes como las formadas por las células de ratones normales (figura 18B).

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

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

Los datos anteriores demuestran que las células regenerativas derivadas de tejido adiposo de pacientes normales y diabéticos, así como pacientes jóvenes y ancianos pueden formar estructuras vasculares que concuerdan con la formación de redes capilares nacientes.

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

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

Se determinaron los valores de flujo sanguíneo preoperatorios para ambas extremidades posteriores tal como se describe a continuación. Se ligó la vasculatura de ratones anestesiados con una ligadura de seda 4-0 en los siguientes sitios: 1) arteria ilíaca de manera proximal a su bifurcación, 2) justo de manera distal al origen de la arteria femoral profunda, 3) justo de manera proximal a la ramificación de la arteria femoral superficial. Tras la ligación, se extrajo la vasculatura en bloque. Antes de cerrar la herida, se ligaron también las ramificaciones colaterales que podían observarse macroscópicamente de las arterias femorales ligadas. Veinticuatro horas después, se inyectaron a ratones 129S 5×10^6 células regenerativas derivadas de tejido adiposo de ratón singénico y se inyectaron a ratones NOD SCID células regenerativas derivadas de tejido adiposo humano a través de la vena de la cola. Se obtuvieron imágenes del flujo inmediatamente tras la cirugía y a intervalos tras el tratamiento usando un dispositivo de obtención de imágenes de flujo láser doppler (Moor Instruments Inc., Wilmington, DE). Las mediciones, tomadas tres veces a la semana durante 24 días, se normalizaron al valor preoperatorio para esa extremidad y se presentaron en relación con la extremidad control (no operada).

El modelo de isquemia de extremidades posteriores es extremadamente sensible a la cepa de ratón usada. Los ratones NOD SCID son animales inmunodeficientes, que carecen de la capacidad para iniciar una respuesta inflamatoria aguda. Para estos ratones, este enfoque quirúrgico genera isquemia grave de manera que dos tercios de los animales no tratados perdieron sus estructuras de extremidades posteriores por debajo del sitio de escisión femoral. Ningún animal tratado con células perdió ninguna de las estructuras por encima del dedo de la pata. Aún, para ratones 129S inmunocompetentes, ninguno de los animales no tratados perdió ninguna estructura por encima de las falanges y presentaron una capacidad endógena para regenerar parcialmente la perfusión. Esto podría deberse a la angiogénesis intrínseca asociada con una respuesta inflamatoria aguda. Esto puede explicar por qué la perfusión era menos extrema cuando se compararon los animales tratados frente a los animales control de diferentes cepas.

Sin embargo, los resultados mostraron que los ratones tratados con células regenerativas derivadas de tejido adiposo mostraban perfusión significativamente mejorada en comparación con ratones no tratados de ambas cepas. Para el día 12, se restauró el flujo sanguíneo al $50 \pm 11\%$ en ratones NOD-SCID tratados con células regenerativas humanas, en comparación con el $10 \pm 10\%$ en ratones no tratados ($p < 0,05$). De manera similar, los ratones 129S inmunocompetentes presentaron el $80 \pm 12\%$ de restauración de flujo en el día 14, en comparación con el $56 \pm 4\%$ en ratones no tratados. Además, la disección macroscópica de ratones reveló la aparición de vasos colaterales en las extremidades posteriores de ratones

tratados con células regenerativas, pero no en las de ratones no tratados o en las extremidades sanas de cualquier ratón.

EJEMPLO 5: El aumento de la dosis de ADC está asociado con angiogénesis y supervivencia del injerto mejoradas

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

Se realizó un estudio en ratas Fisher en el que se trasplantaron fragmentos de tejido adiposo en el espacio subcutáneo sobre los músculos de la cara externa del muslo. Se trasplantaron en la pata derecha 0,2 g de fragmentos de tejido adiposo solo, en la pata izquierda 0,2 g de fragmentos de tejido adiposo complementado por la adición de células madre derivadas de tejido adiposo a tres dosis diferentes ($1,7 \times 10^5$ - $1,3 \times 10^6$ células/injerto; tres animales por dosis); de este modo, la pata contralateral actuó como control. Entonces, se mantuvieron los animales durante un mes tras lo cual se sacrificaron los animales y se recuperaron los injertos, se pesaron, se fijaron en formalina y se incrustaron en parafina para su análisis histológico.

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

Por consiguiente, los ejemplos 1-5 demuestran que las células regenerativas derivadas de tejido adiposo de la invención secretan factores de crecimiento angiogénicos y arteriogénicos; forman redes capilares nacientes *in vitro*; potencian la supervivencia de injertos de grasa; y potencian la reperusión isquémica. Por tanto, las células regenerativas usadas en la invención pueden promover la angiogénesis y arteriogénesis.

EJEMPLO 6: Tratamiento de la insuficiencia renal aguda

La insuficiencia renal aguda da como resultado lesión isquémica en el parénquima renal. El daño tisular puede minimizarse mediante la reperusión del tejido dañado y mediante

la regeneración del tejido renal (Sujata K, Karihaloo A, Clark PR, Kashgarian M, *et al.* Bone Marrow Stem Cells Contribute to Repair of the Ischemically Injured Renal Tubule. JCI. 112:42-49, 2003; Poulson R, *et al.* Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration J Pathol. 195:229-235. 2001).

5 La terapia con células regenerativas derivadas de tejido adiposo, tal como se da a conocer en el presente documento, busca proporcionar una fuente superior de células regenerativas en relación con terapias celulares derivadas de tejido no adiposo, debido a, por ejemplo, el uso de un mayor número de células no cultivadas y células más puras con morbilidad atenuada que las asociadas con terapias derivadas de tejido no adiposo, tales como
10 la recogida en médula ósea.

Se sospecha que un paciente padece necrosis tubular aguda y demuestra síntomas y signos de inicio o establecidos compatibles con insuficiencia renal aguda. Normalmente, el paciente ya está admitido en el hospital. Al paciente se le prescribe terapia con células regenerativas. Se examina el hábito del paciente para determinar un sitio adecuado para la
15 recogida de tejido adiposo. Los sitios de recogida se caracterizan por al menos uno de los siguientes: espacio(s) potencial(es) limitados por estructuras anatómicas normales, sin estructuras vasculares o viscerales importantes en riesgo por daño, y facilidad de acceso. Se prefieren sitios de recogida vírgenes, pero un sitio de recogida previo no impide la recogida de más tejido adiposo. Los sitios de recogida potenciales incluyen, pero no se limitan a, los
20 siguientes: regiones del muslo lateral y medial de extremidades inferiores bilaterales, y el paño de la pared abdominal anterior.

El paciente recibe una inyección subcutánea de una disolución de fluido tumescente que contiene una combinación de lidocaína, solución salina y epinefrina en por ejemplo diferentes regímenes de dosificación normalizados. Usando un bisturí (por ejemplo, un bisturí
25 de hoja 11), se hace una herida de punción pequeña en la región del muslo medial del paciente de su pierna derecha y/o izquierda con el fin de atravesar la dermis. Se gira la cuchilla 360 grados para completar la herida. Se inserta una cánula de punta roma (por ejemplo, cánula de calibre 14) en el plano de tejido adiposo subcutáneo debajo de la incisión. Se conecta la cánula a un dispositivo de succión asistido. La cánula se mueve en todo el plano del tejido adiposo
30 para alterar la arquitectura del tejido conjuntivo. Se obtienen aproximadamente 500 cc de aspirado. Tras la extracción del tejido adiposo, se logra la homeostasis con técnicas quirúrgicas convencionales y se cierra la herida.

Se procesa el lipoaspirado según los procedimientos dados a conocer anteriormente en el presente documento para obtener una unidad de células madre derivadas de tejido adiposo
35 concentradas. Aproximadamente seis horas tras la terapia con células derivadas de tejido

adiposo prescrita, se administran al paciente las células madre. Basándose en el procesamiento del lipoaspirado, se estima que el paciente recibe una dosis inicial de células madre en un intervalo de entre aproximadamente $5,5 \times 10^4$ células madre y $5,5 \times 10^5$ células madre. El paciente recibe dos dosificaciones complementarias a intervalos de 12 horas tras la administración inicial. Se administran las células madre al paciente a través de un catéter venoso central. Para promover el injerto celular en la región diana, puede controlarse el flujo de células madre mediante un balón ubicado aguas abajo del sitio diana (a través de administración endovascular) y mediante un balón aguas arriba del sitio diana para crear regiones de flujo sanguíneo mínimo o bajo.

Se observan mejoras en el paciente en el plazo de aproximadamente seis horas tras el procedimiento de administración de células. Varios días tras el procedimiento de administración de células se observa una mejora adicional del paciente evidenciada por el aumento de la producción de orina, la disminución de la creatinina, la excreción mejorada de nitrógeno, la disminución de la necesidad de CWH (hemodiálisis veno-venosa continua) o HID (hemodiálisis)...

EQUIVALENTES

Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar usando no más que experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descrita en el presente documento. Tales equivalentes pretenden abarcarse por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una composición que comprende células regenerativas derivadas de tejido adiposo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente con necrosis tubular aguda (NTA), en el que se obtienen dichas células regenerativas derivadas de tejido adiposo procesando tejido adiposo de dicho paciente en un sistema, que está configurado para mantener una ruta de fluido/tejido estéril cerrada, comprendiendo dicho sistema una cámara de recogida conectada a una cámara de mezclado/procesamiento.
2. El uso según la reivindicación 1, en el que la NTA se selecciona de NTA isquémica o NTA nefrotóxica.
3. El uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que el medicamento aumenta el flujo sanguíneo hacia una región isquémica.
4. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha cámara de mezclado/procesamiento comprende un filtro y una centrífuga.
5. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha cámara de recogida comprende un filtro y un dispositivo de mezclado que agita las células.
6. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha cámara de recogida comprende un agente de desagregación.
7. El uso según la reivindicación 6, en el que dicho agente de desagregación es una colagenasa.
8. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las células regenerativas derivadas de tejido adiposo comprenden células madre o células progenitoras.
9. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se formula dicho medicamento para una introducción en bolo.
10. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se formula dicho medicamento para su introducción en múltiples dosis.
11. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se formula dicho medicamento para su administración a una zona localizada de tejido.
12. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se formula el medicamento para su administración a la vasculatura renal.
13. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se formula dicho medicamento para su administración intravenosa, intraarterial o intraparenquimal.
14. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha composición comprende además un aditivo.

15. El uso según la reivindicación 14, en el que dicho aditivo comprende un factor angiogénico o un fármaco inmunosupresor.
16. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas células regenerativas derivadas de tejido adiposo no se hacen crecer en cultivo celular.
- 5 17. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que dichas células regenerativas derivadas de tejido adiposo se hacen crecer en cultivo celular.
18. El uso según la reivindicación 17, en el que dichas células regenerativas derivadas de tejido adiposo se hacen crecer en condiciones de cultivo que promueven la diferenciación hacia un fenotipo renal.
- 10 19. El uso según la reivindicación 17, en el que dichas células regenerativas derivadas de tejido adiposo se hacen crecer en condiciones de cultivo que promueven la diferenciación hacia un fenotipo endotelial.
20. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se modifican dichas células regenerativas derivadas de tejido adiposo mediante transferencia génica de manera que se altera la expresión de uno o más genes en las células regenerativas modificadas.
- 15 21. El uso según la reivindicación 20, en el que la modificación está destinada a alterar la angiogénesis.
22. El uso según la reivindicación 20, en el que la modificación el nivel de apoptosis de células tubulares.
- 20 23. El uso según la reivindicación 20, en el que la modificación está destinada a alterar las propiedades de asentamiento de dichas células regenerativas derivadas de tejido adiposo.
24. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho medicamento proporciona una concentración mínima entre 1×10^5 y 1×10^7 células regenerativas derivadas de tejido adiposo por ml.
- 25 25. El uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichas células regenerativas derivadas de tejido adiposo se caracterizan por la expresión de al menos un factor seleccionado del grupo constituido por factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento placentario (PLGF), eotaxina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), interleucina-6 (IL-6), proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) y factor plaquetario-4 (PF-4), cuando se cultivan.
- 30

FIGURA 1

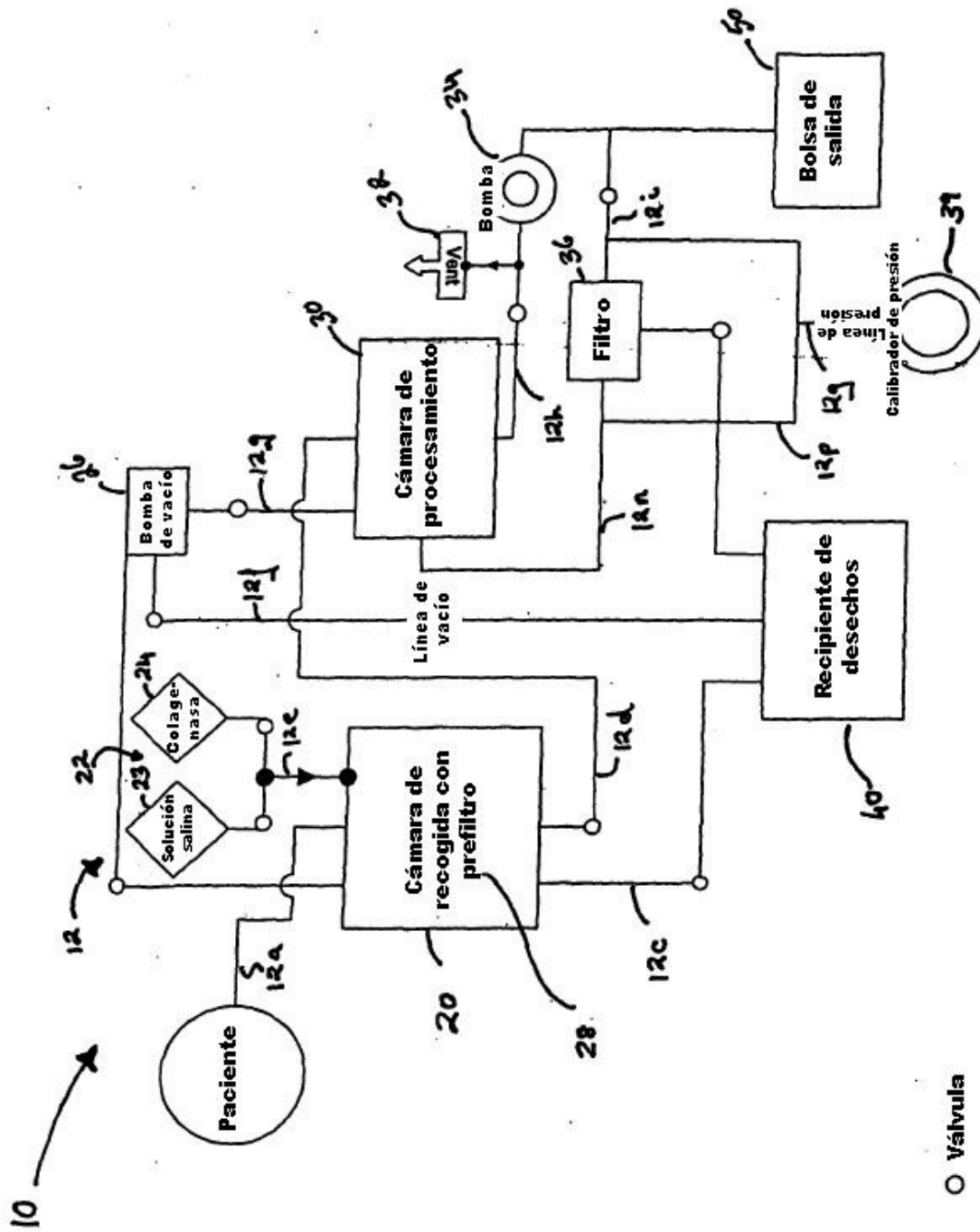


FIGURA 2

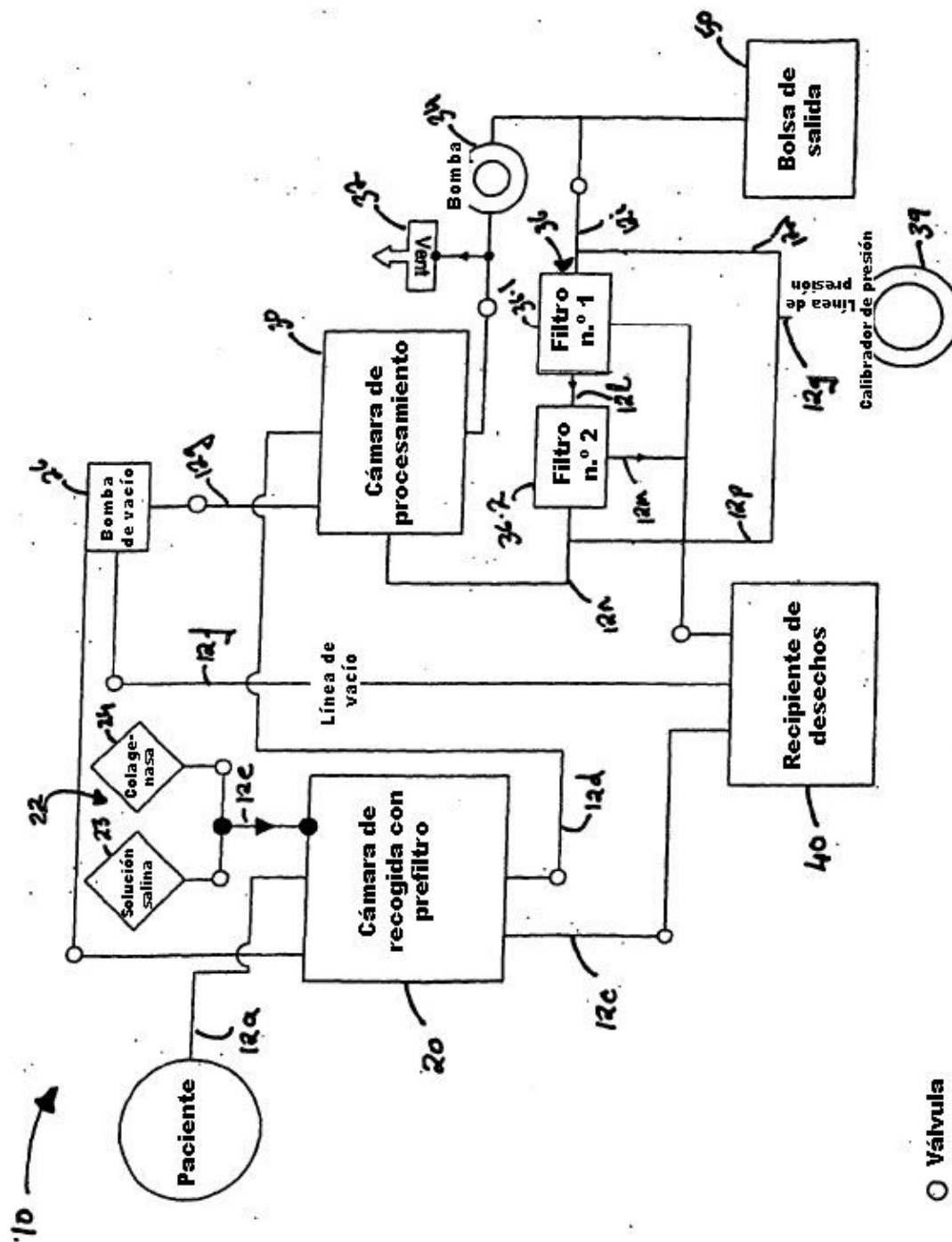


FIGURA 3

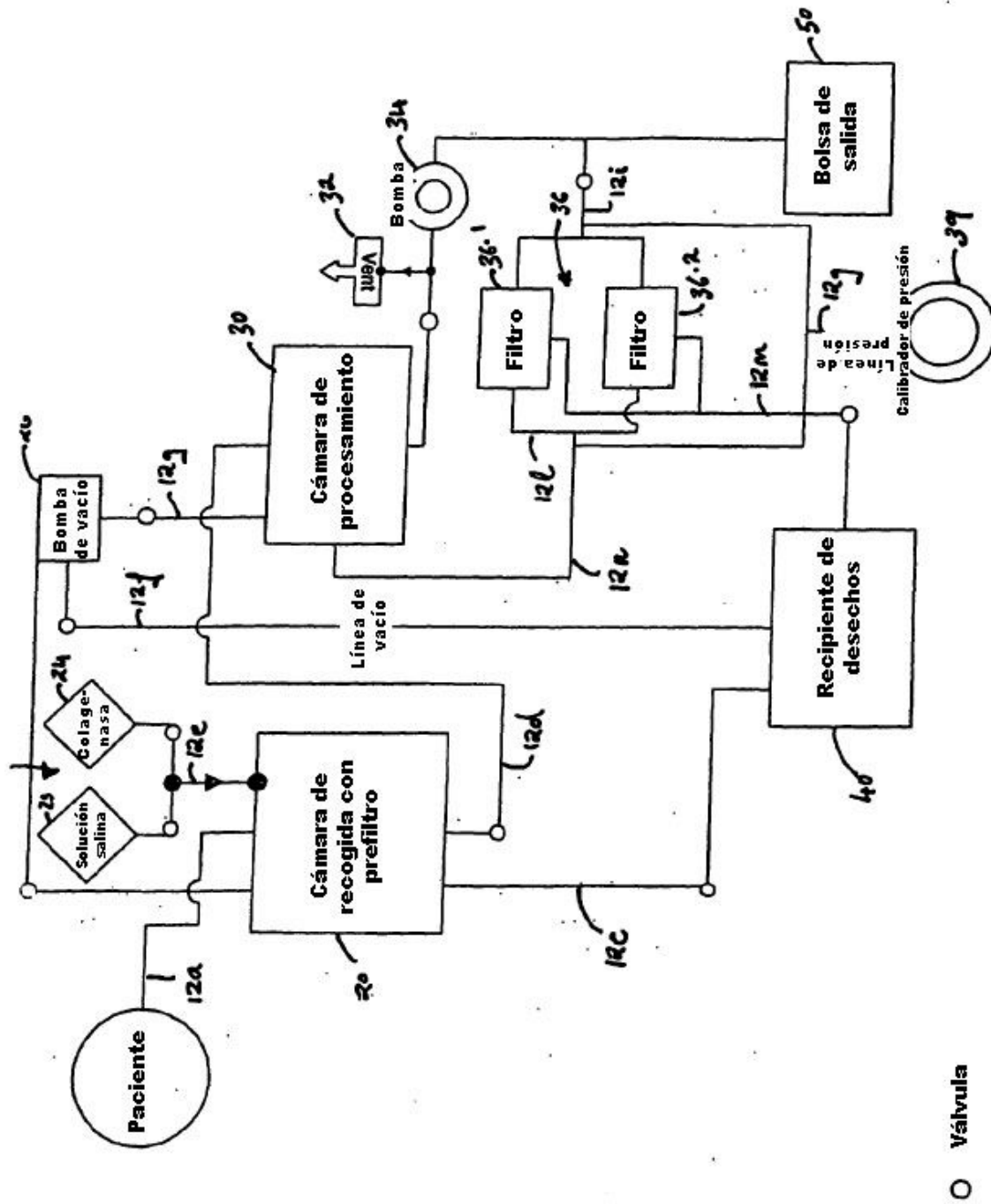


FIGURA 4

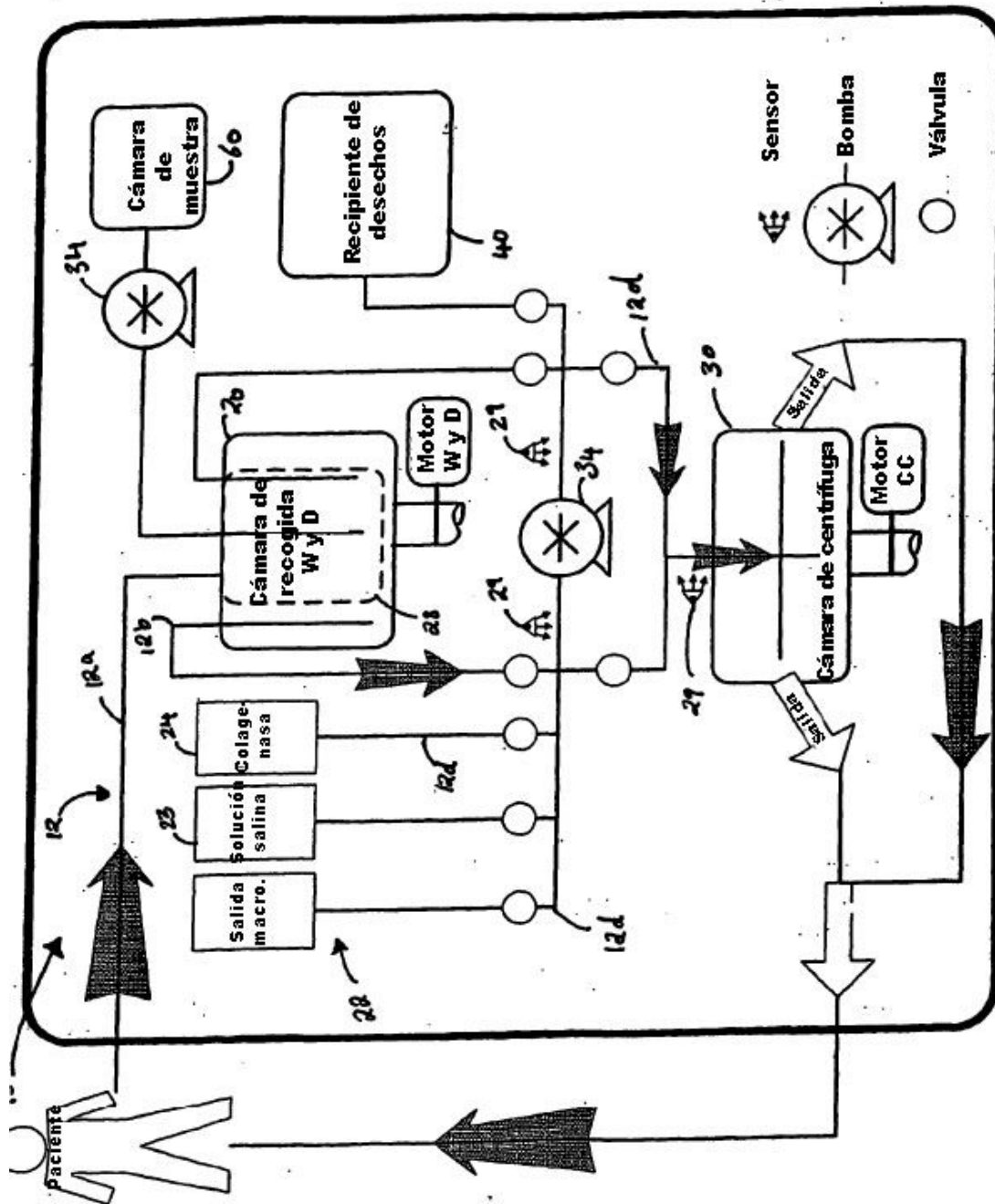


FIGURA 5

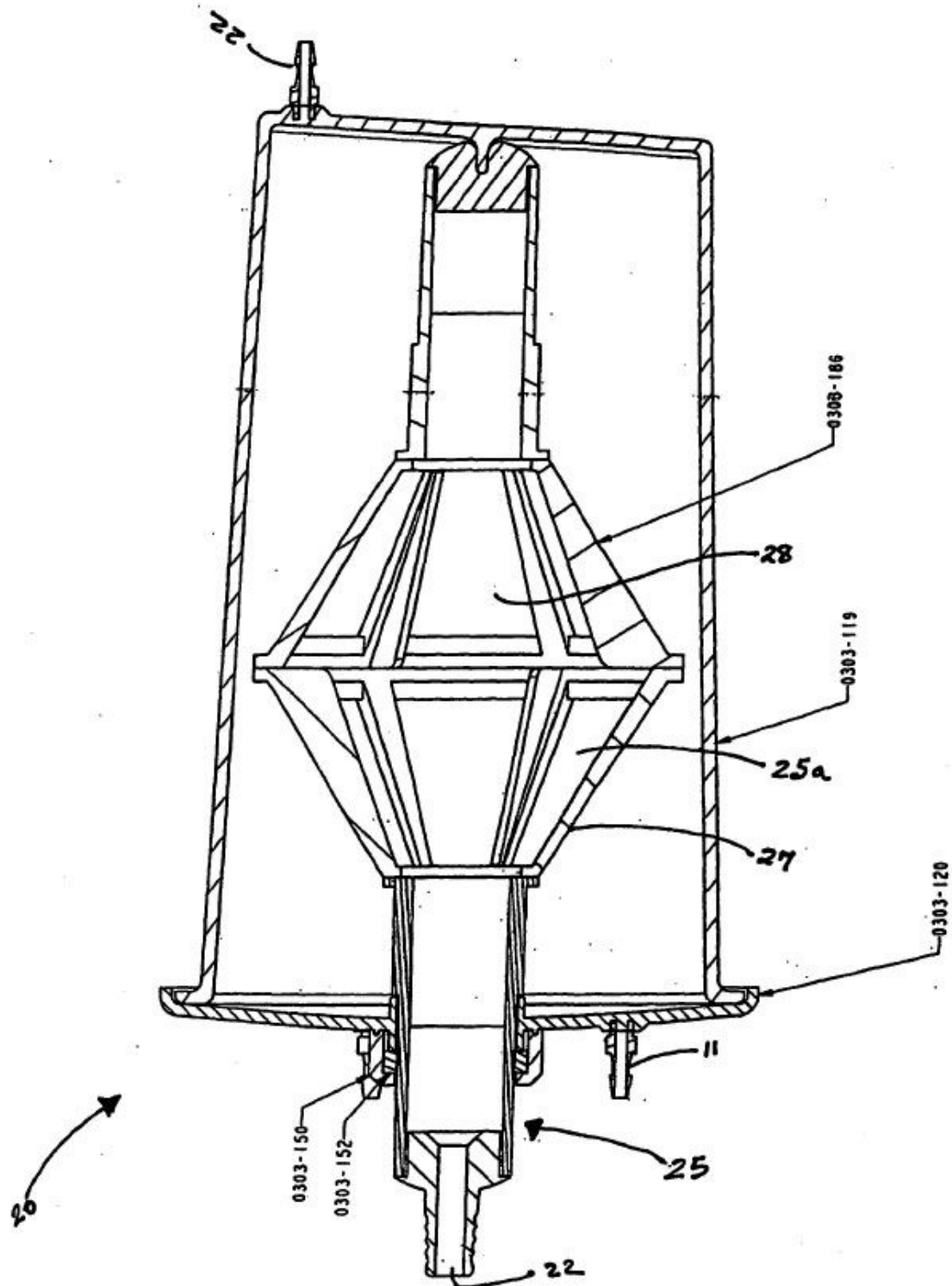


FIGURA 6

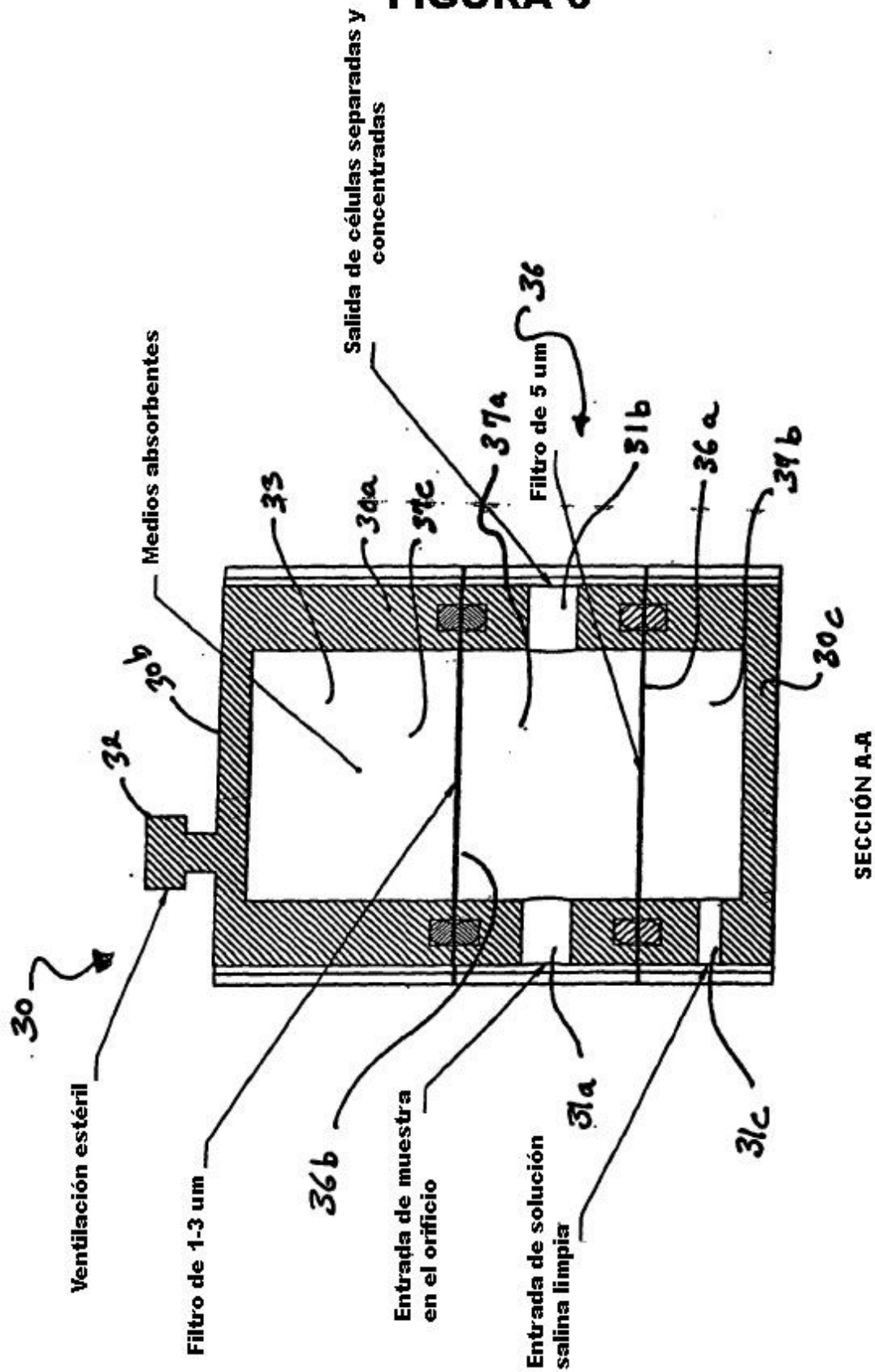


FIGURA 7

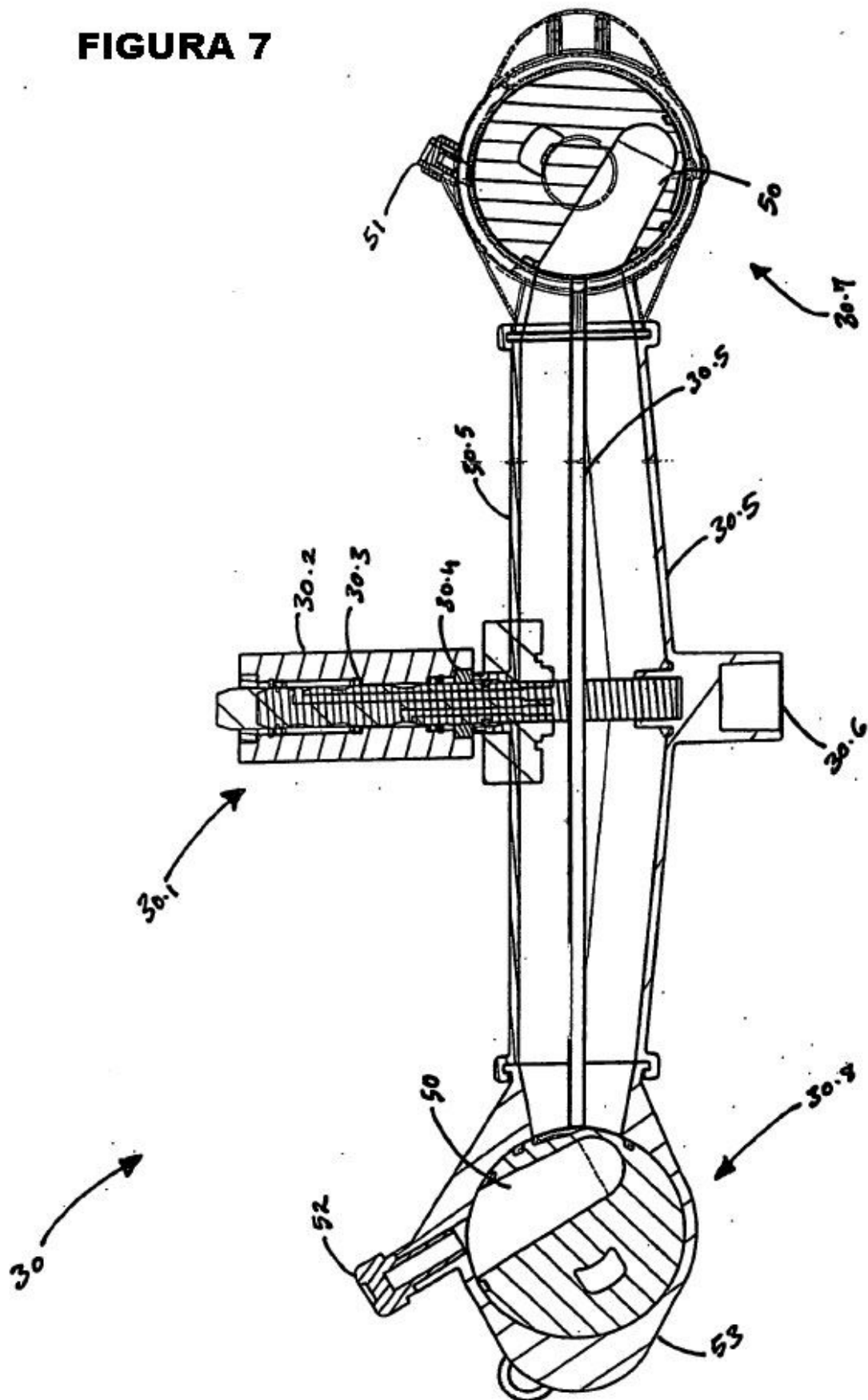


FIGURA 8

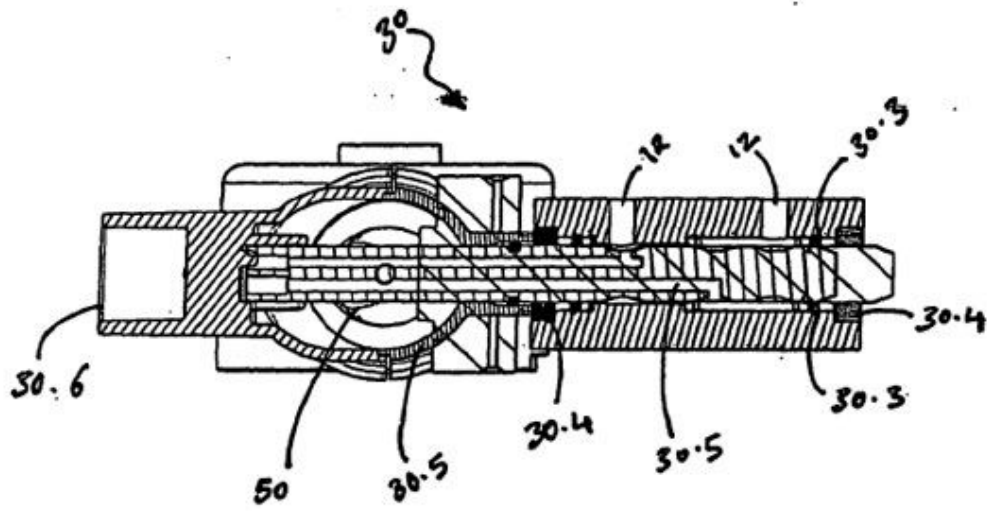


FIGURA 9

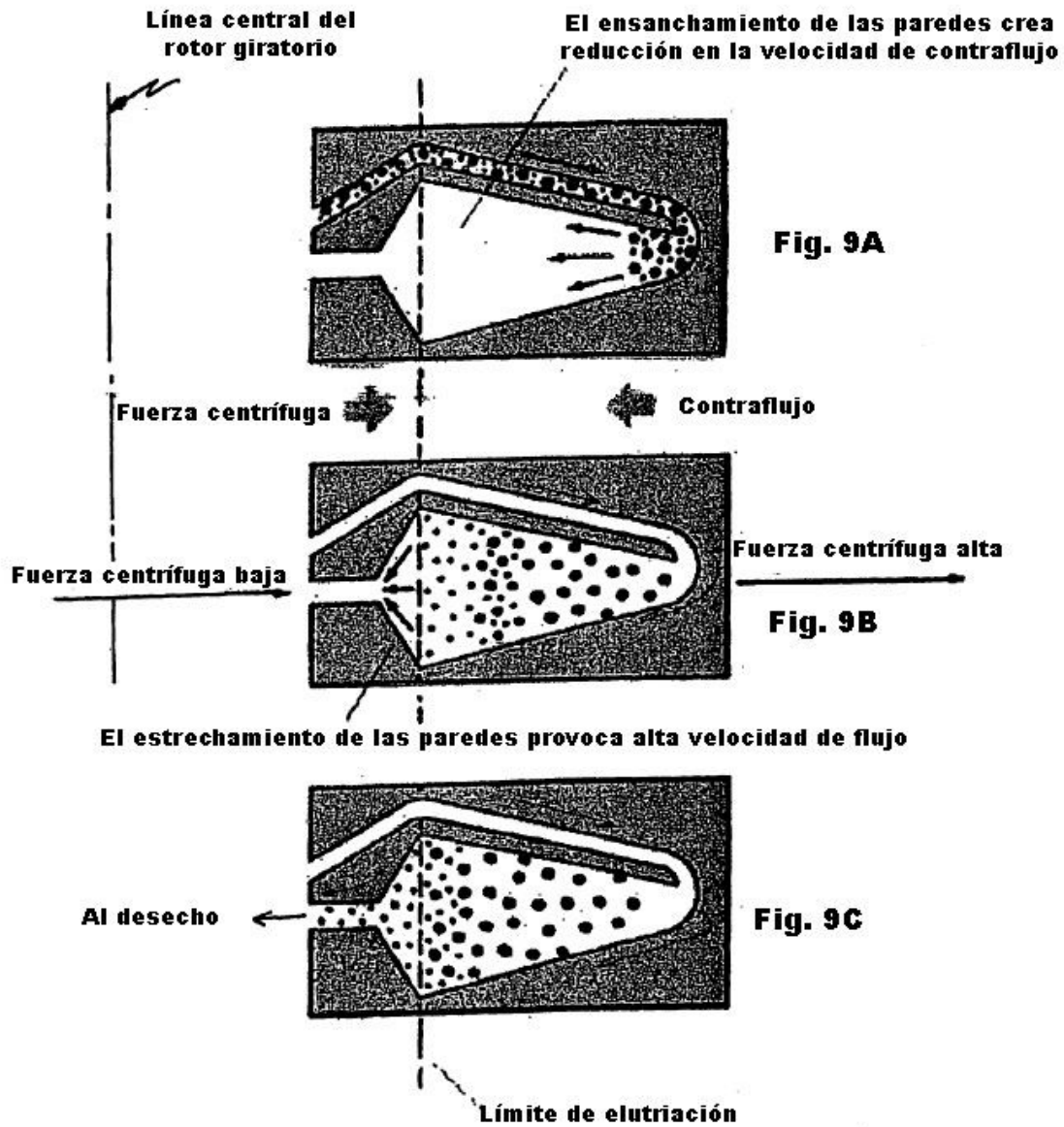


FIGURA 10

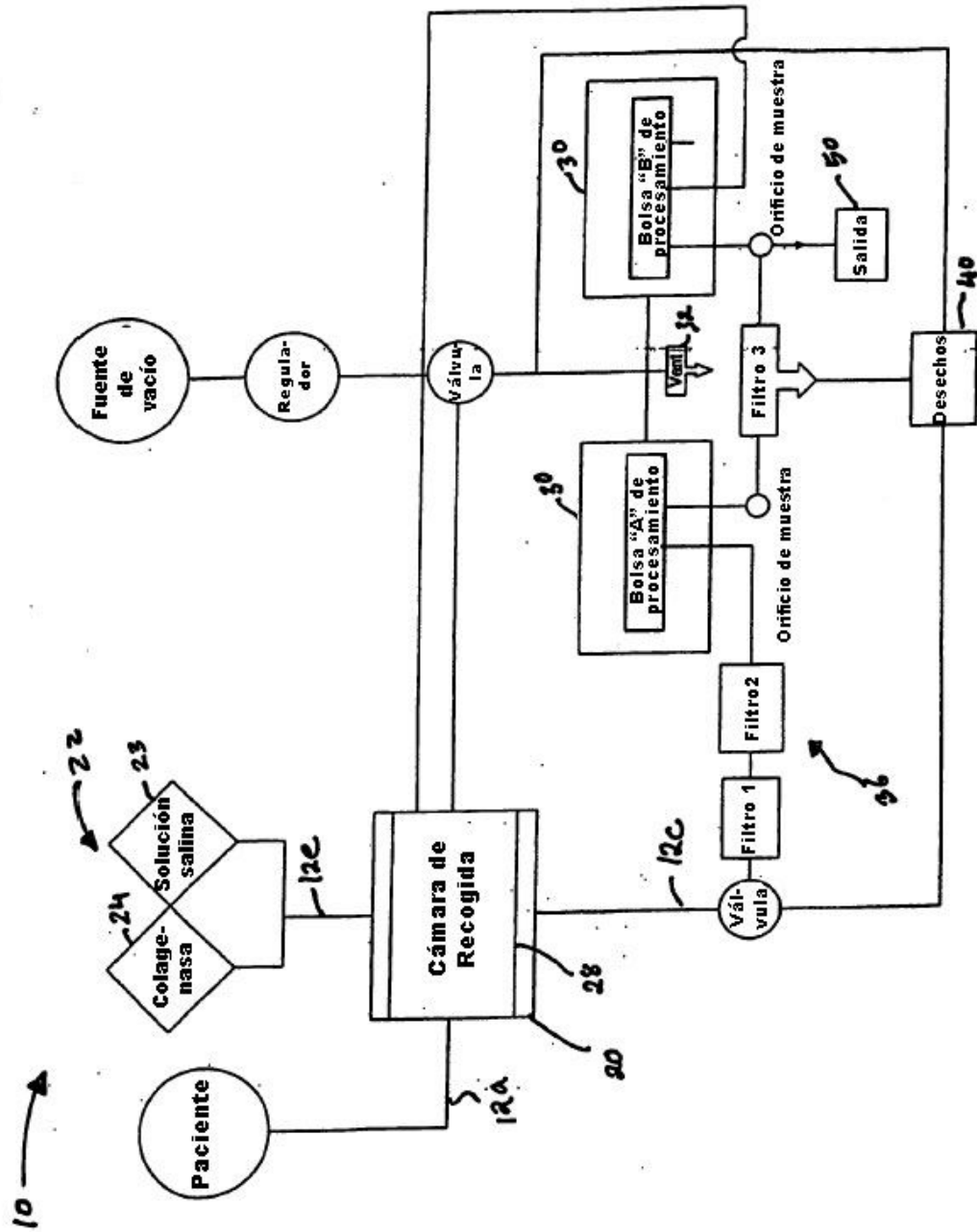


FIGURA 11

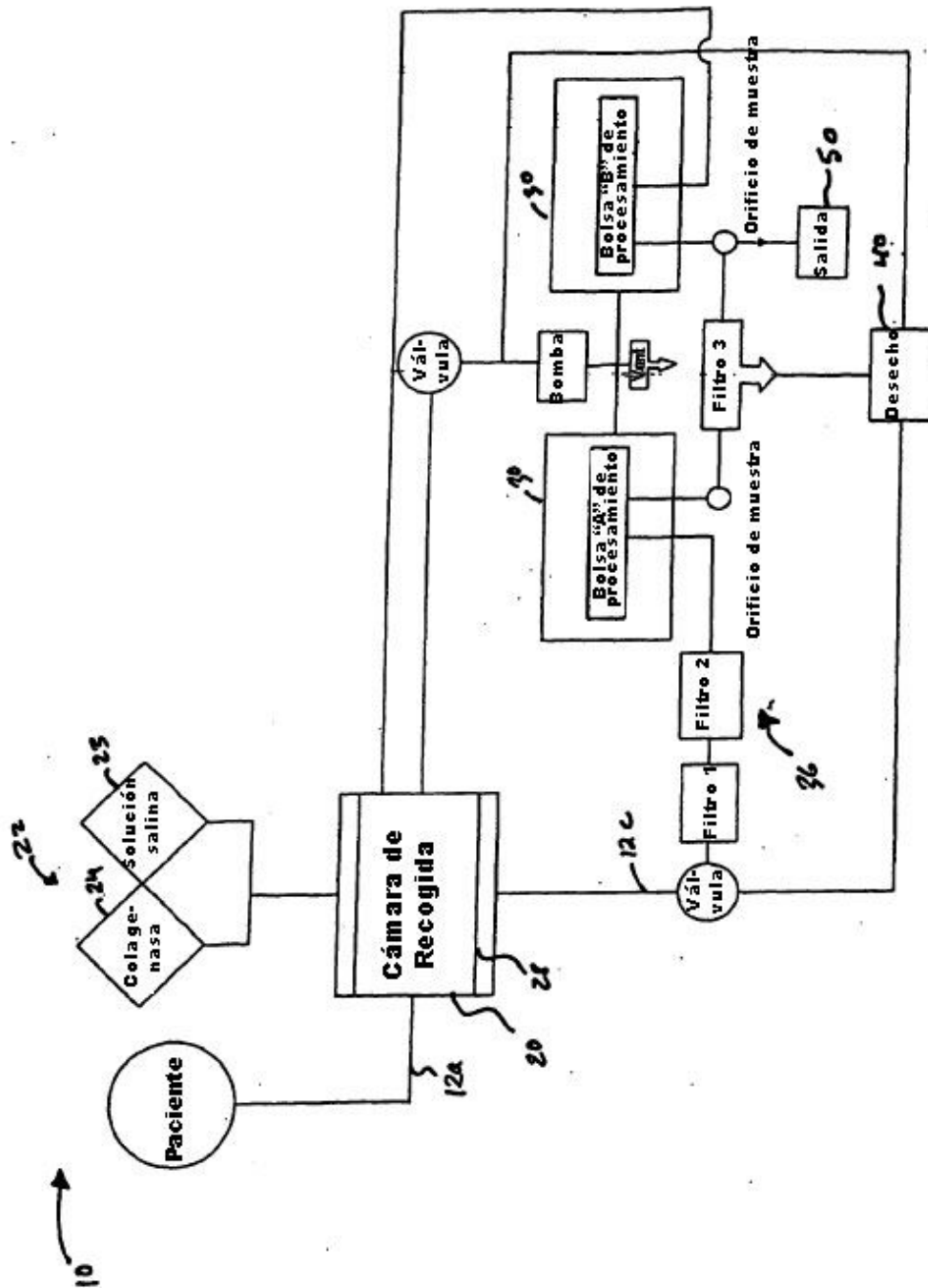


FIGURA 12

Flujo tangencial frente a filtración de extremo cerrado

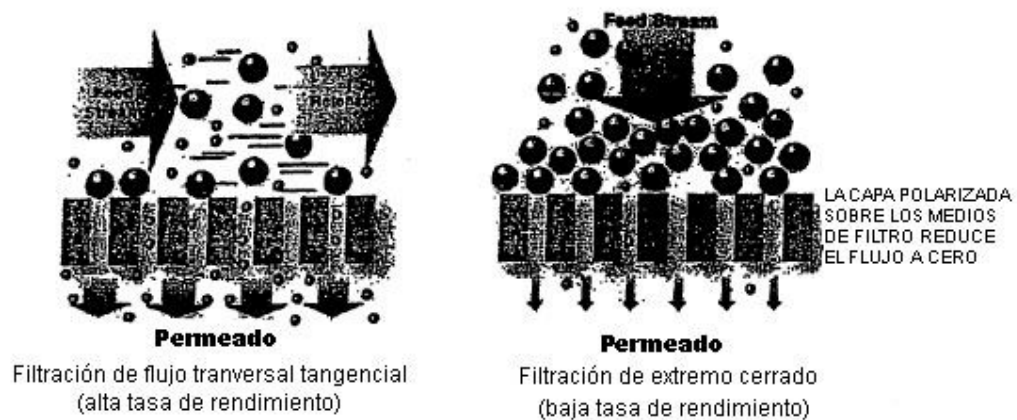


Figura 12A

Figura 12B

FIGURA 13

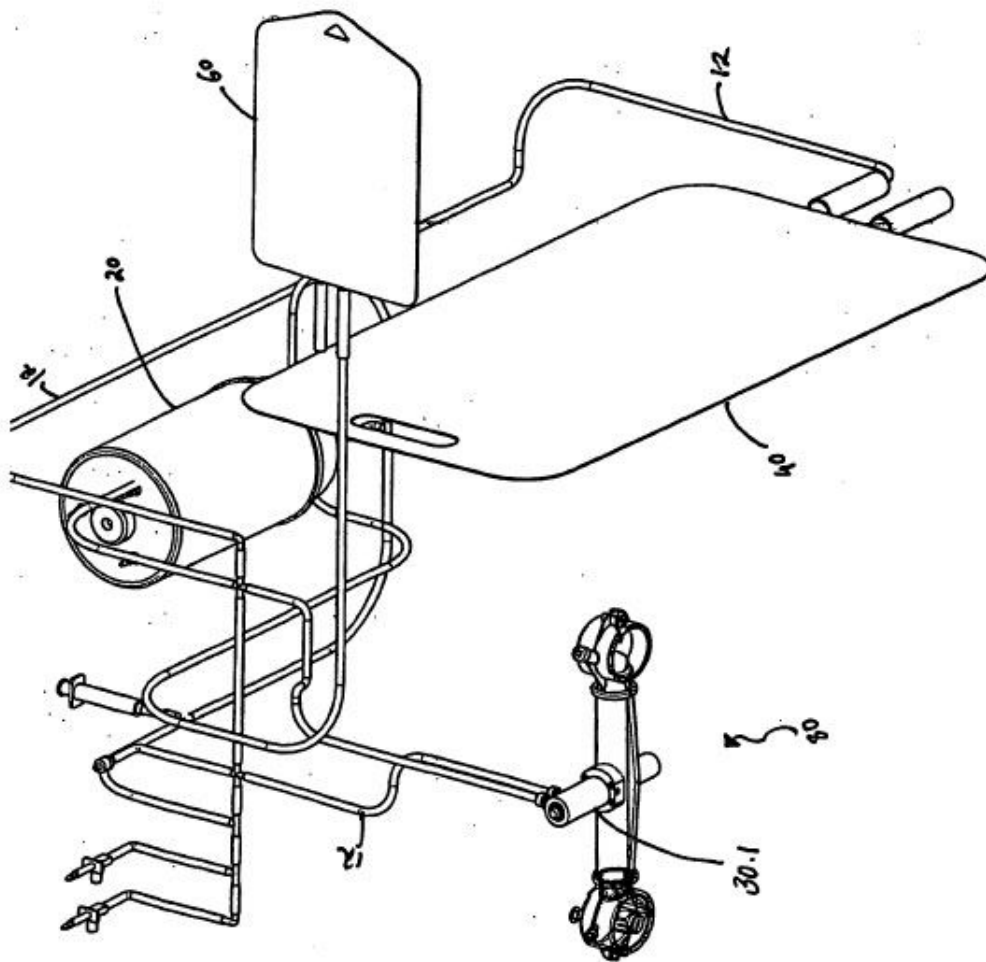


FIGURA 14

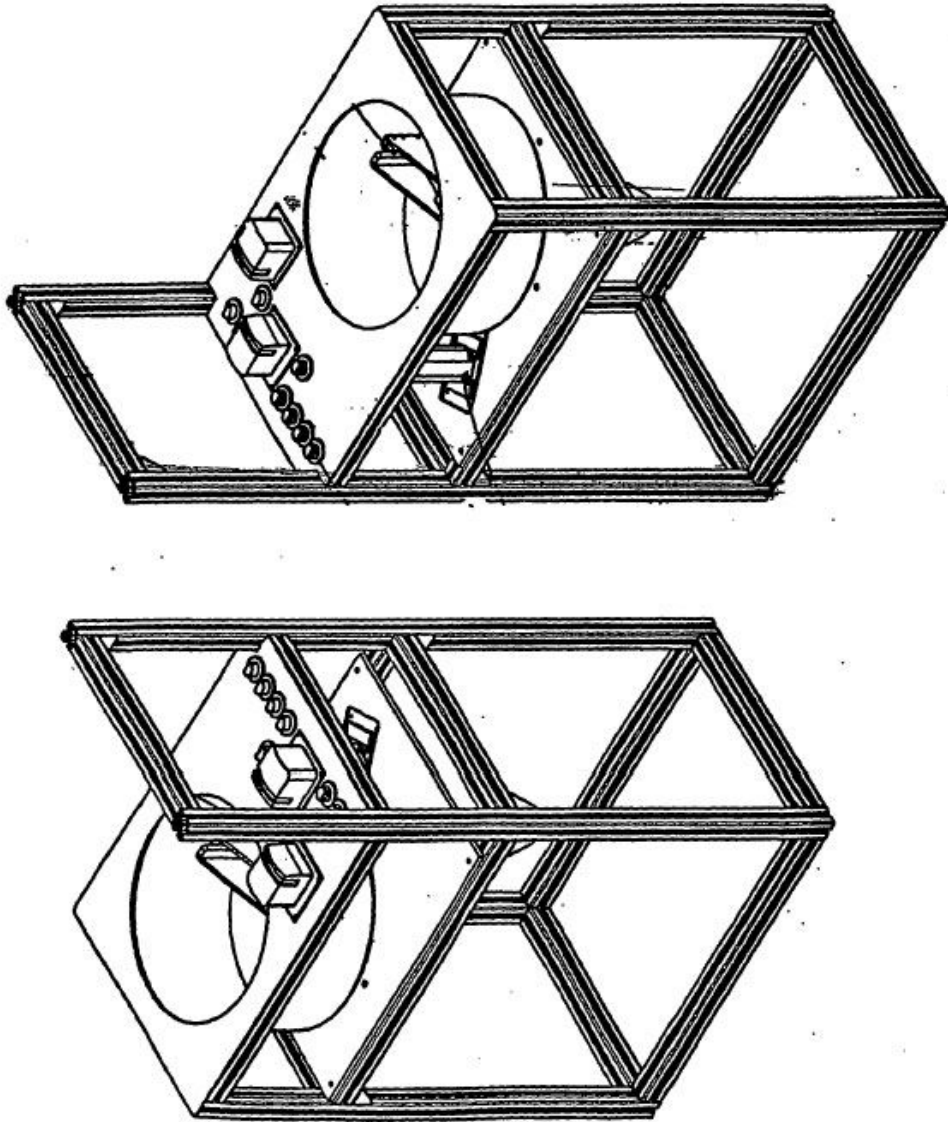


FIGURA 15A

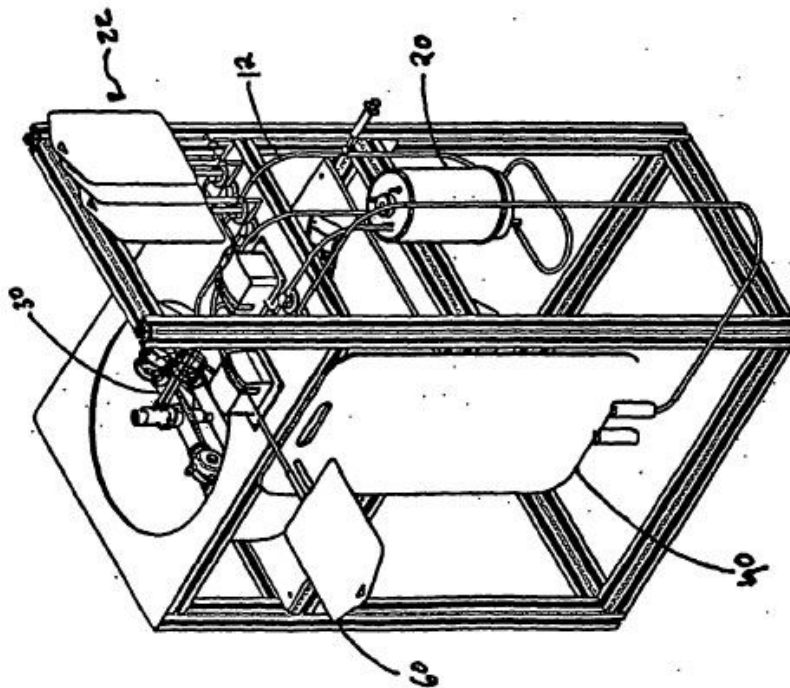
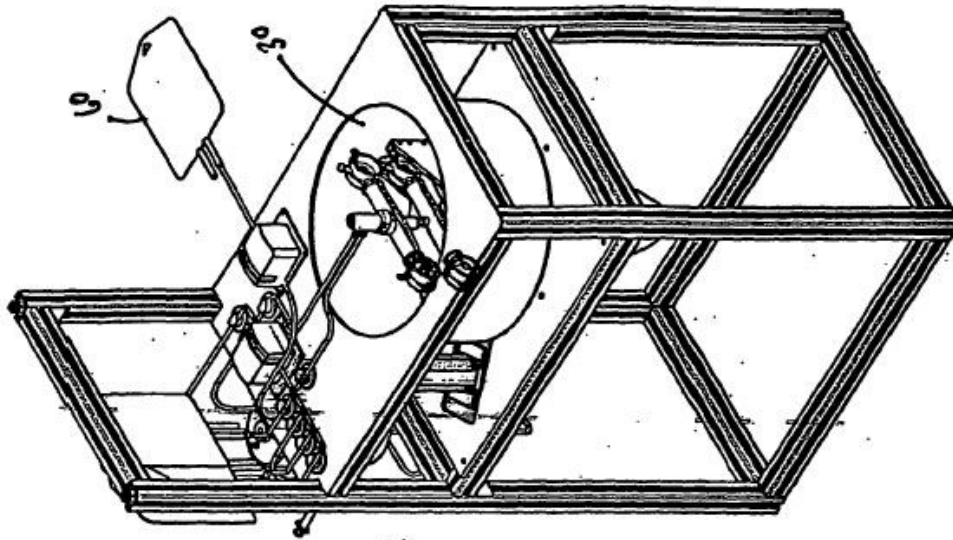


FIGURA 15B

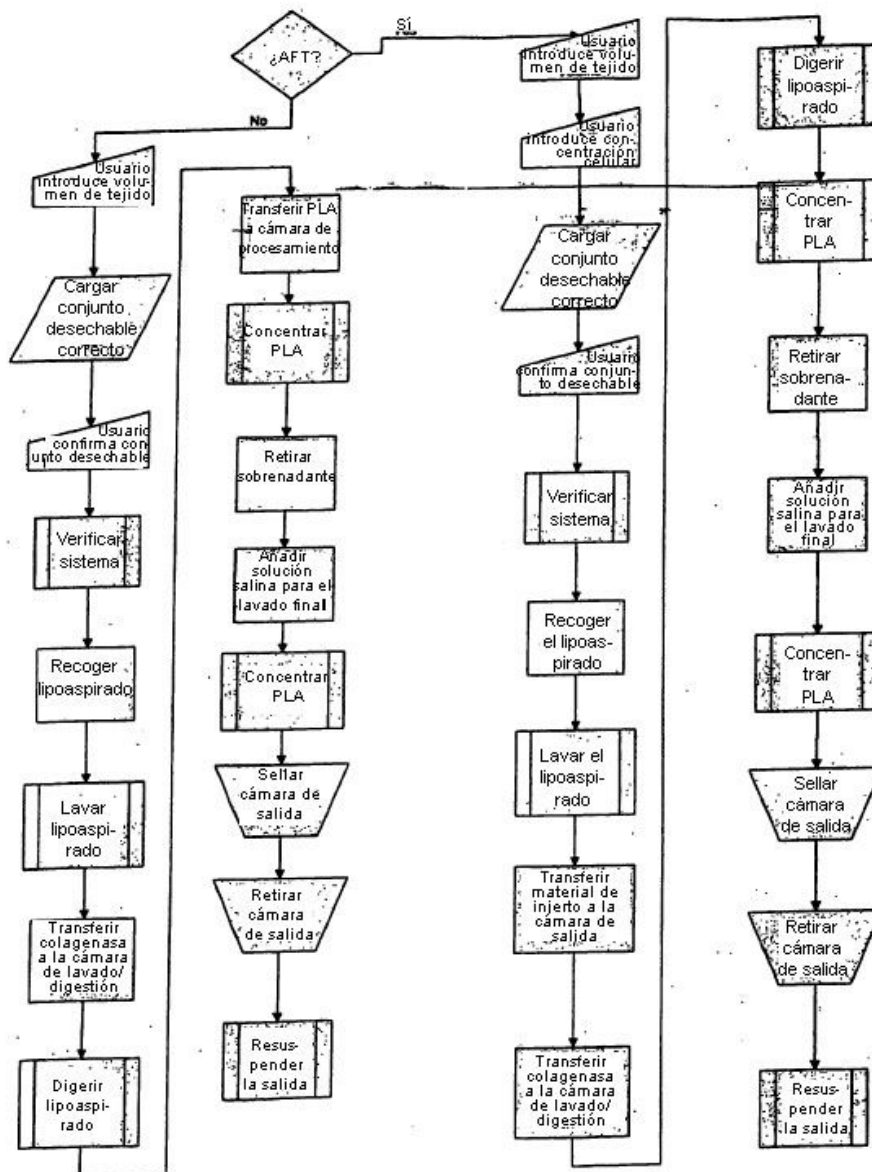


FIGURA 16

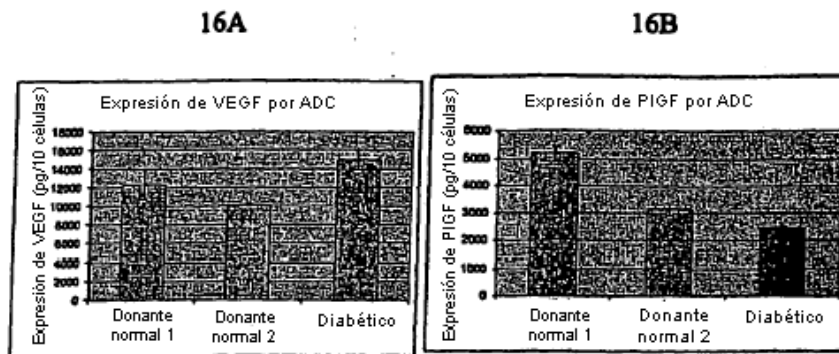


FIGURA 17



Tinción con UEA-1 de colonias de EPC derivadas de ADC

FIGURA 18

Crecimiento de estructuras vasculares CD31-positivas a partir de
ADC de ratones tratados con STZ y normales

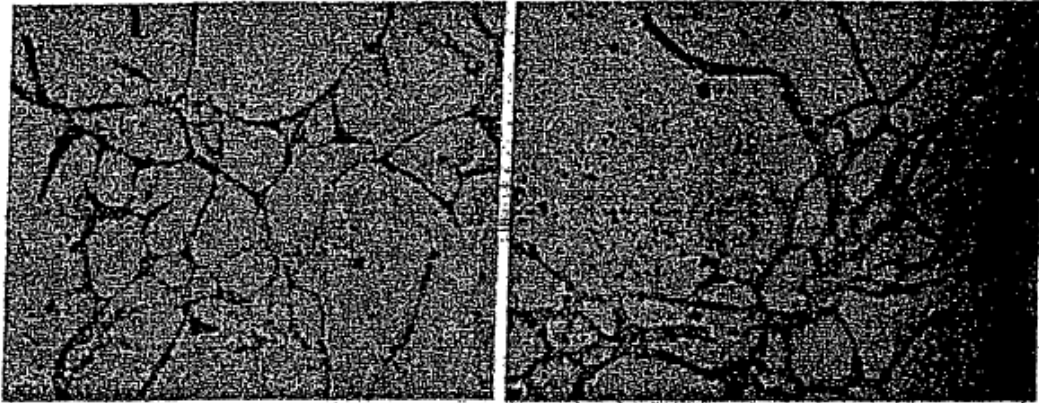


Figura 18A

Figura 18B

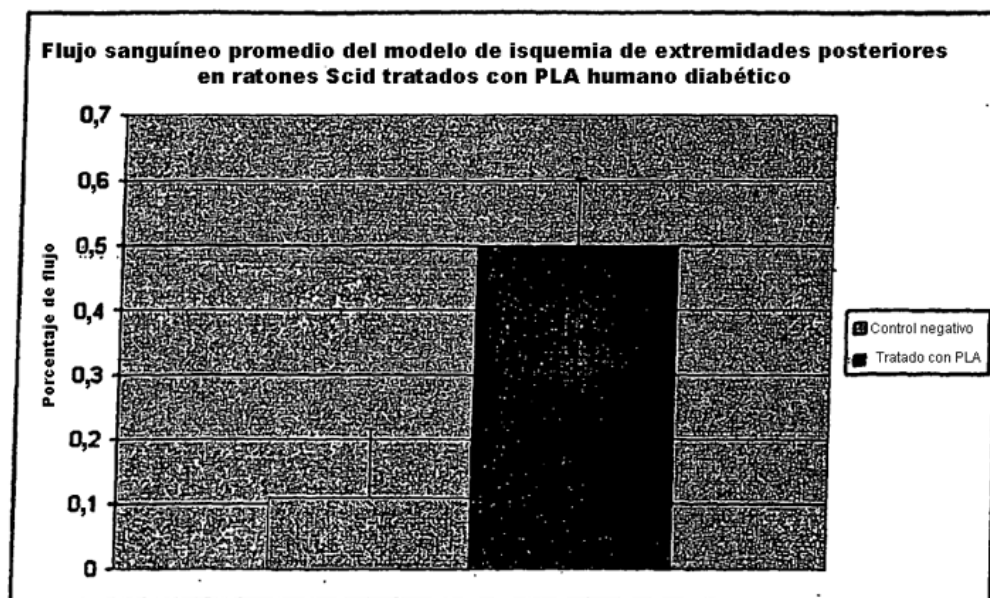
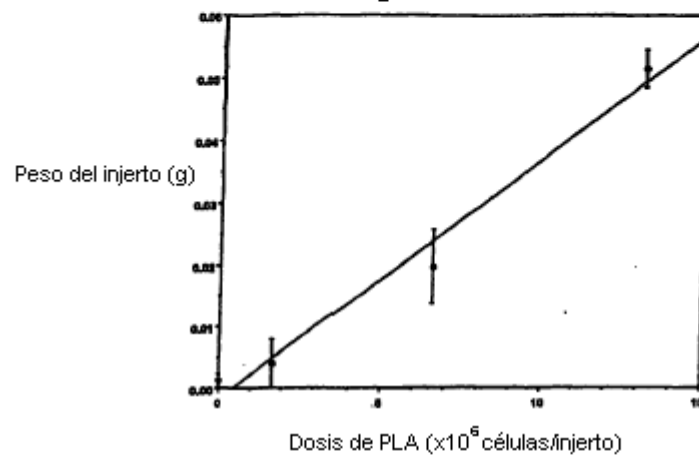
FIGURA 19

FIGURA 20**Figura 20A****Figura 20B**