(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 912 886**

(51) Int. CI.:

A61M 1/00 (2006.01)
C12M 1/02 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
C12M 1/33 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.06.2016 PCT/IL2016/050609**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **15.12.2016 WO16199149**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.06.2016 E 16735716 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.02.2022 EP 3307341**

(54) Título: **Aparato mecánico y procedimiento para aislar la fracción vascular del estroma**

(30) Prioridad:

10.06.2015 US 201562173542 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.05.2022

(73) Titular/es:

THE MEDICAL RESEARCH, INFRASTRUCTURE, AND HEALTH SERVICES FUND OF THE TEL AVIV MEDICAL CENTER (100.0%)
6 Weizmann Street
6423906 Tel-Aviv, IL

(72) Inventor/es:

SHANI, NIR;
GUR, EYAL;
SOLODEEV, INNA y
ARONOVICH, ANNA

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

Aparato mecánico y procedimiento para aislar la fracción vascular del estroma

Campo tecnológico

La invención generalmente se refiere a un proceso no enzimático para aislar la fracción vascular del estroma (SVF) de una constitución única y un aparato para llevar a cabo el proceso.

Antecedentes

El tejido adiposo representa una fuente abundante y accesible de células madre adultas capaces de diferenciarse a lo largo de múltiples vías de linaje. El lipoaspirado obtenido del tejido adiposo ha demostrado ser una fuente rica y accesible de varios tipos de células madre/progenitoras que tienen características multipotentes adecuadas para la ingeniería de tejidos y aplicaciones médicas regenerativas [**1**].

La digestión enzimática del tejido adiposo se ha practicado más comúnmente para procesar lipoaspirados. Por ejemplo, el procesamiento de lipoaspirado para el aislamiento de células madre/progenitoras derivadas de tejido adiposo se ha llevado a cabo previamente triturando almohadillas de grasa de rata, lavando para eliminar las células hematopoyéticas contaminantes e incubando los fragmentos de tejido con colagenasa para separar la población flotante de adipocitos maduros de la fracción vascular del estroma peletizada (SVF) [**2**].

El desarrollo de la cirugía de liposucción ha simplificado el procedimiento. Durante la liposucción, un cirujano infunde los tejidos subcutáneos con una solución salina que contiene anestésico y/o epinefrina a través de una cánula y, a continuación, extrae tanto el líquido como el tejido bajo succión para generar fragmentos de tejido finamente picados de forma típica, cuyo tamaño depende de las dimensiones de la cánula [**3**].

Por lo tanto, las células madre/estromales derivadas de tejido adiposo humano pueden aislarse fácilmente de biopsias y muestras de liposucción [**4**]; pueden derivarse de la porción líquida de los aspirados de liposucción con el uso de una columna adherente [**5**] y también pueden aislarse de muestras de lipoaspirado humano mediante un procedimiento de disociación mecánica no enzimática [**6**].

Mientras investigaba cuantitativamente los efectos de la centrifugación en los aspirados de liposucción para optimizar las condiciones centrífugas para el trasplante de grasa y el aislamiento de células madre derivadas de tejido adiposo, Kurita M, y col., sugirieron 1200 × g como una fuerza centrífuga optimizada para obtener buenos resultados a corto y largo plazo en el trasplante de tejido adiposo [**7**].

Shah A, y col. describió un procedimiento no enzimático de lavado de tejido adiposo para aislar células madre estromales derivadas de tejido adiposo humano [**8**].

Recientemente, se han descrito varios dispositivos mecánicos para aislar células madre y/o progenitoras derivadas de tejido adiposo a partir de lipoaspirados.

El documento US 2012/264213 [**9**] describe un dispositivo de extracción de lipoaspirado que facilita la recogida y el procesamiento de células madre y/o progenitoras derivadas de tejido adiposo liberadas mecánicamente a partir del fluido obtenido durante la liposucción.

El documento US 2013/034524 [**10**] describe un dispositivo y un procedimiento para extraer, separar y concentrar células regenerativas clínicamente útiles del tejido adiposo utilizando una combinación de disgregación mecánica y filtración-centrifugación para obtener una población altamente enriquecida de células madre.

Alexander RW [**11**] informó sobre las diferencias en el uso de lipoaspirados de microcánula sometidos a emulsificación mecánica para proporcionar lisis de adipocitos maduros adultos, preservando la fracción vascular del estroma tisular (tSVF) en forma de partículas pequeñas que pueden inyectarse a través de agujas de pequeño calibre.

Publicaciones

[**1**] Gimle J, Investigación de circulación. 2007, 100: 1249-1260;

[**2**] Rodbell M y Jones AB, J Biol Chem, 1966; 241: 140-142;

[**3**] Illouz YG. Cirugía de reconstr. Plást., 1983; 72: 591-597;

[**4**] Dubois SG, y col., Procedimientos Biol Mol, 2008; 449:69-79;

[**5**] Kentaro Doi1 y col., Citoterapia, vol. 16, número 3, 2014, páginas 381-391;

[**6**] Baptista LS, y col., Citoterapia, 2009; 11(6):706-15;

[**7**] Kurita M, y col., Cirugía reconstr. plást. 2008, 121(3):1033-41;

[**8**] Shah S, y col., Citoterapia, 15(8), 2013, páginas 979-985

[**9**] US 2012/264213

[**10**] US 2013/034524

[**11**] Alexander RW, Revista de Proloterapia. 2016;8:e947-e960.

[**12**] Lv, F.-J., y col.,Células madre 2014; 32:1408-1419.

Descripción general

Las realizaciones que no entran dentro del alcance de las reivindicaciones no son realizaciones de la invención. La invención se define por las características de las reivindicaciones.

La invención descrita en esta invención se refiere generalmente a un aparato y un proceso para el aislamiento de la fracción vascular del estroma (SVF) después de la lipoaspiración.

Más específicamente, la presente invención se refiere a un procedimiento mecánico para aislar la fracción de células del estroma del tejido graso usando una combinación de disrupción/disociación mecánica, lavado y centrifugación para obtener una población enriquecida de fracción vascular del estroma. El procedimiento mecánico se lleva a cabo en un recipiente o contenedor o aparato cerrado de un solo uso que está adaptado para recibir, manipular y permitir la separación de la población celular enriquecida. El recipiente tiene forma de ***"conjunto de contenedores***" (intercambiable en esta invención con *"contenedor"*), en algunas realizaciones que tienen una forma de pared lateral cilíndrica, que tiene una base cóncava, una porción de techo superior y una base de fondo plana que permite que el contenedor permanezca de pie sin ayuda sobre una superficie plana. El recipiente está configurado para recoger los adipocitos del cuerpo de un mamífero y además está adaptado para promover la retención de un sedimento celular (por ejemplo, después de la centrifugación del recipiente) en la parte inferior del contenedor.

En algunas realizaciones, el conjunto de contenedor tiene una tapa (cubierta) de cierre circular (por ejemplo, a presión, roscada) que actúa para sellar herméticamente el recipiente. La tapa de cierre tiene múltiples entradas sellables para permitir la inserción de tubos/cánulas en la unidad contenida. Las entradas sellables están adaptadas para permitir la inserción de varios tubos y cánulas de acuerdo con un procedimiento particular de uso (por ejemplo, insertar un tubo para dejar entrar la solución de lavado, para unir el tubo de aspiración y la bomba de vacío descritos en esta invención, etc.).

La tapa de cierre del conjunto del contenedor está configurada para permitir la unión de un actuador eléctrico que puede conectarse de forma desmontable (por ejemplo, mediante un eje/manguito) a un dispositivo mecánico de disrupción de tejido situado dentro del conjunto del contenedor que es adyacente pero no tiene contacto con la base cóncava del contenedor.

El ***"dispositivo de disrupción de tejido mecánico"*** puede ser cualquier dispositivo (por ejemplo, de contenido cerrado) adecuado para la disrupción/disociación de tejidos que mantiene la viabilidad celular durante todo el proceso de disrupción/disociación.

Según la invención, el dispositivo mecánico de disrupción de tejido comprende al menos una hoja o rotor giratorio.

En otras realizaciones, el dispositivo mecánico de disrupción de tejido comprende bolas o perlas trituradoras (por ejemplo, perlas de vidrio de 0,5 - 2 mm de diámetro o perlas de zirconio/sílice).

De acuerdo con la presente invención, la esterilización del conjunto de recipiente no afecta al efecto de sellado de la tapa de cierre y/o las entradas situadas en el mismo.

El ***"tubo de aspiración"*** (intercambiable en esta invención con *"canula"*) generalmente se refiere a una cánula que se usa comúnmente para la liposucción o cualquier otro procedimiento médico que implique la extracción de células y/o fragmentos de tejido de un tejido corporal (por ejemplo, una capa de grasa) de un mamífero (por ejemplo, mediante la inserción a través de una pequeña incisión en el sitio de eliminación de grasa en el cuerpo para permitir que los adipocitos sean aspirados del cuerpo mediante succión). Típicamente, la cánula constituye un tubo hueco despuntado en la punta y que tiene al menos una apertura (agujeros) en su punta. La cánula puede ser reutilizable (para permitir múltiples usos de la misma) y puede esterilizarse mediante autoclave de vapor o mediante cualquier otro procedimiento de esterilización estándar conocido en la técnica.

El tubo hueco de la cánula está configurado para permitir el paso de una mezcla que comprende componentes líquidos y de tejido adiposo (p. ej., adipocitos, fragmentos de glóbulos de grasa triturados, células de grasa desgarradas) succionados desde el cuerpo de un mamífero hacia la cánula y directamente hacia el conjunto del contenedor a través de una entrada en la tapa de cierre del conjunto del contenedor.

De acuerdo con la presente invención, se fija una bomba de vacío al contenedor (por ejemplo, tapa de cierre o pared lateral) para activar la liposucción de tejido adiposo en el contenedor a través del tubo de aspiración.

En algunas realizaciones, la bomba de vacío es una bomba de liposucción (por ejemplo, cualquier bomba de succión quirúrgica de liposucción conocida en el campo de la técnica que se puede usar de acuerdo con la invención).

Tal como se utiliza en esta invención, el término ***"tejido adiposo"*** (intercambiable en esta invención con *"adipocitos"*) generalmente se refiere a cualquier tipo de células y/o fragmentos de tejido que pueden aislarse del tejido adiposo y que pueden usarse para aislar una fracción de células del estroma (SVF) del mismo.

De acuerdo con la presente invención, el SVF se puede derivar de las porciones tanto grasa como fluida del aspirado de liposucción y normalmente comprende una mezcla heterogénea de múltiples poblaciones celulares que tienen diferentes grados de madurez y función. En consecuencia, el SVF generalmente se compone de una porción de células hematopoyéticas (p. ej., granulocitos, monocitos y linfocitos) junto con preadipocitos, células endoteliales, pericitos, fibroblastos y células madre progenitoras.

En algunas realizaciones, el SVF obtenido en el procedimiento de la presente invención se caracteriza por al menos una de las siguientes características:

- El SVF es identificable fenotípicamente por tener un porcentaje de células CD45+ de entre aproximadamente el 40% y entre aproximadamente el 91%;

- El SVF es fenotípicamente identificable por tener un porcentaje de entre alrededor de 5 y alrededor de 50 de CD45(-) CD31(-) CD34(+) y entre alrededor de 3 y entre alrededor de 40 de células CD45(-) CD73(+) CD29(+);

- El SVF es identificable fenotípicamente por tener un porcentaje de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 40 de células CD45(-) CD31(-) CD34(+) y entre aproximadamente 6 y aproximadamente 30 de células CD45(-) CD73(+) CD29(+);

- El SVF es fenotípicamente identificable por tener un porcentaje de entre aproximadamente 2 y entre aproximadamente 15 de CD45(-) CD31(-) puerta de monocitos (+) células CD34 (+);

- El SVF es fenotípicamente identificable por tener un porcentaje de entre aproximadamente 4 y entre aproximadamente 10 de CD45(-) CD31(-) puerta de monocitos (+)células CD34 (+);

- El rendimiento de SFV de células nucleadas es al menos 3 veces mayor que el obtenido en el procedimiento de lavado solamente descrito en esta invención;

- La cantidad de células por 1 ml de lipoaspiradas después del cultivo celular durante un período de entre 7 y 14 días es superior en al menos 15 veces en comparación con la obtenida en el procedimiento de solo lavado, como se describe más adelante;

- El SVF contiene un mayor porcentaje de células madre progenitoras mesenquimales en comparación con el obtenido en el procedimiento de lavado único, medido por la capacidad de diferenciación de las células y por marcadores específicos de células madre y propiedades físicas identificadas por citometría de flujo;

- El SVF es inyectable (por ejemplo, en un tejido de mamífero) a través de agujas muy pequeñas que tienen un número de calibre de entre calibre 33 y calibre 7.

En algunas realizaciones, el SVF obtenido en el procedimiento de la presente invención se caracteriza por tener un porcentaje de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 40 de CD45(-) CD31(-) CD34(+) y entre aproximadamente 6 y aproximadamente 30 de CD45(-) células CD73(+) CD29(+); y/o que tiene un porcentaje de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 10 de CD45(-) CD31(-) puerta de monocitos (+) células CD34 (+).

En algunas realizaciones, el SVF se identifica fenotípicamente por tener un porcentaje de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 50 de CD45(-) CD31(-) CD34(+) y entre aproximadamente 3 y aproximadamente 40 de CD45(-) CD73(+) células CD29 (+). En algunas realizaciones, el SVF es identificable fenotípicamente por tener un porcentaje de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 40 de CD45 (-) CD31 (-) CD34 (+) y entre aproximadamente 6 y aproximadamente 30 de células CD45 (-) CD73 (+) CD29 (+).

En algunas realizaciones, el SVF es fenotípicamente identificable por tener un porcentaje de entre aproximadamente 2 y entre aproximadamente 15 de CD45(-) CD31(-) puerta de monocitos (+) células CD34 (+). En algunas realizaciones, el SVF es fenotípicamente identificable por tener un porcentaje de entre aproximadamente 4 y entre aproximadamente 10 de CD45(-) CD31(-) puerta de monocitos (+) células CD34 (+).

En algunas realizaciones, el diámetro de la cánula de aspiración está entre aproximadamente 0,5 mm y entre aproximadamente 10 mm

En otras realizaciones, el diámetro de la cánula de aspiración está entre aproximadamente 2 mm y entre aproximadamente 6 mm, o entre aproximadamente 3 mm y aproximadamente 5 mm.

La cánula de la presente invención puede tener varios tipos de puntas en su extremo distal para optimizar la unión e inserción en la capa de grasa para la recolección de adipocitos. Como se dará cuenta fácilmente el artesiano experto, el tamaño óptimo (por ejemplo, diámetro, longitud) y el tipo de material de la cánula se dictan en función de varios parámetros asociados con la condición del paciente, los requisitos específicos del médico que realiza la liposucción, el uso previsto de los adipocitos recolectados, etc.

Como se daría cuenta un experto en la materia, el proceso de aspiración (liposucción) puede romper parcialmente el tejido adiposo aspirado (por ejemplo, en glóbulos de grasa) debido a las fuerzas de cizallamiento afectadas durante la succión y el paso a través del tubo de aspiración. En consecuencia, los adipocitos recogidos en el contenido ya pueden estar parcialmente alterados. Una vez que los adipocitos se recogen en el conjunto del contenedor, la disrupción mecánica de los adipocitos recolectados se lleva a cabo en el líquido aspirado durante la liposucción (por ejemplo, compuesto principalmente de lipoaspirado en solución fisiológica pero que también puede contener restos de sustancias anestésicas locales tales como lidocaína y epinefrina) o en la solución de lavado o en el lipoaspirado aislado que se separó de cualquier solución añadida utilizando el dispositivo mecánico de disrupción de tejido controlado por un actuador eléctrico que está conectado externamente y de forma desmontable a la tapa de cierre del recipiente. El dispositivo mecánico de disrupción de tejido (que normalmente comprende al menos un rotor o hoja para ejercer una fuerza de rotación) está configurado para ser bajado y retraído hacia y desde el fondo cóncavo del recipiente y para bloquearse en su lugar (por ejemplo, durante la disrupción mecánica de los adipocitos).

La velocidad del rotor del dispositivo mecánico de disrupción de tejidos (medida en tasas por minuto [RPM]) se adapta para mantener la viabilidad de las células de la fracción vascular del estroma aspiradas de la capa de grasa del cuerpo, por ejemplo, al producir una suspensión homogénea de células individuales, preservar la integridad celular y prevenir la formación de espuma y la desnaturalización de proteínas.

En algunas realizaciones, el rotor gira entre aproximadamente 500 RPM y aproximadamente 8000 RPM. En algunas realizaciones, el rotor gira entre aproximadamente 1000 y 6000 RPM. En algunas realizaciones, el rotor gira entre aproximadamente 1100 y 1500 RPM.

La disrupción mecánica utilizada de acuerdo con la presente invención no necesita digestión enzimática en ninguna etapa de la recolección y manipulación del tejido y las células.

En algunas realizaciones, la disrupción mecánica se lleva a cabo en la solución de lipoaspirado sin la adición de una solución de lavado. De acuerdo con tales realizaciones, una vez completada la disrupción mecánica, el lipoaspirado roto mecánicamente puede lavarse, al menos una vez, como se describe en esta invención.

En otras realizaciones, antes de la disrupción mecánica del lipoaspirado recolectado, el lipoaspirado se lava extensamente (p. ej., para eliminar la sangre contaminante) usando una solución de lavado (p. ej., solución salina o cualquier otra solución fisiológica adecuada a una temperatura de entre aproximadamente 4 grados Celsius y entre aproximadamente 37 grados Celsius) transferidos a través de al menos una entrada en la tapa de cierre del contenedor, en el que después de cada etapa de lavado, el contenedor se transfiere a una centrífuga adaptada para recibir el contenedor y se centrifuga a una fuerza suficiente y durante un período de tiempo suficiente para formar un sobrenadante y un sedimento celular (por ejemplo, blando) en la parte inferior (cóncava) del contenedor. Según tales realizaciones, la disrupción mecánica se lleva a cabo en la solución de lavado y puede llevarse a cabo una vez o repetirse al menos una vez más después de cada etapa de lavado.

Después de la disrupción mecánica, el lipoaspirado se puede lavar de nuevo, al menos una vez, como se describe en esta invención.

En algunas realizaciones, la solución de lavado se canaliza (p. ej., de forma continua) al contenedor durante la interrupción mecánica del lipoaspirado recogido.

En otras realizaciones, la solución de lavado se canaliza al contenedor antes de que el lipoaspirado se succione al contenedor y, a continuación, sigue cada etapa de centrifugación.

Como reconocerán fácilmente los expertos en la técnica, cada etapa de lavado descrita en esta invención va seguida de un centrifugado en el que, inmediatamente después del centrifugado, la solución de lavado (es decir, el sobrenadante) se aspira suavemente. El lavado puede repetirse una o más veces, realizándose la centrifugación después de cada etapa de lavado y extrayéndose la solución de lavado del recipiente e introduciendo una nueva solución.

En algunas realizaciones, la solución de lavado contiene además (por ejemplo, con el fin de enriquecer una fracción celular específica y/o para ayudar al fraccionamiento de los adipocitos) al menos un reactivo adicional. Algunos ejemplos no limitantes de tales reactivos incluyen un anticuerpo específico de células, un agente amortiguador, un gradiente de densidad basado en azúcar (p. ej., sacarosa, manosa, ficol, sulfato de dextrano), un gradiente de densidad sin azúcar (p. ej., percoll, percoll plus, Histopaque®) una solución de clasificación celular magnética mediada por anticuerpos, una solución de clasificación celular mediada por anticuerpos no magnéticos (no magnética).

De acuerdo con la presente invención, la centrifugación actúa para separar las células (por ejemplo, la fracción vascular del estroma) de la población flotante de células (por ejemplo, los adipocitos maduros).

En algunas realizaciones, el contenedor se puede centrifugar (por ejemplo, para separar las células SVF de los adipocitos flotantes) entre aproximadamente 200 × g y entre aproximadamente 1500 × g, o entre aproximadamente 250 × g y entre aproximadamente 500 × g.

Después de cada centrifugación del contenedor, el contenedor se saca de la centrífuga y el sedimento celular se aspira suavemente utilizando una aguja de aspiración o cualquier medio mecánico adecuado para extraer el sedimento del interior del recipiente.

En algunas realizaciones, después de al menos una etapa de lavado, el sedimento celular se aspira suavemente después de que se produzca la separación de fases sin realizar la centrifugación.

En algunas realizaciones, el sedimento celular se transfiere a través de un colador (por ejemplo, que tiene un tamaño de malla de entre aproximadamente 40 µM y entre aproximadamente 200 µM) antes de contar las células nucleadas.

En algunas realizaciones, el sedimento celular se procesa adicionalmente para enriquecer una población celular deseada específica (por ejemplo, utilizando técnicas basadas en clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) o cualquier otro procedimiento de enriquecimiento celular adecuado conocido por el artesiano experto).

El artesiano experto reconocería fácilmente que cualquiera de los procedimientos llevados a cabo durante el procedimiento de disrupción mecánica (por ejemplo, disrupción, lavado, centrifugación) puede llevarse a cabo entre aproximadamente 4 grados centígrados y entre aproximadamente 37 grados centígrados dependiendo de varios parámetros asociados con el procedimiento de la invención (por ejemplo, tipo de tejido adiposo, velocidad del rotor, tipo de rotor, proporción de solución a tejido adiposo, etc.) que son conocidos por el artesiano experto.

En algunas realizaciones, el procedimiento de la invención implica la adición de solución salina (por ejemplo, precalentada a aproximadamente 37 grados Celsius) al lipoaspirado, después de lo cual se lleva a cabo una disrupción mecánica de la mezcla de grasa/solución salina (por ejemplo, a temperatura ambiente) y la grasa triturada mecánicamente (con solución salina) se centrifuga y se transfiere a través de un colador o filtro.

Por lo tanto, en algunos aspectos, la invención proporciona un contenedor o un recipiente como se describe en esta invención.

En otro de sus aspectos, la presente invención proporciona un procedimiento para enriquecer una población celular a partir de un tejido adiposo de mamífero, comprendiendo el procedimiento:

- aspirar tejido adiposo en un conjunto contenedor (p. ej., usando un tubo de aspiración que tiene un extremo proximal conectado de forma desmontable a la unidad contenedora y un extremo distal insertado en al menos una cavidad del cuerpo de un mamífero);

- romper/interrumpir mecánicamente el tejido adiposo en el conjunto del contenedor (p. ej., usando un dispositivo mecánico de disrupción de tejido para obtener una suspensión celular, en el que la disrupción no utiliza una enzima);

- lavar la suspensión de células dentro del conjunto del contenedor; y

- transferir el conjunto del contenedor a una centrífuga y centrifugar el conjunto del contenedor para obtener de ese modo un sedimento celular.

En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además una etapa de extraer el sedimento celular del interior del conjunto contenedor para obtener una población celular enriquecida.

En algunas realizaciones, la población de células enriquecidas obtenida es una fracción de células SVF caracterizada por al menos una de las siguientes características:

- El SVF es identificable fenotípicamente por tener un porcentaje de células CD45+ de entre aproximadamente el 40% y entre aproximadamente el 91%;

- El SVF es fenotípicamente identificable por tener un porcentaje de entre alrededor de 5 y alrededor de 50 de CD45(-) CD31(-) CD34(+) y entre alrededor de 3 y entre alrededor de 40 de células CD45(-) CD73(+) CD29(+);

- El SVF es identificable fenotípicamente por tener un porcentaje de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 40 de células CD45(-) CD31(-) CD34(+) y entre aproximadamente 6 y aproximadamente 30 de células CD45(-) CD73(+) CD29(+) ;

- El SVF es fenotípicamente identificable por tener un porcentaje de entre aproximadamente 2 y entre aproximadamente 15 de CD45(-) CD31(-) puerta de monocitos (+) células CD34 (+);

- El SVF es fenotípicamente identificable por tener un porcentaje de entre aproximadamente 4 y entre aproximadamente 10 de CD45(-) CD31(-) puerta de monocitos (+) células CD34 (+);

- El rendimiento de SFV de células nucleadas es al menos 3 veces mayor que el obtenido en el procedimiento de lavado solamente descrito en esta invención;

- La cantidad de células por 1 ml de lipoaspiradas después del cultivo celular durante un período de entre 7 y 14 días es superior en al menos 15 veces en comparación con la obtenida en el procedimiento de solo lavado, como se describe más adelante;

- El SVF contiene un mayor porcentaje de células madre progenitoras mesenquimales en comparación con el obtenido en el procedimiento de lavado único, medido por la capacidad de diferenciación de las células y por marcadores específicos de células madre y propiedades físicas identificadas por citometría de flujo.

- El SVF es inyectable (por ejemplo, en un tejido de mamífero) a través de agujas muy pequeñas que tienen un número de calibre de entre calibre 33 y calibre 7.

En otras realizaciones, el procedimiento comprende una etapa de aislar la grasa de la que se obtuvo la fracción SVF y usarla en un procedimiento de utilidad cosmética o terapéutica.

La invención proporciona además una fracción SVF caracterizada por cualquiera de:

- El SVF es identificable fenotípicamente por tener un porcentaje de células CD45+ de entre aproximadamente el 40% y entre aproximadamente el 91%;

- El SVF es fenotípicamente identificable por tener un porcentaje de entre alrededor de 5 y alrededor de 50 de CD45(-) CD31(-) CD34(+) y entre alrededor de 3 y entre alrededor de 40 de células CD45(-) CD73(+) CD29(+);

- El SVF es identificable fenotípicamente por tener un porcentaje de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 40 de células CD45(-) CD31(-) CD34(+) y entre aproximadamente 6 y aproximadamente 30 de células CD45(-) CD73(+) CD29(+);

- El SVF es fenotípicamente identificable por tener un porcentaje de entre aproximadamente 2 y entre aproximadamente 15 de CD45(-) CD31(-) puerta de monocitos (+) células CD34 (+);

- El SVF es fenotípicamente identificable por tener un porcentaje de entre aproximadamente 4 y entre aproximadamente 10 de CD45(-) CD31(-) puerta de monocitos (+)células CD34 (+);

- El rendimiento de SFV de células nucleadas es al menos 3 veces mayor que el obtenido en el procedimiento de lavado solamente descrito en esta invención;

- La cantidad de células por 1 ml de lipoaspirado después del cultivo celular durante un período de entre 7 y 14 días es al menos 15 veces mayor que la obtenida en el procedimiento de lavado únicamente, como se describe más adelante;

- El SVF contiene un mayor porcentaje de células madre progenitoras mesenquimales en comparación con el obtenido en el procedimiento de lavado único, medido por la capacidad de diferenciación de las células y por marcadores específicos de células madre y propiedades físicas identificadas por citometría de flujo.

- El SVF es inyectable (por ejemplo, en un tejido de mamífero) a través de agujas muy pequeñas que tienen un número de calibre de entre calibre 33 y calibre 7.

En algunas realizaciones, la fracción SVF se produce según un procedimiento de la invención.

En algunas realizaciones, la fracción SVF, ya sea producida o no por un procedimiento de la invención, puede usarse en medicina.

La invención proporciona además un proceso y un dispositivo para el aislamiento mecánico de células de la fracción vascular del estroma (SVF) mediante filtración a presión. El dispositivo comprende dos contenedores extensibles, separables por un obturador que tiene una posición cerrada y una posición abierta. Cuando está en una posición cerrada, se transfiere un lipoaspirado a un recipiente superior y se deja que se asiente.

Posteriormente, el obturador se gira a la posición "encendido" y se permite que la grasa pase a través de la malla metálica o filtro que separa los dos contenedores, induciendo presión hacia abajo en el émbolo.

Una vez que toda la grasa y el fluido pasaron a través de la malla hacia el contenedor inferior, el obturador se gira a una posición cerrada. Después de separar el contenedor inferior, la grasa permanece estéril porque el extremo superior está cerrado por el obturador.

El contenedor inferior separado se centrifuga y las células SVF se concentran en el fondo del contenedor y pueden separarse del mismo.

La invención proporciona además una fracción SVF aislada de células de tejido adiposo, caracterizada la fracción por al menos una de las siguientes características:

1. Tener un rendimiento de células SVF similar al obtenido por el aislamiento de colagenasa (p. ej., colagenasa tipo I);

2. Tener una capacidad de expansión de cultivo similar a la obtenida por el procedimiento de aislamiento de colagenasa después de 7 y 14 días de cultivo;

3. Tener una capacidad de diferenciación tanto para el hueso como para la grasa;

4. Tener un fenotipo de expresión de marcador de superficie de células madre mesenquimales después del paso 1 en cultivo;

5. Tener entre alrededor del 4% y entre alrededor del 10% de la puerta de monocitos CD45(-) de células (+) CD34 (+).

En todavía otro de sus aspectos, la presente invención proporciona una fracción de SVF aislada, obtenida por el procedimiento y dispositivo de la invención, para uso en medicina regenerativa y en la cicatrización de heridas; para la regeneración y el reemplazo de tejidos (p. ej., grasa, hueso, cartílago, piel, corazón, hígado, riñón, cerebro) (p. ej., después de un traumatismo o en cirugía estética) y con fines de inmunorregulación (p. ej., en la enfermedad de injerto contra huésped y otras enfermedades autoinmunes y para la prevención del rechazo de trasplantes).

En algunas realizaciones, la fracción de SVF aislada se puede usar en combinación con grasa autóloga para mejorar la supervivencia de la grasa y la regeneración de los vasos sanguíneos.

De acuerdo con la presente invención, la fracción de SVF aislada definida en esta invención puede usarse inmediatamente después de su aislamiento o después del cultivo (p. ej., como células madre mesenquimatosas derivadas de tejido adiposo).

En otro de sus aspectos, la presente invención proporciona el uso de una fracción aislada de SVF, como se describe en esta invención, en medicina regenerativa o en la cicatrización de heridas; para la regeneración y el reemplazo de tejidos (por ejemplo, grasa, hueso, cartílago, piel, corazón, hígado, riñón, cerebro) (por ejemplo, después de un traumatismo o en cirugía estética), con fines de inmunorregulación (por ejemplo, en la enfermedad de injerto contra huésped y otras enfermedades autoinmunes y para la prevención del rechazo de trasplantes), o para cualquier otro propósito medicinal que pueda ser conocido por un profesional o facultativo médico.

La invención proporciona además un procedimiento para usar una fracción SVF según la invención, comprendiendo el procedimiento una etapa de obtener una fracción SVF como se describe en esta invención y usar dicha fracción como se conoce en la técnica. En algunas realizaciones, el procedimiento se selecciona de procedimientos de medicina regenerativa, procedimientos para inducir la cicatrización de heridas; procedimientos para la regeneración y el reemplazo de tejidos (p. ej., grasa, hueso, cartílago, piel, corazón, hígado, riñón, cerebro) (p. ej., después de un trauma o en cirugía estética) y procedimientos para la inmunorregulación (p. ej., en la enfermedad de injerto contra huésped y otras enfermedades autoinmunes y para la prevención del rechazo de trasplantes).

Breve descripción de los dibujos

Para comprender mejor el tema que se describe en esta invención y ejemplificar cómo se puede llevar a cabo en la práctica, ahora se describirán realizaciones, solo a modo de ejemplo no limitativo, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La **Fig. 1** representa un dispositivo para recolectar adipocitos según algunas realizaciones de la invención;

La **Fig. 2** representa un dispositivo para aislar células SVF según algunas realizaciones de la invención;

La **Fig. 3** representa un dispositivo para aislar células SVF según algunas realizaciones de la invención;

Las **Fig. 4A-B** representan células SVF aisladas mecánica y enzimáticamente que muestran un potencial de diferenciación de grasa (**Fig. 4A**) y hueso (**Fig. 4B**) similar. Las células madre derivadas de tejido adiposo aisladas de grasa mediante técnicas enzimáticas, mecánicas o de lavado se incubaron en un medio de diferenciación ósea o con un medio de diferenciación de grasa o con un medio de control durante 3 semanas. A continuación, las células se tiñeron para hueso con rojo de alizarina o para grasa con aceite rojo O. humano. Se muestra la diferenciación de ASC en hueso y grasa.

Las **Fig. 5A-B** representan SVF aislado por digestión enzimática o disrupción mecánica de la grasa que muestra una población enriquecida de células CD45 (-) en la "puerta de monocitos". La **Fig. 5A** representa todas las células nucleadas y la **Fig. 5B** representa sólo células CD45(-).

La **Fig. 6** representa un dispositivo para el aislamiento mecánico de células de la fracción vascular del estroma (SVF) mediante filtración a presión. El dispositivo está construido con dos contenedores extensibles designados 1 y 2.

La **Fig. 7** representa un dispositivo para el aislamiento mecánico de células de la fracción vascular del estroma (SVF) mediante filtración a presión en el que los dos contenedores están separados por un obturador que tiene una posición cerrada y otra abierta.

Descripción detallada de las realizaciones

La presente invención está dirigida a un procedimiento mecánico para aislar adipocitos del tejido adiposo, utilizando una combinación de disrupción mecánica, lavado y centrifugación para obtener una población enriquecida de fracción vascular estromal.

Para tener una mejor comprensión de la invención, el lector se dirige ahora a las figuras.

Se hace referencia primero a la **Fig. 1** que proporciona una realización ejemplar de un dispositivo **10** que tiene una entrada **1** que comunica con el interior de dicho dispositivo y adaptada para encajar de manera sellable y desmontable una cánula para introducir células en el dispositivo, una tapa de cierre sellable y desmontable **3,** un montaje proximal **4** para un eje de rotor **5** y un rotor **7** adjunta a la misma.

La tapa de cierre **3** del dispositivo **10** incluye además dos entradas adicionales **9** y **11** para dejar entrar una solución de lavado (por ejemplo, solución salina normal, solución de Ringer, solución de Ringer con lactato, solución salina equilibrada de Hanks y cualquier combinación de las mismas) a través de cánulas insertadas a través del mismo. El nivel de la solución, el líquido o la grasa generalmente se mantiene en el nivel o por debajo **13.**

Volviendo al dispositivo **100**, se muestra en la **Fig. 2**, un actuador eléctrico externo a la tapa de cierre **16** se representa, estando dicho actuador conectado de forma desmontable por un eje **21** al rotor a través de una apertura sellable **16a** en la tapa de cierre. Las características **25, 27, 15, 16** y **29** son equivalentes a las características **9, 11, 1, 3** y **13** mostradas en la **Fig. 1,** respectivamente.

Se hace referencia adicional al dispositivo **200,** mostrado en la **Fig. 3,** que representa además la base cóncava **45** de dicho dispositivo adaptado para la recogida de las células. Las características **39, 41, 31,** y **43** son equivalentes a las características **9, 11, 1**, y **13** mostradas en la **Fig. 1,** respectivamente.

Se aprecia que el dispositivo **10, 100** o **200** puede ser de forma cilíndrica, rectangular, trapezoidal y cualquier otra geometría adecuada conocida en la técnica y puede estar hecho de cualquier material inerte, transparente u opaco, estable y sellable (por ejemplo, al vacío y utilizando una tapa de cierre sellada herméticamente) adecuado para recolectar y mantener la esterilidad y viabilidad de las mismas, tal como un polímero termoplástico (p. ej., polipropileno), un polímero aromático sintético (poliestireno) y un metal (p. ej., aluminio).

Independientemente del material y la forma del dispositivo, el volumen del dispositivo puede estar entre 0,05 litros y 2 litros.

El actuador puede ser accionado por motor (por ejemplo, eléctrico) o accionado manualmente.

La cánula puede estar hecha de cualquier material flexible no reactivo (por ejemplo, silicona, cloruro de polivinilo).

Ejemplo 1:

Se aisló la grasa de los muslos de una mujer de 50 años mediante liposucción. El índice de masa corporal (IMC) más alto medido previamente fue 52,7 y se midió un IMC estable de 33,9 durante un período de 5 años. La grasa se mantuvo a 4 grados centígrados durante la noche y se procesó a la mañana siguiente.

Aislamiento de células de grasa por colagenasa I (sistema comparativo):

La grasa lipoaspirada (25 ml) se lavó agregando 25 ml de solución salina, seguido de una mezcla completa y centrifugación a 260 × g durante 5 minutos. La grasa lavada (en porciones de 10 ml) se mezcló con 0,75 ml de 5 mg/ml de colagenasa I suspendida en DMEM. La mezcla de lipoaspirado/colagenasa se hizo rotar durante 1 hora a 37 grados Celsius. Después de la digestión enzimática, la mezcla de grasa/colagenasa se neutralizó con 1/1 de volumen de DMEM con FCS al 10%, se transfirió a través de un filtro de 100 µM y se centrifugó durante 15 minutos a 328 × g. Las células de la fracción vascular del estroma (SVF) sedimentadas se separaron de los adipocitos flotantes, se transfirieron a través de un filtro de 100 µM y las células nucleadas se contaron usando ácido acético al 3% con azul de metileno (Tecnologías de células madre, Vancouver, Canadá).

Células de aislamiento mecánico de la grasa:

La grasa lipoaspirada (100 ml) se lavó mediante la adición de 100 ml de solución salina, seguido de una mezcla minuciosa y una centrifugación a 328 × g durante 10 minutos. La grasa lavada (100 ml) se introdujo en un procesador de alimentos ATL-604 (Gold-line, Israel) y se añadieron 100 ml de solución salina. La mezcla de grasa/solución salina

se rompió mecánicamente a 1300 RPM durante 15 segundos a temperatura ambiente. La grasa rota mecánicamente (con solución salina) se centrifugó a 328 × g durante 10 minutos. Las células SVF sedimentadas se separaron de los adipocitos flotantes y se transfirieron a través de un filtro de 100 µM. Las células nucleadas se contaron utilizando ácido acético al 3% con azul de metileno (tecnologías de células madre, Vancouver, Canadá).

Aislamiento de células de la grasa mediante mezcla y centrifugación completas:

La grasa lipoaspirada (25 ml) se lavó mediante la adición de 25 ml de solución salina, seguido de una mezcla completa y una centrifugación a 328 × g durante 10 minutos. Las células SVF sedimentadas se separaron de los adipocitos flotantes. Las células nucleadas se contaron utilizando ácido acético al 3% con azul de metileno (tecnologías de células madre, Vancouver, Canadá).

Cultivo de células:

Después de su aislamiento y recuento celular, las células SVF de los 3 protocolos de aislamiento (colagenasa, mecánico y lavado) se sembraron a una concentración de 5x105 células/pocillo de una placa de 6 pocillos y se cultivaron durante 7 días. Las células se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco con alto contenido de glucosa (DMEM; Gibco, Paisley, Escocia, Reino Unido) suplementado con FCS al 10% (Thermo Scientific HyClone, Tauranaga, Nueva Zelanda), 60 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 50 µg/mL kanamicina, piruvato de sodio (1 mM), L-glutamina (2 mM) y aminoácidos no esenciales. Los cultivos se propagaron a 37 °C en un 10% de atmósfera de CO_2. El medio se cambió 72 horas después de la siembra de células. Después de siete días de cultivo, las células se recogieron con tripsina y se contaron.

Resultados:

Como puede verse en la **Tabla 1**, se aislaron cantidades similares de células nucleadas de la grasa utilizando colagenasa y procedimientos de aislamiento celular mecánico. A pesar de un lavado vigoroso, el aislamiento celular sin disrupción enzimática o mecánica de la grasa dio como resultado cantidades significativamente menores de células.

Además, el cultivo durante 7 días de células SVF en cantidades idénticas dio como resultado un número significativamente mayor de células estromales cuando se usaron colagenasa y células aisladas mecánicamente en comparación con las células que se aislaron solo mediante lavado (**Tabla 1**). Es importante destacar que, de manera similar a un informe anterior [**8**] el rendimiento celular por 1 ml de grasa después del cultivo fue 30 veces mayor en las células aisladas enzimáticamente en comparación con las células que se aislaron mediante lavado únicamente (1,08 × 105 células/1 ml de grasa (enzimática) y 0,036 × 105 células/1 ml de grasa (lavado). Por el contrario, el rendimiento celular tras el aislamiento celular mecánico y el cultivo fue similar al obtenido tras el aislamiento enzimático (1,08 x 105 células/1 ml de grasa (enzimático) y 0,656 x 105 células/1 ml de grasa (mecánico).

Tabla 1

Procedimiento de aislamiento	**Células nucleadas por 1 ml de grasa (lipoaspirado)**	**Células muertas (porcentaje)**	**Células/pocillo de una placa de 6 pocillos (después de 7 días en cultivo)**	**Células cultivadas por 1 ml de grasa (después de 7 días en cultivo)**
Colagenasa	5.4×10^5	2,5%	1×10^5	$1,08\times10^5$
Disrupción mecánica	$4,1\times10^5$	0,9%	$0,8\times10^5$	$0,656\times10^5$
Lavado	$1,4\times10^5$	0,2%	$0,13\times10^5$	$0,036\times10^5$

Ejemplo 2:

Se aisló la grasa de la pared abdominal, las caderas y la espalda de un hombre de 46 años mediante liposucción. El IMC más alto medido previamente fue 62 y, a continuación, se midió para tener un IMC estable = 31 durante un período de más de un año. La grasa se mantuvo a 4 grados durante la noche y se procesó a la mañana siguiente.

Aislamiento de células de grasa por colagenasa I (sistema comparativo):

La grasa lipoaspirada (80 ml) se lavó mediante la adición de 80 ml de solución salina, seguido de una mezcla completa y una centrifugación a 260 × g durante 5 minutos. La grasa lavada (en porciones de 10 ml) se mezcló con 0,75 ml de 5 mg/ml de colagenasa I suspendida en DMEM. La mezcla de lipoaspirado/colagenasa se hizo girar durante 1 hora a 37 grados. Después de la digestión enzimática, la mezcla de grasa/colagenasa se neutralizó con 1/1 volumen de DMEM con FCS al 10%, seguido de 15 minutos de centrifugación en 328 × g. Las células de la fracción vascular del estroma (SVF) sedimentadas se separaron de los adipocitos flotantes transferidos a través de un filtro de 100 µM y

las células nucleadas se contaron usando ácido acético al 3% con azul de metileno (tecnologías de células madre, Vancouver, Canadá).

Células de aislamiento mecánico de la grasa:

La grasa lipoaspirada (25 ml) se lavó mediante la adición de 25 ml de solución salina, seguido de una mezcla completa y una centrifugación de 260 × g durante 5 minutos. La grasa lavada (25 ml) se introdujo en un procesador de alimentos Philips HR1611 y se añadieron 25 ml de solución salina. La mezcla de grasa/solución salina se rompió mecánicamente a 5240 RPM durante 8 segundos a temperatura ambiente. La grasa rota mecánicamente (con solución salina) se centrifugó a 328 × g durante 10 minutos. Las células SVF sedimentadas se separaron de los adipocitos flotantes y se transfirieron a través de un filtro de 100 µM. Las células nucleadas se contaron utilizando ácido acético al 3% con azul de metileno (tecnologías de células madre, Vancouver, Canadá).

Cultivo de células:

Después de su aislamiento y recuento celular, las células SVF de los dos protocolos de aislamiento (colagenasa y mecánico) se sembraron a una concentración de 5×10^5 células/placa de 6 cm y cultivadas durante 14 días. Las células se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco con alto contenido de glucosa (DMEM; Gibco, Paisley, Escocia, Reino Unido) suplementado con FCS al 10% (Thermo Scientific HyClone, Tauranaga, Nueva Zelanda), 60 µg/1 ml de penicilina, 100 µg/1 ml de estreptomicina, 50 µg/1mL kanamicina, piruvato de sodio (1 mM), L-glutamina (2 mM) y aminoácidos no esenciales. Los cultivos se propagaron a 37 °C en un 10% de atmósfera de CO_2. El medio se cambió 72 horas después de la siembra de células y, a continuación, cada 3 días. Después de 14 días en cultivo, las células se recogieron con tripsina y se contaron.

Tinción de marcador de superficie celular:

Después de la recolección de células, las células se tiñeron con un panel de marcadores celulares que incluyen: CD45 antihumano (BD horizon), CD31 antihumano (eBioscience), CD105 antihumano, CD34 antihumano, CD29 antihumano, CD235a antihumano, CD73 antihumano (Biolegend, San Diego, CA, EE. UU.) y colorante vivo/muerto-vívido (Sondas moleculares Invitrogen, Eugene, OR, EE. UU.). Las células marcadas se analizaron utilizando un citómetro de flujo BD FACS Canto II (Becton Dickinson, San José, CA, EE. UU.). El análisis de datos se realizó con el software flow-Jo (Tree star, Ashland, OR, EE. UU.).

Resultados:

De acuerdo con el ejemplo 2, se aislaron cantidades similares de células de la grasa usando digestión con colagenasa o aislamiento mecánico (**Tabla 2**).

Además, el cultivo de células SVF durante 14 días resultó en la expansión de un número similar de células del estroma cuando se usaron colagenasa y células aisladas mecánicamente (**Tabla 2**).

La evaluación del patrón de expresión del marcador de superficie de células estromales cultivadas en el paso 0 después de 14 días de expansión tisular reveló el patrón de expresión esperado en las células aisladas enzimática y mecánicamente. El patrón incluía un porcentaje insignificante de células hematopoyéticas CD45 (+) y una alta expresión de marcadores de células madre mesengimales (100% de expresión de CD73 y > 90% de expresión de CD29 y CD105) en la mayoría de las células cultivadas (**Tabla 3**).

Por lo tanto, el aislamiento mecánico de las células SVF de la grasa permite la extracción de grandes cantidades de células nucleadas de manera similar a la extracción enzimática. Además, las células aisladas mecánicamente albergan propiedades similares a las células aisladas enzimáticamente, ya que producen cantidades similares de células después de 14 días de propagación en cultivo con un patrón de expresión de marcador de superficie similar.

Tabla 2

Procedimiento de aislamiento	**Células nucleadas/1ml lipoaspirado**	**Células muertas (porcentaje)**	**Células/placa de 6 cm (después de 14 días en cultivo)**
Colagenasa	$2{,}3\times10^5$	17%	$6{,}7\times10^5$
Interrupción mecánica	$1{,}5\times10^5$	3%	$5{,}8\times10^5$

Tabla 3

Expresión de marcadores de superficie	Disociación de colagenasa	Disociación mecánica
	P0	P0
CD45 (+)	0,1%	0,4%
CD31(+) CD34(-)	1%	0,6%
CD31(-) CD34(+)	0,5%	0,9%
CD29(+) CD105(+)	95,6%	93%
CD73 (+)	100%	100%

Ejemplo 3:

Se aisló la grasa de la pared abdominal y las caderas de una mujer de 60 años mediante liposucción. El IMC más alto medido previamente fue 40 y fue seguido por una medición de un IMC estable de 29 durante un período de más de un año. La grasa se mantuvo a 4 grados Celsius durante la noche y se procesó a la mañana siguiente.

Las células SVF se aislaron de grasa Lipoaspirate como se describió previamente en el ejemplo 2 por disociación mecánica o por lavado. Las células aisladas se tiñeron con los marcadores indicados y se determinó la proporción de células positivas para cada marcador a partir de la población total, excluyendo las células muertas y los eritrocitos.

Resultados:

Como se puede observar, la proporción de células hematopoyéticas CD45(+) fue mucho mayor en las células que se aislaron por lavado (91%) en comparación con las células aisladas mecánicamente (29%) (**Tabla 4**). La mayor proporción de CD45(+) en las células que se aislaron mediante lavado está de acuerdo con un informe anterior que encontró que el 81% de las células CD45(+) usaban protocolos de extracción similares. A pesar de la dificultad para identificar progenitores de células madre mesenquimales mediante marcadores de superficie específicos [**12**], generalmente se acepta que estas células no proceden de la población CD45(+). Por lo tanto, el aumento de la proporción de células CD45 (+) en las células aisladas por lavado puede explicar su pobre capacidad de expansión del cultivo en comparación con las células aisladas tanto mecánica como enzimáticamente (**Tabla 1**).

Tabla 4

	Disociación mecánica	Lavado
CD45 (+)	29%	91%
CD31 (+)	8,2%	19%
CD34 (+)	8,2%	9%

Ejemplo 4:

Potencial de diferenciación:

Se examinó el potencial multipotente de las células madre derivadas de tejido adiposo aisladas mediante técnicas enzimáticas, mecánicas y de lavado. Como puede verse en la **Fig. 4,** las células cultivadas que se aislaron mediante aislamientos mecánicos y enzimáticos demostraron un potencial de diferenciación similar para ambos grasa (**Fig. 4A**) y hueso (**Fig. 4B**). Las células aisladas por lavado mostraron un potencial de diferenciación de grasa reducido en comparación con las células aisladas mecánica y enzimáticamente. Por lo tanto, las células aisladas mecánicamente demuestran propiedades multipotentes comparables a las células aisladas enzimáticamente y una multipotencia superior en comparación con las células aisladas mediante lavado.

Además, se aisló grasa subcutánea del estómago de una mujer de 58 años mediante liposucción. El índice de masa corporal (IMC) más alto medido previamente y de un IMC estable se midió durante un período de 5 años. La grasa se mantuvo a 4 grados centígrados durante la noche y se procesó a la mañana siguiente.

Aislamiento de células de grasa por colagenasa I (sistema comparativo):

El lipoaspirado de grasa (25 ml) se mezcló con 0,75 ml de 5 mg/ml de colagenasa I suspendida en DMEM. La mezcla de lipoaspirado/colagenasa se hizo rotar durante 1 hora a 37 grados Celsius. Después de la digestión enzimática, la mezcla de grasa/colagenasa se neutralizó con 1/1 volumen de DMEM con FCS al 10%, se transfirió a través de un filtro de 100 µM y se centrifugó durante 15 minutos a 400 × g. Las células de la fracción vascular del estroma (SVF) sedimentadas se separaron de los adipocitos flotantes, se transfirieron a través de un filtro de 100 µM y las células

nucleadas se contaron usando ácido acético al 3% con azul de metileno (tecnologías de células madre, Vancouver, Canadá).

Células de aislamiento mecánico de la grasa:

La grasa lipoaspirada (100 ml), calentada a 37 grados Celsius, se introdujo en un procesador de alimentos ATL-604 (Gold-line, Israel) y se añadieron 100 ml de solución salina que se precalentó a 37 grados Celsius. La mezcla de grasa/solución salina se rompió mecánicamente a 1300 RPM durante 15 segundos a temperatura ambiente. La grasa rota mecánicamente (con solución salina) se centrifugó a 400 × g durante 15 minutos. Las células SVF sedimentadas se separaron de los adipocitos flotantes y se transfirieron a través de un filtro de 100 µM. Las células nucleadas se contaron utilizando ácido acético al 3% con azul de metileno (tecnologías de células madre, Vancouver, Canadá).

Aislamiento de células de la grasa mediante mezclado y centrifugación completas:

La grasa lipoaspirada (10 ml), calentada a 37 grados Celsius, se lavó mediante la adición de 25 ml de solución salina calentada a 37 grados Celsius, seguida de un mezclado completo y una centrifugación a 400 × g durante 15 minutos. Las células SVF sedimentadas se separaron de los adipocitos flotantes. Las células nucleadas se contaron utilizando ácido acético al 3% con azul de metileno (tecnologías de células madre, Vancouver, Canadá).

Cultivo de células:

Después de su aislamiento y recuento celular, las células SVF de los 3 protocolos de aislamiento (colagenasa, mecánico y lavado) se sembraron a una concentración de $0,075X10^6$ células/pocillo de una placa de 6 pocillos y se cultivaron durante 7 días. Las células se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco con alto contenido de glucosa (DMEM; Gibco, Paisley, Escocia, Reino Unido) suplementado con FCS al 10% (Thermo Scientific HyClone, Tauranaga, Nueva Zelanda), 60 µg/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 50 µg/mL kanamicina, piruvato de sodio (1 mM), L-glutamina (2 mM) y aminoácidos no esenciales. Los cultivos se propagaron a 37 °C en una atmósfera de CO2 al 10%. El medio se cambió 72 horas después de la siembra de células. Después de siete días en cultivo, las células se recogieron con tripsina y se contaron.

Tinción de marcador de superficie celular:

Después de la recolección de células, las células se tiñeron con un panel de marcadores celulares que incluyen: CD45 antihumano (horizonte BD), CD31 antihumano (eBioscience), CD105 antihumano, CD34 antihumano, CD29 antihumano, CD235a antihumano, CD73 antihumano (Biolegend, San Diego, CA, EE. UU.) y colorante vivo/muerto-vívido (Sondas moleculares de Invitrogen, Eugene, OR, EE. UU.). Las células marcadas se analizaron utilizando un citómetro de flujo BD FACS Canto II (Becton Dickinson, San José, CA, EE. UU.). El análisis de datos se realizó con el software flow-Jo (Tree star, Ashland, OR, EE. UU.). La estrategia de selección gradual aisló una población distinta que contenía solo singletes y células vivas (determinada por una tinción ViViD baja (un tinte de viabilidad reactivo con amina) mientras se descartaban los glóbulos rojos (tinción específica de RBC). La selección de células CD45 (-) se realizó a continuación para eliminar células inmunes positivas CD45. Se realizó una selección adicional de células negativas para CD45 para definir las poblaciones positivas para CD31, CD34, CD73 y CD29. Es ampliamente aceptado que trazar datos de dispersión frontal (FSC) contra datos de dispersión lateral puede revelar información morfológica sobre una muestra de sangre periférica. Los datos de FSC trazados en el eje x permiten la distinción de tamaño con los linfocitos más pequeños que aparecen en el extremo izquierdo, mientras que los datos de SSC (eje y) hacen posible la diferenciación entre los monocitos y neutrófilos de tamaño comparable en función de la granularidad celular. Usando los mismos parámetros y sangre completa como control positivo, se identificó una población distinta dentro del SVF que tenía las mismas características que los monocitos. Esta área se denominó la puerta de los monocitos. Dado que los monocitos tienen un diámetro aproximado de 15 a 25 µm, lo más probable es que la población de SVF dentro de esta puerta sea del mismo intervalo de tamaño.

Como puede verse en la **Tabla 5** se aislaron cantidades similares de células nucleadas de la grasa utilizando procedimientos de aislamiento celular enzimático y mecánico. A pesar de un lavado vigoroso, el aislamiento celular sin disrupción enzimática o mecánica de la grasa dio como resultado cantidades significativamente menores de células.

Además, la siembra de cantidades idénticas de células SVF en el día 0 dio como resultado un número significativamente mayor de células estromales derivadas de tejido adiposo después de 7 días de cultivo cuando se usaron células aisladas enzimáticas y mecánicas en comparación con las células que se aislaron solo mediante lavado (**Tabla 5**).

Tabla 5

Procedimiento de aislamiento	Células nucleadas por 1 ml de grasa (lipoaspirado)	Células muertas (porcentaje)	Células/pocillo de una placa de 6 pocillos (después de 7 días en cultivo)	Células cultivadas por 1 ml de grasa (después de 7 días en cultivo)
Enzimático	$2,3\times10^5$	10%	$1,33\times10^5$	$4,07\times10^5$
Interrupción mecánica	$1,33\times10^5$	15%	$1,56\times10^5$	$2,76\times10^5$
Lavado	$0,19\times10^5$	0,1%	$0,36\times10^5$	$0,09\times10^5$

Es importante destacar que el rendimiento de células por 1 ml de grasa después del cultivo fue 45 y 30 veces mayor en células aisladas enzimáticamente y mecánicamente en comparación con las células que se aislaron solo mediante lavado (**Tabla 5**).

La siembra de cantidades idénticas de células SVF dio como resultado un rendimiento significativamente mayor de células estromales después de 7 días de cultivo cuando se usaron células SVF aisladas enzimáticas y mecánicas en comparación con las células que se aislaron solo mediante lavado. Esto indica que se aisló una composición diferente de poblaciones celulares mediante las diferentes técnicas de aislamiento celular.

Tabla 6:

Expresión de marcador de superficie	Aislamiento enzimático	Aislamiento mecánico	Lavado
CD31-CD34-	11	24,4	34,3
CD31-CD34+	60	74	64
CD31+CD34+	28	0,4	0,7
CD31+CD34-	0,5	0,5	0,5
CD73+CD29+	55	64,3	42
CD73-CD29+	25,5	1,3	0
CD73-CD29-	10	25	37

Para definir mejor la composición celular de las células SVF aisladas mediante las diferentes técnicas, se determinó la expresión de su marcador de superficie mediante un panel de citometría de flujo de 8 colores. El examen del porcentaje de células CD45 (+) dentro de las células SVF aisladas por las diferentes técnicas reveló un porcentaje más bajo (77%) en las células aisladas enzimáticamente en comparación con las células que se aislaron mecánicamente o por lavado, lo que produjo un 91% y un 90%, respectivamente, de células CD45(+). Dado que las células madre mesenquimales surgen únicamente de la población CD45(-), que representan células no hematopoyéticas, se examinó la expresión de marcador de superficie adicional en esta población. Como se puede observar en la Tabla 6 se observó un porcentaje significativo (28%) de células CD31(+) CD34(+) doble positivas en células aisladas enzimáticamente mientras que tanto en células aisladas mecánicamente como en células aisladas por lavado esta población prácticamente no existía.

Una población adicional que era apenas aparente tanto en células aisladas mecánicamente como por lavado eran las células CD73(-) CD29 (+). De nuevo, un porcentaje significativo (25%) de células aisladas enzimáticamente expresaron CD73(-) CD29 (+). Así, se demostró una diferencia significativa en la composición de las células entre las células SVF aisladas enzimáticamente y las células aisladas mecánicamente o las células aisladas por lavado.

La **Tabla 6** demuestra las diferencias en el porcentaje de expresión de marcador de superficie entre células CD45 (-) entre células SVF aisladas de grasa mediante digestión enzimática (colagenasa), disrupción mecánica de grasa o lavado de grasa. A pesar de la aparente similitud en la expresión del marcador de superficie entre las células aisladas mecánicamente y las aisladas por lavado, existe una diferencia sustancial entre estas células como fue evidente en la mayor expansión del cultivo de células aisladas mecánicamente. Por lo tanto, se examinó adicionalmente la expresión del marcador de superficie entre las células aisladas mediante estas dos técnicas.

La **Tabla 7** muestra diferencias en el porcentaje de expresión de marcador de superficie entre CD45 (-) entre células SVF aisladas de grasa ya sea por una disrupción mecánica de grasa o por lavado de grasa. Como puede verse en la **Tabla 7** un aumento sustancial en las poblaciones de CD31(-) CD34 (+) (aumento del 10%) y CD73 (+) CD29 (+)

(aumento del 20%) fue evidente en las células aisladas mecánicamente en comparación con las células aisladas por lavado).

Tabla 7

Expresión de marcador de superficie	Aislamiento mecánico	Lavado
CD31-CD34-	24,4	34,3
CD31-CD34+	74	64
CD31+CD34+	0,4	0,7
CD31+CD34-	0,5	0,5
CD73+CD29+	64,3	42
CD73-CD29+	1,3	0
CD73-CD29-	25	37

La población CD45(-) CD31(-) CD34(+) es la población que alberga la mayoría de las células progenitoras de células madre derivadas de tejido adiposo. Como puede verse en la **Tabla 7,** la fracción de células aisladas mecánicamente tiene un mayor porcentaje de CD45(-) CD31(-) CD34(+) en comparación con las células aisladas mediante lavado, lo que indica una mayor capacidad para formar células madre derivadas de tejido adiposo (ASC). Los marcadores de superficie adicionales sugeridos que representan las células progenitoras ASC dentro de la población SVF son CD73 y CD29. Como puede verse en la **Tabla 7**, las células aisladas mecánicamente tienen un aumento del 20% en las células CD45(-) CD31(-) CD73(+) CD29(+) en comparación con las células aisladas mediante lavado.

El examen de la distribución celular de todo el SVF utilizando los parámetros del área de dispersión de luz frontal (FSC-A) y el área de dispersión lateral (SSC-A) reveló una mayor proporción de células en una puerta denominada "puerta de monocitos" en aislamiento enzimático y mecánico en comparación con el lavado (**Figura 5A**). La proporción superior de células en la "puerta de monocitos" en células aisladas enzimática y mecánicamente fue aún más pronunciada en la población CD45(-) más relevante, alcanzando un aumento de 5 veces en células aisladas mecánicamente en comparación con células aisladas por lavado (**Figura 5B**).

La distribución SSC-A en FCS-A de todas las células vivas nucleadas (**Figura 5A**) o células CD45 (-) (**Figura 5B**) de células aisladas enzimáticas, mecánicas y de lavado se muestra en una gráfica de puntos.

De manera importante, como se puede ver en la **Tabla 8,** la mayoría de las células CD45(-) dentro de la "puerta de monocitos" eran CD31(-) CD34(+), que albergan células progenitoras de células madre adiposas.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una nueva población celular dentro de SVF denominada "CD45(-) CD31(-) puerta de monocitos (+) CD34 (+)". Esta nueva población, que tiene en cuenta tanto las propiedades físicas de las células como su expresión de marcadores de superficie, comprende el 6,6%, el 4,3% y el 0,88% del total de células nucleadas en células aisladas enzimática, mecánica y por lavado, respectivamente. Esta población comprende la mayoría de las células progenitoras de células madre adiposas, ya que predice bien la proporción de rendimientos de ASC, producidas a partir de un número igual de células SVF, después de 7 días en cultivo (**Tabla 8**). Por lo tanto, la diferencia más profunda entre las células aisladas mecánicamente y las lavadas está en su puerta de CD45(-) CD31(-) de la población de monocitos (+) CD34 (+) como se resume en la **Tabla 9**. En general, se acepta que la población de células terapéuticamente relevante es aquella que es capaz de producir células madre derivadas de tejido adiposo cultivadas, es decir, las células progenitoras de células madre. La presente invención define una subclase de células progenitoras de células madre dentro de SVF definidas usando las propiedades físicas de las células (puerta de monocitos). Por lo tanto, la puerta CD45(-) CD31(-) de la población de monocitos (+) CD34 (+) define la población de células progenitoras de células madre más relevante desde el punto de vista terapéutico dentro de SVF. El gran aumento en la puerta CD45(-) CD31(-) de la población de células monocitos (+) CD34 (+) en células SVF aisladas mecánicamente en comparación con células aisladas por lavado (**Tabla 9**) sugieren el aumento de la eficacia terapéutica de las células mecánicamente aisladas.

Tabla 8

Expresión de marcador de superficie	Aislamiento enzimático	Aislamiento mecánico	Lavado
CD31-CD34-	3	2,7	12
CD31-CD34+	82	94	88
CD31+CD34+	13	0,4	0
CD31+CD34-	0,5	0,5	0,5

Tabla 9

Población	Aislamiento mecánico	Lavado	Relación mec./lavado
CD45 (-), CD31(-), Puerta de monocitos (+), CD34+	4	0,88	4,54

Conclusiones:

A diferencia de las células SVF que se aíslan mediante lavado, las células aisladas mecánicamente muestran propiedades mejoradas que son similares a las células aisladas enzimáticamente, que hasta la fecha se consideran el criterio de referencia. Esto se demuestra en las siguientes propiedades:

1. El número de células nucleadas que se aíslan de la grasa: la disrupción mecánica de la grasa da como resultado cantidades de células SVF similares a las cantidades obtenidas mediante el aislamiento de colagenasa. Esto contrastaba con las células SVF que se aislaron mediante lavado (sin disrupción mecánica) que muestran cantidades significativamente más bajas.

2. Capacidad de expansión: la expansión del cultivo de SVF aislado mecánicamente produjo cantidades de células similares a las cantidades obtenidas usando células aisladas con colagenasa después de 7 y 14 días. Esto contrastaba con las células SVF que se aislaron mediante lavado, lo que demostró una expansión significativamente menor en el cultivo.

3. Potencial de diferenciación: las células aisladas mecánicamente demostraron capacidades de diferenciación tanto para el hueso como para la grasa. La capacidad de diferenciación de grasa de las células aisladas mecánicamente fue muy superior a la de las células aisladas por lavado.

4. Expresión de marcadores de superficie de células SVF cultivadas: en el paso 0, las células aisladas mecánicamente demostraron el patrón de expresión de marcador de superficie de células madre mesenquimales esperado.

5. La proporción de CD45 (-) CD31 (-) puerta de monocitos (+)células CD34 (+)en SVF: los datos demuestran un gran aumento en la proporción de células dentro de esta población en células aisladas mecánicamente en comparación con células aisladas por lavado que se correlaciona con su mayor capacidad para producir células madre adiposas.

Ejemplo 5:

Volviendo a otro dispositivo de la invención representado en las **Fig. 6** y **7**. Se representa un dispositivo para el aislamiento mecánico de células de la fracción vascular del estroma (SVF) mediante filtración a presión. El dispositivo en la **Fig. 6** está construido con dos contenedores extensibles designados 1 y 2. Los dos contenedores están separados por un obturador que tiene una posición cerrada y otra abierta (**Fig. 7**).

Según un ejemplo de realización, el proceso de aislamiento de células SVF comprende una o más de las siguientes etapas:

1. El obturador está en una posición cerrada y los dos contenedores están conectados.

2. Un dispositivo de liposucción está conectado al vacío. La bomba de succión está conectada al vacío 1 y la liposucción se realiza en el contenedor 1.

3. Al final del procedimiento de liposucción, el lipoaspirado se deja reposar durante 5 minutos.

4. A continuación, la bomba de vacío se conecta para aspirar 2 y se aspira el fluido de liposucción.

5. A continuación, se agrega fluido estéril a la grasa del vacío in situ, se voltea el recipiente un par de veces y se deja reposar el lipoaspirado 5 minutos de nuevo.

6. El líquido se vuelve a aspirar desde la salida de vacío 2.

7. Se agrega fluido estéril a la grasa del vacío en el lugar y la grasa se mezcla con fluido.

8. El recipiente se voltea un par de veces para mezclar la grasa con el fluido.

9. El obturador se cambia inmediatamente a la posición abierta y la grasa pasa a través de la malla metálica presionando el émbolo.

10. Una vez que toda la grasa y el fluido pasaron a través del filtro al contenedor 2, el obturador se coloca en una posición cerrada.

11. El fluido de acceso desde arriba del obturador cerrado se aspira.

12. El contenedor 2 se separa del contenedor 1 y la grasa permanece estéril porque el extremo superior está cerrado por el obturador cerrado.

13. El contenedor se centrifuga y las células SVF se concentran en la parte similar a un tubo en el fondo del contenedor.

14. Las células SVF se aíslan de forma estéril con una aguja y una jeringa.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para enriquecer una población celular a partir de un tejido adiposo de mamífero, comprendiendo el procedimiento:

- disrupción/rotura mecánica del tejido adiposo en un conjunto de contenedor utilizando un dispositivo mecánico de disrupción de tejido que comprende al menos una hoja o rotor giratorio, estando conectado el dispositivo de forma desmontable a un actuador eléctrico para obtener una suspensión celular, en el que la disrupción no utiliza una enzima; en el que el tejido adiposo ha sido aspirado al interior del conjunto de contenedor utilizando un tubo de aspiración que tiene un extremo proximal conectado de forma separable al conjunto de contenedor y un extremo distal insertado en al menos una cavidad del cuerpo de un mamífero;

- opcionalmente lavar la suspensión de células dentro del conjunto de contenedor;

- transferir el conjunto de contenedor a una centrífuga y centrifugar el conjunto de contenedor para separar las fases y obtener así un sedimento celular;

- extraer el sedimento celular del interior del conjunto de contenedor para obtener de ese modo una población celular enriquecida en forma de fracción de células estromales (SVF).

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el tejido adiposo aspirado en el contenedor se lava antes de la disrupción/rotura mecánica.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la disrupción/rotura mecánica se lleva a cabo en la solución de lipoaspirado sin la adición de una solución de lavado.

4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la suspensión de células se lava después de la disrupción/rotura mecánica.

5. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la suspensión de células no se lava después de la disrupción/rotura mecánica y en el que el sedimento celular se extrae después de la separación de fases.

6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la solución de lavado contiene además al menos un reactivo adicional seleccionado de un anticuerpo específico de células, un agente amortiguador, un gradiente de densidad basado en azúcar, un gradiente de densidad sin azúcar, una solución de clasificación de células magnéticas mediada por anticuerpos y una solución de clasificación de células mediada por anticuerpos no magnéticos.

7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la población celular enriquecida se procesa adicionalmente para enriquecer una población celular específica.

8. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el SVF está caracterizado por al menos uno de los siguientes:

- tener un porcentaje de entre aproximadamente 7 y aproximadamente 40 de células CD45(-), CD31(-) y CD34(+) y entre aproximadamente 6 y aproximadamente 30 de células CD45(-) CD73(+) CD29(+); y/o

- tener un porcentaje de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 10 de puerta de monocitos CD45(-) y CD31(-) de células (+)CD34 (+).

9. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además una etapa de aislamiento de la grasa.

10. Un dispositivo para separar una fracción SVF del tejido adiposo obtenido de un sujeto, comprendiendo el dispositivo:

- un conjunto de contenedor adaptado para recibir, manipular y permitir la separación de la población celular enriquecida;

- una tapa de cierre configurada para permitir la fijación de un actuador eléctrico;

- un dispositivo mecánico de disrupción de tejido conectado de forma separable al accionador eléctrico y situado dentro del conjunto de contenedor que es adyacente a la base del recipiente pero que no tiene contacto con ella, comprendiendo el dispositivo al menos una hoja giratoria o rotor;

- una bomba de vacío para activar la liposucción de tejido adiposo en el contenedor a través de un tubo de aspiración a través de una entrada en la tapa de cierre del conjunto de contenedor.

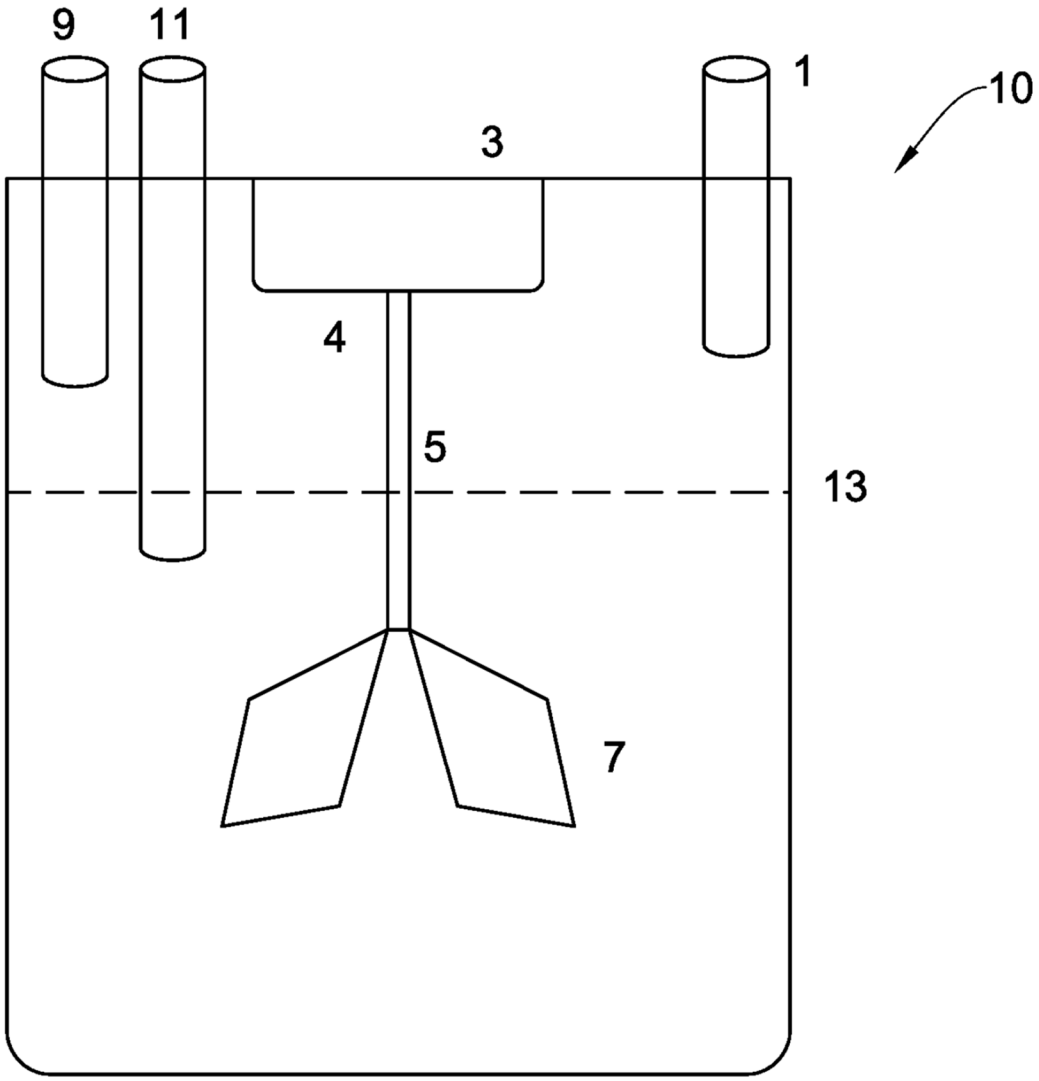


FIG. 1

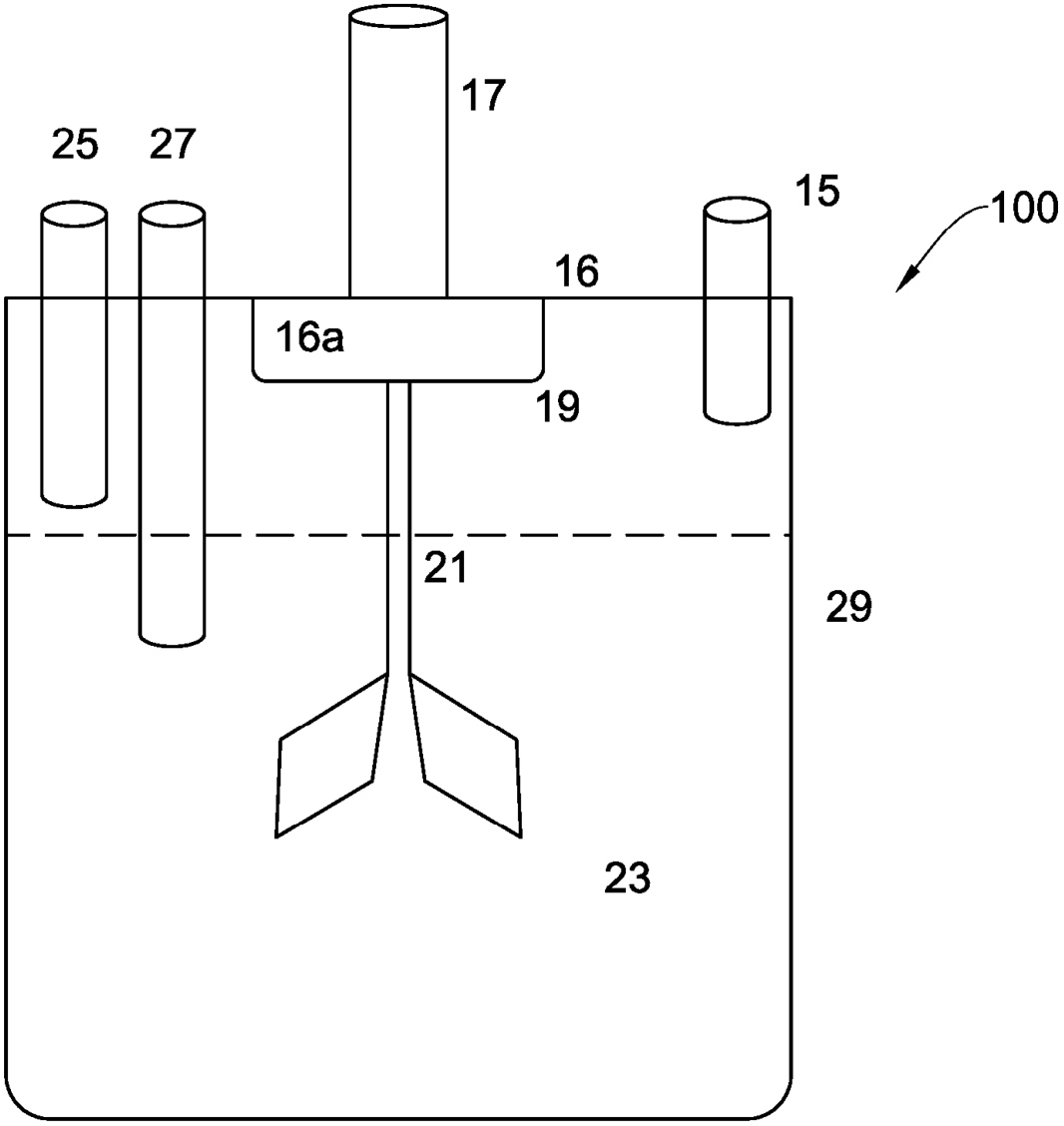


FIG. 2

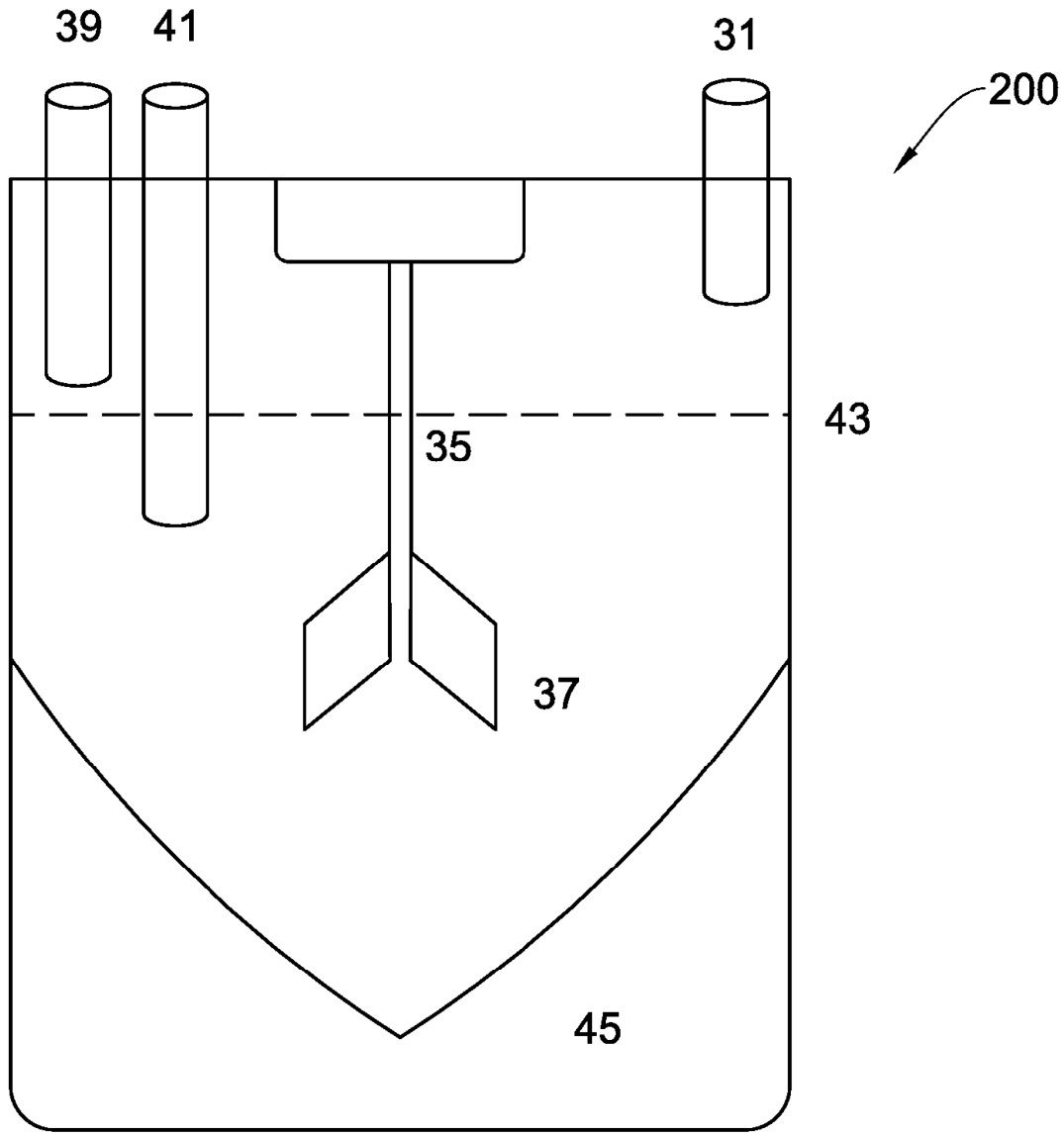


FIG. 3

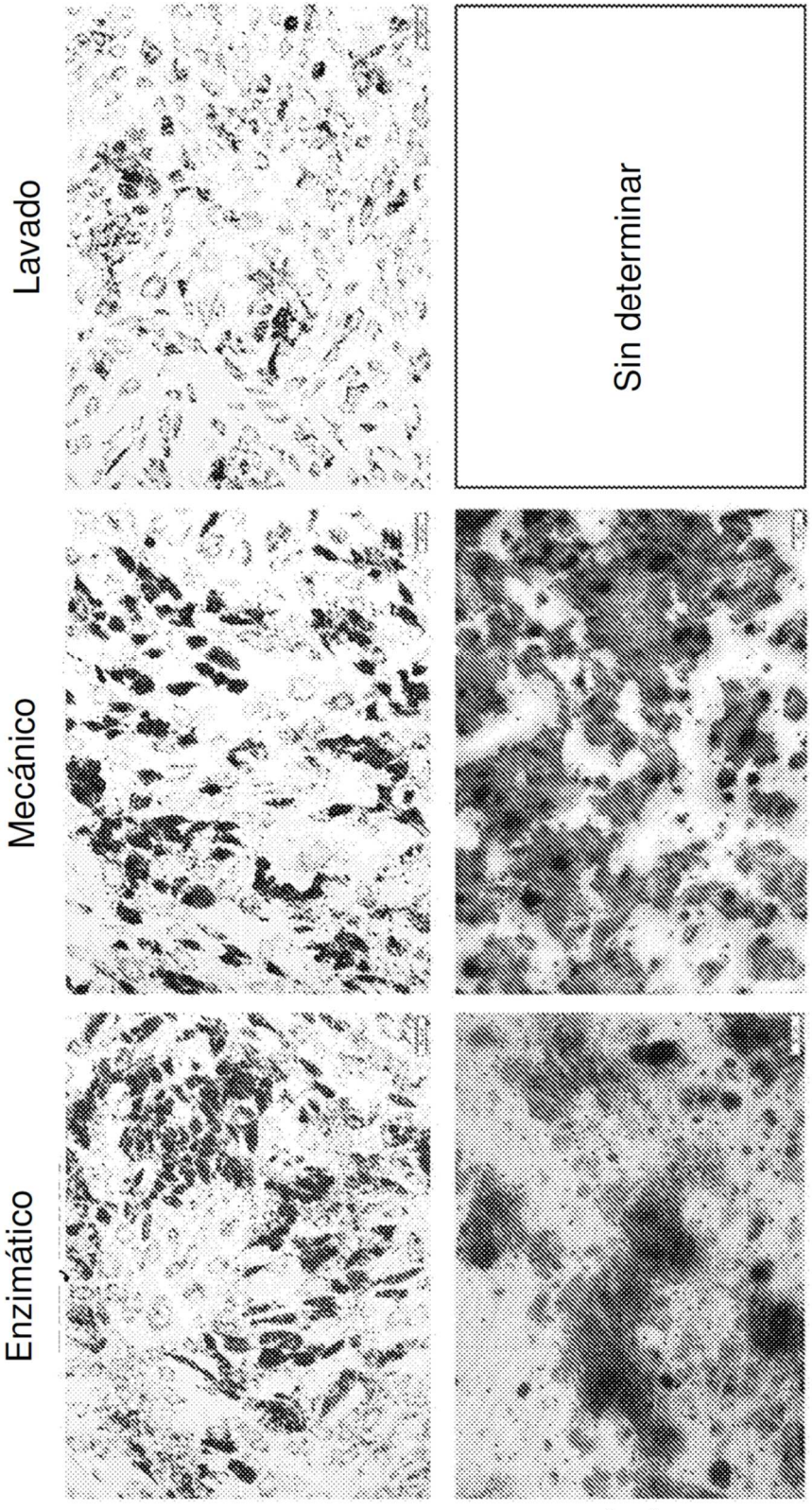
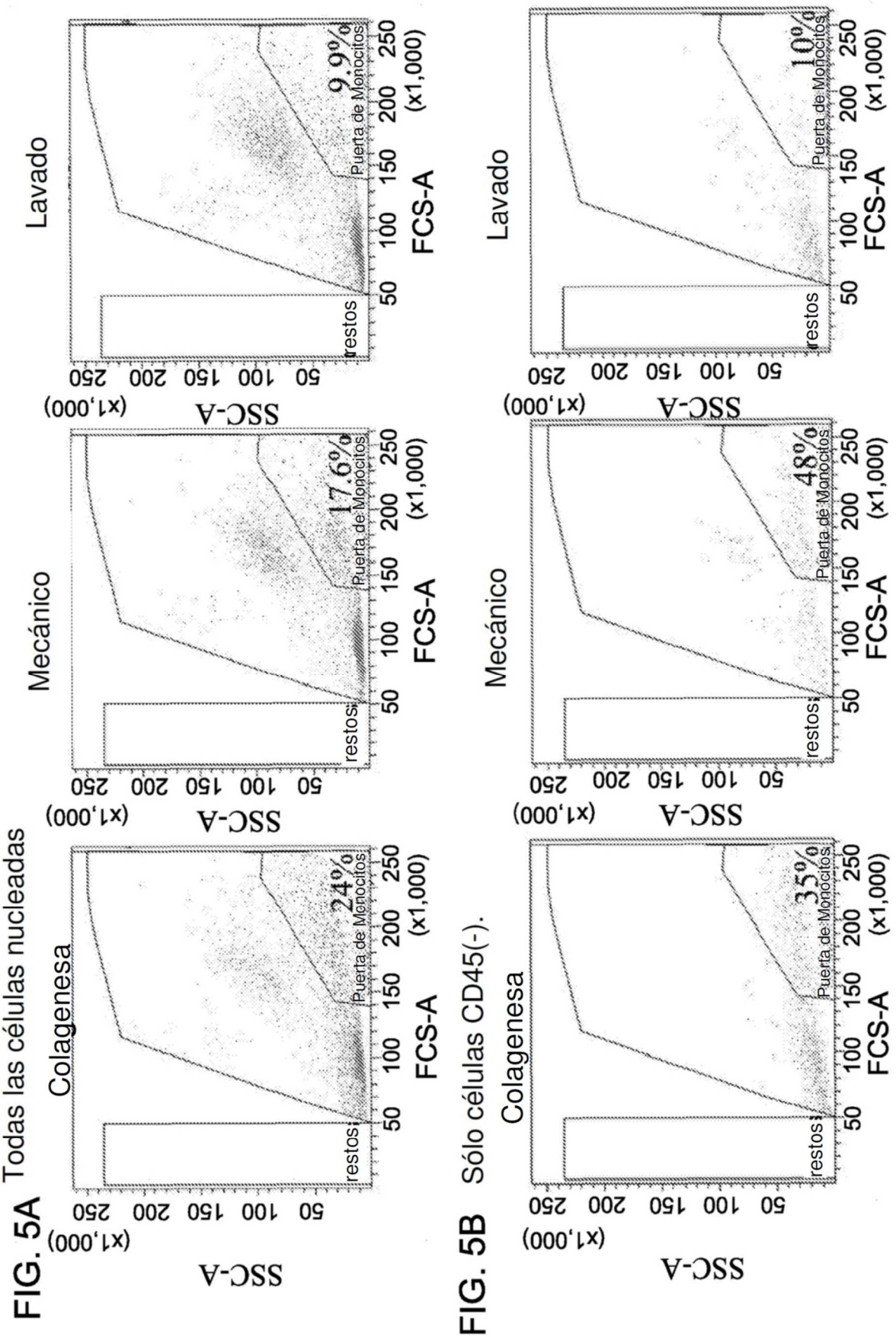


Fig. 4A

Fig. 4B


FIG. 5A
Todas las células nucleadas
Colagenesa
Mecánico
Lavado
SSC-A
(x1,000)
FCS-A
(x1,000)
restos
Puerta de Monocitos
24%
17.6%
9.9%
FIG. 5B
Sólo células CD45(-).
Colagenesa
Mecánico
Lavado
35%
48%
10%

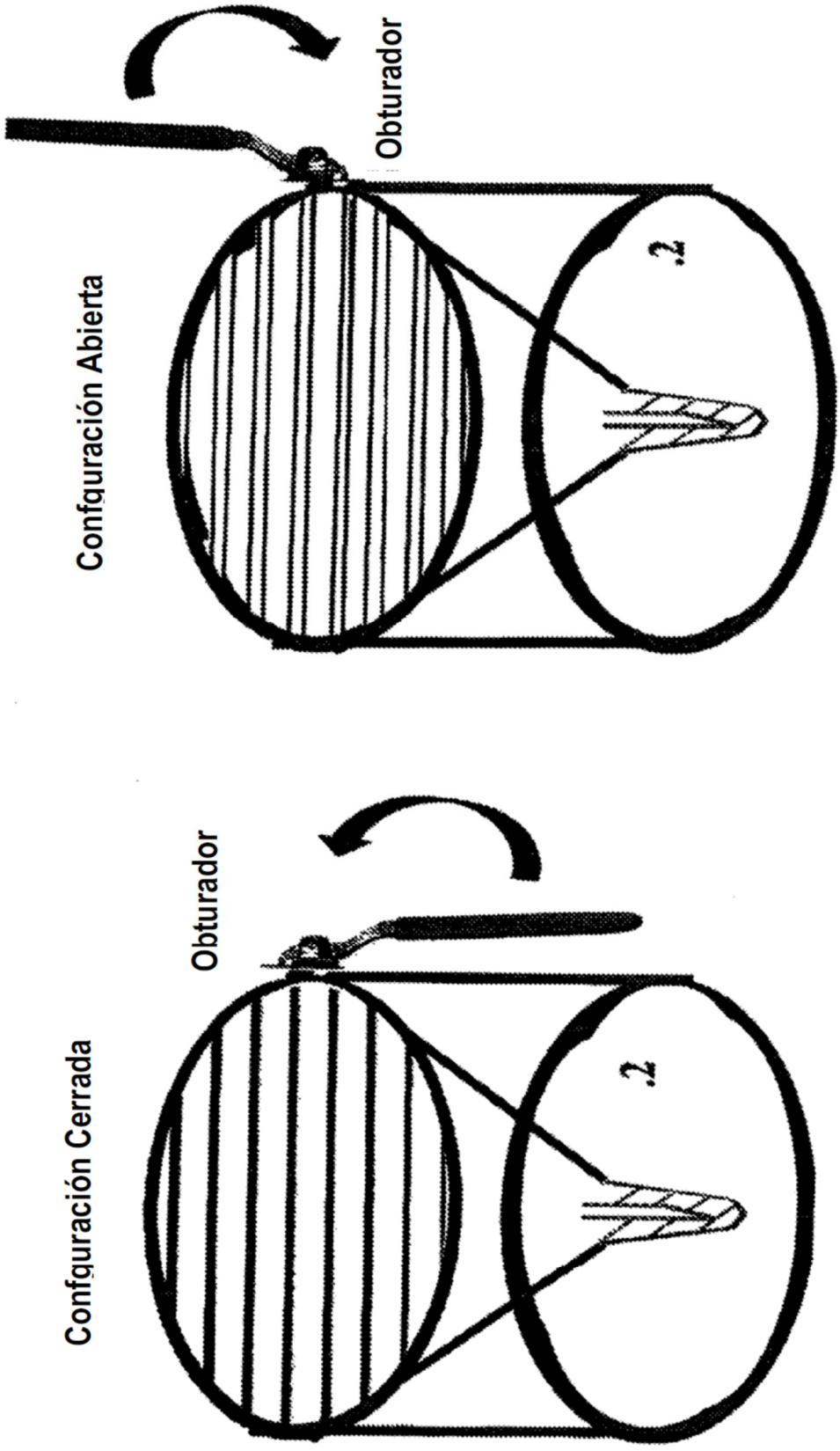

Obturador
Configuración Abierta
2
Obturador
Configuración Cerrada
2

Fig. 6

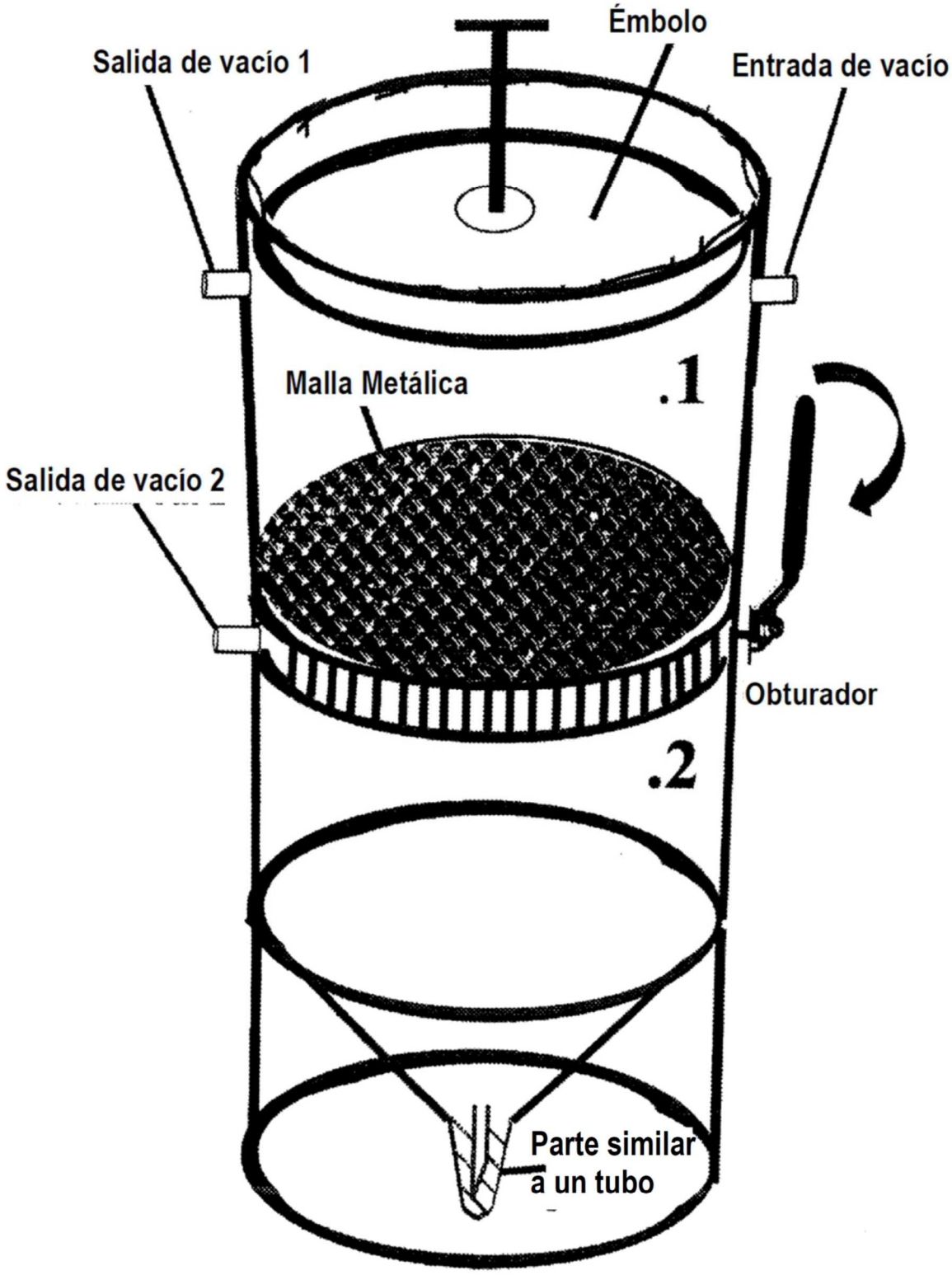

Émbolo
Salida de vacío 1
Entrada de vacío
Malla Metálica
.1
Salida de vacío 2
Obturador
.2
Parte similar
a un tubo

Fig. 7