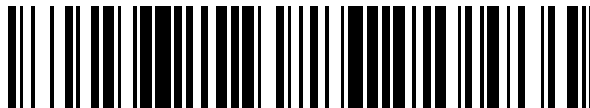


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 065**

51 Int. Cl.:  
**C12N 5/071** (2010.01)  
**A61K 35/23** (2006.01)  
**A61P 13/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07728587 .2**  
96 Fecha de presentación: **27.04.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2019861**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.02.2009**

54 Título: **POBLACIÓN DE CÉLULAS MADRE OBTENIDAS DE RIÑÓN, IDENTIFICACIÓN Y USO TERAPÉUTICO.**

30 Prioridad:  
**28.04.2006 IT F120060099**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**31.01.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**31.01.2012**

73 Titular/es:  
**AZIENDA OSPEDALIERO-UNIVERSITARIA  
CAREGGI  
VIALE DELLE OBLATE, 1  
50141 FIRENZE, IT**

72 Inventor/es:  
**ROMAGNANI, Paola;  
MAGGI, Enrico y  
ROMAGNANI, Sergio**

74 Agente: **Ruo, Alessandro**

ES 2 373 065 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**

Población de células madre obtenidas de riñón, identificación y uso terapéutico

**5 Campo de la invención**

**[0001]** La presente invención se refiere al campo de células madre y su uso.

**Estado de la técnica**

**10 [0002]** Se conoce bien que muchos órganos adultos contienen células madre pluripotenciales implicadas en el mantenimiento de integridad de tejido y en procesos de reparación.

**15 [0003]** La disponibilidad de células madre de riñón capaces de regenerar tejido renal después del daño es muy importante para la perspectiva de prevención y terapia de cualquier tipo de daño renal. De hecho, las enfermedades de riñón agudas y crónicas representan una emergencia de salud pública debido a su pertinencia epidemiológica y a sus elevados costes implicados en tratamientos sustitutivos, tales como diálisis y trasplante.

**Sumario de la invención**

**20 [0004]** La invención hace disponibles células madre de riñón capaces de co-expresar marcadores CD 133 y CD 24 en su superficie

**Breve descripción de las figuras**

**25 [0005]**  
 La Figura 1 muestra la co-expresión de marcadores de células madre CD24 y CD133 e identifica una subpoblación celular en la cápsula de Bowman de riñones adultos humanos.  
 La Figura 2 se refiere al aislamiento y caracterización de células CD24+ CD133+.  
**30** La Figura 3 muestra la capacidad proliferativa de células CD24+ CD133+ en comparación con células CD24- CD133-.  
 La Figura 4 muestra la diferenciación de clones obtenidos a partir de células CD24+ CD133+ obtenidas a partir de la cápsula de Bowman con células epiteliales tubulares.  
**35** La Figura 5 muestra la diferenciación de clones obtenidos a partir de células CD24+ CD133+ obtenidas a partir de la cápsula de Bowman con osteoblastos y adipocitos.  
 La Figura 6 muestra la adquisición de propiedades fenotípicas funcionales neuronales por clones obtenidos a partir de células CD24+ CD133+ obtenidas a partir de la cápsula de Bowman.  
 La Figura 7 muestra células CD24+ CD133+ de riñón humano implantadas en riñones de ratones SCID que sufren de insuficiencia renal aguda (ARF) y la generación de diferentes tipos de células tubulares.  
**40** La Figura 8 muestra que las células CD24+ CD133+ protegen a ratones tratados con glicerol del deterioro de estructura y función de riñón.

**Descripción detallada de la invención**

**45 [0006]** La presente invención permiten superar el problema mencionado anteriormente haciendo disponibles células madre de riñón pluripotenciales.

**[0007]** De hecho, se ha observado de forma sorprendente que las células renales capaces de co-expresar los marcadores CD133 y CD24 (CD24+ CD133+) en su superficie poseen capacidad de célula madre.

**50** Identificación y aislamiento de células madre de riñón

**[0008]** Veinte riñones humanos normales se han examinado mediante microscopía confocal usando anticuerpos monoclonales anti-CD24 y anti-CD133. CD24, un marcador de la población de células progenitoras embrionarias de riñón, se observó que se expresaba selectivamente en células del epitelio parietal en la cápsula de Bowman y en una subpoblación de células epiteliales tubulares. El anticuerpo monoclonal anti-CD133, que identifica selectivamente células madre obtenidas a partir de diversos tejidos humanos, detectó una subpoblación de células de la cápsula de Bowman y estructuras tubulares raras (Fig. 1). La inmunofluorescencia doble para CD24 y CD133 **60** mostró que los dos marcadores identifican una subpoblación de células de la cápsula de Bowman que se localizan mayormente a nivel del polo urinario del glomérulo y con frecuencia se extienden a la parte del túbulo más cerca al polo urinario (Fig. 1). Las mismas células también se marcaron con anticuerpo monoclonal anti-CD106. En conjunto, estos resultados sugieren la existencia, en el riñón humano adulto, de una población de células a nivel del epitelio de la cápsula de Bowman y una población rara de células tubulares, en la que se co-expresan los diferentes marcadores de células madre, como se muestra en la Figura 1, cuyas diversas imágenes se describen en lo **65** sucesivo en el presente documento con detalle:

a) Tinción de inmunofluorescencia doble, que muestra expresión de CD24 (rojo) y CD133 (verde) en células de la cápsula de Bowman a partir de un riñón de un sujeto adulto humano. La superposición de los dos patrones de tinción (amarillo) muestra co-expresión de CD24 y CD133 en una subpoblación de células localizadas en el polo urinario (PU, Bar 50  $\mu\text{m}$ ). To-pro-3 tiñe por contraste los núcleos (azul).

b) Tinción de inmunofluorescencia doble, detectada a aumento más elevado, que muestra la expresión de CD24 (rojo) y CD133 (verde) en células de la cápsula de Bowman. La superposición de los dos patrones de tinción muestra co-localización de CD24 y CD133 en el citoplasma y en la membrana de células frente al glomérulo (G) mientras que únicamente CD24 se expresa en la membrana basal (amarillo, Bar 10  $\mu\text{m}$ ). To-pro-3 tiñe por contraste los núcleos (azul).

c) Detección de CD133 con dos anticuerpos monoclonales anti-CD133 diferentes. Anticuerpo 293C3 (rojo) y anticuerpo AC133 (verde) tiñen la misma subpoblación de células en la cápsula de Bowman. La imagen superpuesta, que muestra ambos patrones de tinción, muestra co-tinción de las mismas células (amarillo, Bar 50  $\mu\text{m}$ ). To-pro-3 tiñe por contraste los núcleos (azul).

d) Detección de CD24 (rojo), CD133 (verde) y CD29 (azul) a nivel de los glomérulos. La tinción de CD29 permite la identificación de la arteriola aferente (AA). La imagen superpuesta muestra que CD24 y CD133 se co-expresan de forma selectiva en una subpoblación de células localizadas en el lado opuesto del polo vascular (amarillo, Bar 50  $\mu\text{m}$ ).

e) Tinción de inmunofluorescencia triple, detectada a aumento más elevado, que muestra expresión de CD24 (rojo), CD133 (verde) y CD106 (azul) en células de la cápsula. La imagen superpuesta muestra la co-localización de CD24 y CD133 (amarillo) en el citoplasma y en la membrana de las células frente al glomérulo (G), mientras que CD24 y CD106 (color púrpura) se co-expresan en la membrana basal. Las áreas visibles de co-expresión de CD24, CD133 y CD106 están teñidas en blanco (Bar 10  $\mu\text{m}$ ).

**[0009]** Después las células CD24+ CD133+ se aislaron con el fin de evaluar sus características morfológicas y funcionales. Para este propósito, el componente cortical del tejido renal se separó del componente medular y se sometió a trituración. Los glomérulos se aislaron mediante una técnica de separación convencional usando tamices de diferente porosidad. Para evitar la destrucción de las células CD24+ CD133+ de la cápsula de Bowman, la suspensión glomerular no se digirió sino que se cultivó directamente en placas de plástico que contenían EGM<sup>®</sup>-MV (Lonza Group, Walkersville, EE.UU.) complementado con FBS al 20%. Las células que salían de los glomérulos cultivados se examinaron para determinar su capacidad de formar agregados celulares parecidos a neuroesferas y su fenotipo de célula madre se evaluó mediante microscopía confocal y análisis citofluorométrico como se muestra en la Figura 2, las diversas imágenes de las cuales se describen a continuación con detalle:

a) El primer panel de la izquierda muestra células en proliferación que salen de un glomérulo encapsulado en cultivo (40x). Imágenes posteriores obtenidas mediante microscopía confocal láser muestran que la población en proliferación expresa CD24 (verde). To-pro-3 tiñe por contraste los núcleos (azul). La imagen superpuesta muestra que las células en proliferación expresan cantidades notables de CD24 (Bar 100  $\mu\text{m}$ ).

a) Tinción de inmunofluorescencia doble que detecta la expresión de CD24 (rojo) y CD133 (verde), que muestra co-localización selectiva de los dos marcadores en la población obtenida a partir de células glomerulares en proliferación. To-pro-3 tiñe por contraste los núcleos (azul). La imagen superpuesta muestra tinción de CD24 y CD133 intensa en las mismas células (amarillo, Bar 100  $\mu\text{m}$ ).

c) El cultivo primario de células de la cápsula de Bowman representa una población homogénea que comprende aproximadamente el 100% de células que expresan CD24, CD133, CD106, CD105 y CD44 y da un resultado negativo para marcadores de células endoteliales CD31 y CD34. También se muestra un análisis mediante citometría de flujo de un cultivo representativo.

d) Un cultivo primario a partir de células de la cápsula de Bowman CD24+ CD133+ no expresa marcadores de linaje de riñón, tales como CD35 o EMA-1, como se muestra mediante citometría de flujo en los primeros dos paneles. Se muestra, mediante microscopía confocal, que las mismas células no expresan THG (tercer panel) ni LTA (cuarto panel) (Bar 100  $\mu\text{m}$ ). Tinción histoquímica negativa para fosfatasa alcalina (último panel). Se muestra un cultivo representativo.

e) Medición de niveles de ARNm Oct-4 mediante "RT-PCR cuantitativa en tiempo real" en cultivos de células endoteliales, células tubulares renales, células mesangiales, podocitos, células de músculo liso, células CD24+ CD133+ y células HEK. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  DT de mediciones por triplicado realizadas en cultivos primarios de 5 donantes diferentes.

e) Medición de niveles de ARNm Bml-1 mediante " RT-PCR cuantitativa en tiempo real" en cultivos de células endoteliales, células tubulares renales, células mesangiales, podocitos, células de músculo liso, células CD24+ CD133+ y células HEK. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  DT de mediciones por triplicado realizadas en cultivos primarios de 5 donantes diferentes.

**[0010]** Las células aisladas expresaban tanto CD24 como CD133, mientras que no expresaban ningún marcador hematopoyético (CD34, CD45), endotelial (CD31, CD34), de podocitos o tubular (EMA-1, *Lotus Tetragonolobus*, *Dolichos Biflorus*, fosfatasa alcalina) (Fig. 2).

**[0011]** Para definir mejor las características de células madre de células aisladas, se evaluó la expresión de Oct-4, un marcador de células madre embrionarias típico, junto con la expresión de Bml-1, otro factor de la transcripción

que es crítico para el mantenimiento de la capacidad de auto-renovación de células madre y para la prevención de senectud celular, demostrando de ese modo la naturaleza de células madre de las células CD24+ CD133+ (Fig. 2). Esta también es la primera descripción de una población de células obtenidas de riñón que expresan factores de transcripción de células madre Oct-4 y Bml-1 en cultivo.

**[0012]** Para evaluar si las células CD24+ CD133+ también muestran propiedades funcionales de células madre, dichas células se marcaron en cultivo con CFDA-SE y se sembraron en EGM®-MV complementado con FBS al 20%. Los datos de la proliferación mostraron una capacidad mucho más proliferativa de dichas células en comparación con otras células renales que no expresan la combinación de los marcadores CD133 y CD24.

**[0013]** De hecho, las células CD24- CD133- (es decir, que no expresan CD133 ni CD24) se prepararon a partir de tejido cortical renal adulto digerido con métodos enzimáticos (por ejemplo, colagenasa) para degradar el tejido conectivo, seguido por separación mediante métodos inmunológicos, en particular métodos inmunomagnéticos. Estas células después se sembraron en el mismo medio y, después de adhesión, las mismas se evaluaron mediante análisis citofluorométrico. Cuando las células CD24+ CD133+ se sembraron con células CD24- CD133- en las mismas placas de cultivo en una proporción 1:1 y en medios diferentes, la proporción entre células CD24+ CD133+ y CD24- CD133- cambió a aproximadamente 9 a 1 después de únicamente 10 días de cultivo (Fig. 3). Para validar aún más la evidencia de que los cultivos de células CD24+ CD133+ muestran propiedades funcionales características de células madre, dichas células que salen de los glomérulos en cultivo se desprendieron y células únicas se clonaron mediante dilución limitante en placas "multipocillo" revestidas con fibronectina. Las células CD24- CD133-, obtenidas mediante separación inmunomagnética y también clonadas mediante dilución limitante en placas "multipocillo" recubiertas con fibronectina, se usaron como control; únicamente se evaluaron los pocillos que contenían una célula única. El potencial clonogénico se observó que era  $41,3 \pm 14\%$  para células CD24+ CD133+ obtenidas a partir de cultivos glomerulares y  $2,1 \pm 1,9$  para células CD24- CD133-. Se ha de observar que los clones raros obtenidos a partir de las células CD24- CD133- se produjeron como resultado de una contaminación de fondo pequeña con células CD24+ CD133+.

**[0014]** Para evaluar la capacidad de células CD24+ CD133+ de diferenciarse en diversos tipos celulares, clones de células CD24+ CD133+ individuales a partir de diferentes donantes se cultivaron en condiciones que favorecen la diferenciación tubulogénica, adipogénica, osteogénica y neurogénica.

**[0015]** La diferenciación tubulogénica se obtuvo incubando los clones de células CD24+ CD133+ durante 30 días en medio de cultivo comercial REBM, que contenía SingleQuotes (hidrocortisona, hEGF, FBS, epinefrina, insulina, triyodotironina, transferrina y gentamicina/anfotericina-B) (Cambrex Bio Science), complementado con 50 ng/ml de HGF (Peprotech, Rocky Hill, NJ).

**[0016]** La diferenciación osteogénica, adipogénica y neurogénica de clones de células CD24+ CD133+ se indujo como se ha descrito previamente. Para la inducción osteogénica, células PEC CD24+ CD133+ se cultivaron en medio  $\alpha$ -MEM complementado con suero de caballo al 10%, que contenía además dexametasona 100 nM, ácido ascórbico 50  $\mu$ M y di  $\beta$ -glicerofosfato 2 mM (todos estos reactivos se obtuvieron en Sigma-Aldrich). El medio de cultivo se reemplazó dos veces a la semana durante 3 semanas. Para diferenciación adipogénica, las células CD24+ CD133+ se incubaron en DMEM con alto contenido en glucosa (hg) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) que contenía di suero fetal bovino al 10% (FBS), di dexametasona 1  $\mu$ M, 1-metil-3-isobutilxantina 0,5  $\mu$ M (IBMX), 10  $\mu$ g/ml de insulina e indometacina 100  $\mu$ M (todos estos reactivos se obtuvieron en Sigma-Aldrich). Después de 72 horas, el medio se cambió a DMEM hg con FBS al 10%, que contenía 10  $\mu$ g/ml de insulina, durante 24 horas. Estos tratamientos se repitieron tres veces. Después las células se mantuvieron en DMEM hg con FBS al 10% y 10  $\mu$ g/ml de insulina durante una semana adicional. Para diferenciación neurogénica, las células CD24+ CD133+ se sembraron en DMEM hg con FBS al 10%. Después de 24 horas, el medio de cultivo se reemplazó con DMEM hg con FBS al 10%, que contenía B27 (Invitrogen), 10 ng/ml de di EGF (Peprotech) y 20 ng/ml de bFGF (Peprotech). Cinco días después, las células se lavaron y se incubaron en DMEM complementado con 5  $\mu$ g/ml de insulina, indometacina 200  $\mu$ M e IBMX 0,5 mM, en ausencia de FBS, durante 5 horas. Se realizó tinción de rojo de Alizarina, rojo O al aceite o fosfatasa alcalina como se ha descrito [véase Romagnani P. *et al.*: CD14+ CD34 low cells with stem cell phenotypic and functional features are the major source of circulating endothelial progenitors. *Cir. Res* 97:314-322, 2005; Boquest AC *et al.*: Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture. *Mol Biol Cell* 16:1131-1141, 2005; Pittenger MF *et al.*: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147, 1999].

**[0017]** La diferenciación tubulogénica se ha demostrado en base a la evaluación de adquisición de características de marcadores de células epiteliales tubulares de riñón completamente diferenciadas, tales como fosfatasa alcalina, aminopeptidasa A (principalmente expresada por células epiteliales del túbulo proximal), Co-transportador de Na-Cl Sensible a Tiazida (expresado principalmente por células epiteliales de los túbulos distales), EMA-1, *Lotus Tetragonolobus*, *Dolichos Biflorus* y aquaporinas 1 y 3. Estos marcadores se detectaron mediante microscopía confocal, análisis citofluorométrico y determinación de ARNm mediante RT-PCR cuantitativa (Fig. 4).

**[0018]** Los resultados se muestran en la Figura 4, las diversas imágenes de las cuales se describen a continuación

con detalle:

- 5 a) Fotomicrografías representativas de tinción histoquímica de fosfatasa alcalina de células CD24+ CD133+ antes (día 0) y después (día 30) de incubación en medio de cultivo que favorece la diferenciación tubular. Aumento original: 65x, 80x y 320x, respectivamente.
- b) Tinción de LTA antes (día 0) y después (día 30) de incubación en medio de cultivo que favorece diferenciación tubular, evaluada mediante microscopía confocal (verde). La tinción azul To-pro-3 tiñe por contraste los núcleos (Bar 100  $\mu$ m).
- 10 c) Expresión de THG antes (día 0) y después (día 30) de incubación en medio de cultivo que favorece diferenciación tubular, evaluada por microscopía confocal (verde). La tinción azul To-pro-3 tiñe por contraste los núcleos (Bar 100  $\mu$ m).
- d) Tinción doble de LTA (verde) y THG (rojo) que muestra la coexistencia en el mismo clon de células que co-expresan marcadores de diferentes segmentos tubulares (imagen superpuesta, amarillo) y células que expresan marcadores tubulares proximales o distales (Bar 100  $\mu$ m).
- 15 e) Medición mediante RT-PCR de niveles de ARNm aumentados de marcadores tubulares después de 30 días de cultivo en medio que favorece la diferenciación tubular, en comparación con valores obtenidos con las mismas células antes de la diferenciación. Las columnas representan valores medios  $\pm$  DT obtenidos después de diferenciación de 50 clones diferentes.
- 20 f) Izquierda: fotomicrografías representativas de imágenes de fluorescencia confocal. Imágenes registradas a una longitud de onda de excitación de 488 nm, antes y después de la adición de angiotensina.

**[0019]** II (1  $\mu$ M) (Bar 20  $\mu$ m). Derecha: cinética de tiempo de cambios en intensidad de fluorescencia registrados en 5 células individuales de cada uno de los 10 clones diferentes examinados.

- 25 **[0020]** La diferenciación adipogénica se demostró evaluando la adquisición de la característica de morfología celular y a partir de tinción positiva de vacuolas lipídicas con Rojo O al aceite. Además, la RT-PCR cuantitativa mostró un aumento agudo de los niveles de ARNm de adiponectina (Fig. 5). La diferenciación osteogénica se evaluó a partir de la capacidad de los clones celulares de formar colonias positivas a fosfatasa alcalina; en el transcurso de la diferenciación estas colonias se volvieron nódulos mineralizados, como se muestra mediante tinción de rojo de Alizarina que detecta depósitos con alto contenido en calcio celular. La osteogénesis se comprobó adicionalmente mediante el análisis de expresión de ARNm Runx2. Los resultados obtenidos a continuación de la diferenciación adipogénica y osteogénica se muestran en la Fig. 5, las diversas imágenes de las cuales se describen a continuación con detalle:
- 30

- 35 aaa) Izquierda: fotomicrografías representativas de tinción histoquímica de Alizarina y fosfatasa alcalina antes (día 0) y después (día 21) de incubación de células CD24+ CD133+ en medio de cultivo que favorece la diferenciación osteogénica (x 100). Derecha: medición de los niveles de ARNm Runx2 antes (día 0) y después (día 21) de incubación en el mismo medio de cultivo. Las columnas representan los valores de media  $\pm$  DT obtenidos a partir de 50 clones diferentes.
- 40

- b) Izquierda: fotomicrografías representativas de tinción histoquímica de rojo O al aceite antes (día 0) y después (día 21) de incubación de células CD24+ CD133+ en un medio de cultivo que favorece la diferenciación adipogénica (200x). Recuadro: algunas pocas células diferenciadas examinadas a aumento más elevado (320x). Derecha: medición de niveles de ARNm de adiponectina el día 0 y después de 21 días de incubación en el mismo medio de cultivo. Las columnas representan valores de media  $\pm$  DT obtenidos a partir de 50 clones diferentes.
- 45

- [0021]** La diferenciación neurogénica se demostró en base a la adquisición de morfología similar a neurona y expresión elevada, a niveles de ARNm y de proteína, de proteína tau, Proteína Asociada a Microtúbulo (MAP-2), enolasa específica neuronal, nestina, colesterol-acetil transferasa, beta-tubulina III y neurofilamento 200. Además, los estudios electrofisiológicos hicieron posible demostrar que las células neuronales obtenidas de este modo demostraron la presencia de canales de calcio y sodio dependientes de voltaje con características completamente similares a neurona, como se muestra en la Fig. 6, cuyas diversas imágenes se describen a continuación con detalle:
- 50

- 55 a) Ausencia de marcadores neuronales NF200, NFM, chat y MAP-2 antes de incubar las células CD24+ CD133+ en medios que favorecen la diferenciación neurogénica evaluada mediante microscopía confocal. To- pro-3 tiñe por contraste los núcleos (Bar 100  $\mu$ m). Se muestra un experimento representativo.
- 60 b) Expresión fuerte de marcadores neuronales NF200, NFM, ChAT y MAP-2 después de diferenciación de células en el mismo medio (verde). Top-pro-3 tiñe por contraste los núcleos (Bar 100  $\mu$ m). Se muestra un experimento representativo.
- c) Aumento mayor de un experimento representativo, que muestra la adquisición de morfología neuronal típica, así como tinción de ChAT (verde) en células CD24+ CD133+ cultivadas en condiciones que favorecen la diferenciación neurogénica (Bar 100  $\mu$ m).
- 65 d) Medición mediante "RT-PCR cuantitativa en tiempo real" de niveles de ARNm aumentados para

diferentes marcadores neuronales después de cultivar las células en condiciones que favorecen la neurogénesis, en comparación con valores de las mismas células antes de la diferenciación neurogénica. Las columnas representan los valores de media  $\pm$  DT obtenidos a partir de 50 clones diferentes.  
e-h) Corrientes de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$  en neuronas obtenidas a partir de células CD24+ CD133+.

5  
10  
15  
20

**[0022]** Corrientes representativas registradas a un potencial de -90 mV, se han aplicado impulsos de 1 s en una escala de -80 a 50 mV con aumentos de 10 mV. Los datos se han adquirido a diferentes tiempos de toma de muestras (50  $\mu\text{s}$  en los primeros 100 ms y 1 ms para la duración restante del ensayo) con el fin de detectar fenómenos rápidos y lentos y la cinética de tiempo de corriente de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipo L  $I_{\text{CaL}}$ ; para claridad, se presentan únicamente las señales de corriente registradas a -60 -40 -20, 0, 20, 30 y 40 mV. f Curva  $I_{\text{CaL}}$ -V determinada en el pico de corriente (n = 26). g Cinética de tiempo de la corriente de  $\text{Na}^+$   $I_{\text{Na}}$ ; se presentan únicamente las señales de corriente registradas a -60, -40, -30, -20, -10, 0, 20 y 30 mV; la línea roja indica  $I_{\text{Na}}$  inducido a 0 mV en presencia de TTX (1  $\mu\text{M}$ ). h Curva  $I_{\text{Na}}$ -V determinada en el pico de corriente (n = 26). f, h La línea continua superpuesta sobre los datos representa la función de activación:  $I_a(V) = G_{\text{max}} (V - V_{\text{rev}}) / \{1 + \exp[(V_a - V)/k_a]\}$ , donde  $G_{\text{max}}$  es la conductancia máxima,  $V_{\text{rev}}$  es la inversión aparente de potencial,  $V_a$  es el potencial que induce la mitad del aumento máximo de conductancia y  $k_a$  es el factor de pendiente. i Inactivación de  $I_{\text{Na}}$  evocada a un potencial de -90 mV; se presentan únicamente las señales sin pre-impulso (-90 mV) y con un pre-impulso de -70 -60, -30, -40 y 30 mV. j Curva de inactivación normalizada para  $I_{\text{Na}}$ , la línea continua superpuesta sobre los datos representa la función de inactivación:  $I_h(V) = 1 / \{1 + \exp[-(V_h - V)/k_h]\}$ , donde  $V_h$  es el potencial que desencadena la mitad de la corriente máxima y  $k_h$  es el factor de pendiente para la inactivación. Para comparación, la curva registrada a la derecha se refiere a la activación.

25

**[0023]** De acuerdo con la invención, las células CD24+ CD133+ también se aislaron mediante purificación con separación inmunomagnética a partir de tejido de riñón total digerido con colagenasa y lo mismo se realizó también para células CD24- CD133-.

30  
35

**[0024]** En este caso, las células de interés se obtuvieron mediante purificación de la suspensión de células, obtenidas como se ha descrito anteriormente, para CD133 y después para CD24 o viceversa. De esta forma, es posible obtener prácticamente todas las células CD24+ CD133+. La población obtenida mediante estos diversos métodos consiste en una población mixta de células de cápsula de Bowman y de células obtenidas a partir de túbulos de riñón raros que expresan CD133 y CD24. En conjunto, la población de células CD24+ CD133+ representa aproximadamente el 0,5-9% de todas las células de riñón residentes y varía entre individuos. Todos los experimentos descritos anteriormente también se repitieron con una población CD24+ CD133+ obtenida con los diversos métodos de separación inmunomagnética enumerados anteriormente y confirmaron que los riñones contienen una población de células madre adultas dotadas con capacidad regenerativa y de amplificación, caracterizadas por co-expresión de marcadores CD133 y CD24, obtenidas en su mayor parte a partir del polo urinario de la cápsula de Bowman y una parte mucho menor a partir de las células tubulares renales.

40

**[0025]** Además, la presente invención se refiere a composiciones para uso terapéutico, que contienen células madre de riñón que son capaces, como se ha descrito anteriormente de co-expresar los marcadores CD133+ y CD24+ que están dotadas de capacidad regenerativa tubulogénica, adipogénica, osteogénica y neurogénica.

45

**[0026]** Adicionalmente, la invención se refiere al uso de dichas células para la preparación de composiciones útiles para reparar el daño de riñón.

50  
55  
60  
65

**[0027]** Se ha usado un modelo de necrosis tubular aguda en ratones SCID para ensayar si las células madre identificadas por los solicitantes, aisladas a partir de riñón humano adulto, pueden regenerar tejido de riñón dañado. Este modelo implica la inyección intramuscular de glicerol hipertónico que provoca miólisis y hemólisis masiva, dando como resultado daño tubular grave e insuficiencia renal aguda. El daño tubular alcanza su pico el tercer día después de la inyección y luego espontáneamente regresa después de aproximadamente 10 días. El alcance del daño inducido se evaluó mediante tinción de hematoxilina/eosina, que muestra necrosis extensiva de células epiteliales tubulares, la formación de cilindros tubulares de hialina, pérdida del borde en cepillo de los túbulos proximales y achatamiento del epitelio tubular. En el tercer y cuarto día, un grupo de 8 ratones se inoculó en la vena de la cola con  $1,5 \times 10^6$  células CD24+ CD133+, mientras que otro grupo de 8 ratones se inoculó con solución salina y un tercer grupo de 8 ratones se inoculó con  $1,5 \times 10^6$  células de riñón CD24- CD133-, usando el mismo procedimiento. La integración de células madre CD24+ CD133+ en los túbulos dañados se demostró mediante el uso de células marcadas con el colorante fluorescente PKH26 (rojo) y el marcaje simultáneo de túbulos proximales y distales con LTA y "Aglutinina de *Dolicholus Biflorus*", respectivamente. Además, la integración de la población de células madre en las estructuras tubulares se confirmó mediante una técnica inmunohistoquímica que hizo uso del antígeno HLA-I específico de células humanas y citoqueratina como marcador de células epiteliales general. Al final, se usó el método FISH para el cromosoma Y para detectar células de riñón de donantes humanos macho inoculadas en ratones SCID hembra. Los resultados de los tres métodos demostraron la integración selectiva de células CD24+ CD133+ en túbulos renales de ratones SCID inyectados. No se pudo demostrar la integración en ratones inyectados con solución salina o en aquellos inyectados con células de riñón humano CD24- CD133-, como se muestra en la Fig. 7, cuyas imágenes diversas se describen a continuación con detalle:

a) Microscopía clásica que muestra tejido de riñón de un ratón normal teñido con hematoxilina/eosina (H&E, izquierda) o con faloidina (verde, derecha) (Bar 50  $\mu\text{m}$ ).

b) Daño tubular necrótico observado después de inyección intramuscular de glicerol, como se muestra mediante tinción de H&E (izquierda) o faloidina (derecha), la última mostrando pérdida del borde en cepillo y achatamiento de las células epiteliales (verde, Bar 50  $\mu\text{m}$ ).

c) Fotomicrografía representativa que muestra un corte de riñón a partir de un ratón SCID con insuficiencia renal aguda inyectado con células de riñón CD24- CD133- humanas; la tinción con LTA no muestra células teñidas de rojo mediante microscopía confocal (Bar 20  $\mu\text{m}$ ).

d) Fotomicrografía representativa que muestra un corte de riñón de un ratón con insuficiencia renal aguda inyectado con células CD24+ CD133+ tratado con marcador PKH26 (rojo), teñido con LTA (verde), como se muestra mediante microscopía confocal. Las flechas pequeñas indican la presencia de muchas células rojas. La flecha grande indica un túbulo proximal (Bar 20  $\mu\text{m}$ ).

e) Aumento mayor del corte de riñón en d) que muestra la regeneración de una estructura tubular proximal (Bar 20  $\mu\text{m}$ ).

f) Aumento mayor de otro corte de riñón obtenido a partir de un ratón SCID con insuficiencia renal aguda inyectado con células PEC CD24+ CD133+ tratado con marcador PKH26 (rojo) y teñido con DBA en la superficie basal de dos estructuras tubulares (verdes), que muestra la regeneración de una estructura de túbulo colector (flecha). Otras estructuras tubulares teñidas mediante PKH26, pero no el marcador de conducto colector DBA, son visibles. (Bar 20  $\mu\text{m}$ ).

g) Tinción inmunohistoquímica doble para citoqueratina (azul) y antígenos HLA de clase I humanos (rojo) en riñones de ratones SCID con insuficiencia renal aguda inducida por glicerol (ARF). Panel izquierdo: ausencia de señal roja en los túbulos de un corte de riñón a partir de un ratón inyectado con células CD24- CD133-; paneles intermedio y derecho: tinción de células positivas para antígenos HLA de clase I humanos (rojo, flecha) en túbulos que expresan citoqueratina (azul) de ratones SCID con insuficiencia renal aguda (ARF) inducida por glicerol después de inyección de células PEC CD24+ CD133+.

h) Detección del cromosoma Y mediante técnica FISH en ratones de control inyectados con solución salina (panel izquierdo) y en riñones de ratones hembra inyectados con células CD24+ CD133+ obtenidos a partir de riñones de macho humano (rojo, paneles intermedio y derecho) (Bar 20  $\mu\text{m}$ ). La identificación de esta población en el riñón y la demostración de su capacidad de reparación, tiene implicaciones importantes en el campo de la medicina regenerativa, para la terapia de patologías renales.

**[0028]** Finalmente, el potencial de reparación *in vivo* de la población de células madre de riñón pluripotenciales CD24+ CD133+ y la consiguiente recuperación de la funcionalidad de riñón se ha evaluado mediante dos enfoques experimentales diferentes. De hecho, se midió azotemia en diversos momentos a continuación de la inyección de glicerol, tanto en ratones tratados con células CD24+ CD133+ como en aquellos inyectados con solución salina. En comparación con los ratones inyectados con solución salina, los ratones tratados con células CD24+ CD133+ mostraron, 14 días después de la inyección con glicerol, valores de azotemia significativamente menores que eran completamente comparables con valores medidos en los mismos ratones antes de la inducción de daño renal. Adicionalmente, la presencia de áreas fibróticas se evaluó mediante tinción "alfa-SMA" en los mismos ratones 14 días después de la inyección de glicerol. El grupo de ratones sometidos a inyección de células CD24+ CD133+ mostró una extensión significativamente menor de las áreas fibróticas en comparación con el grupo de ratones inyectados con solución salina, como se muestra en la Fig. 8, cuyas imágenes diversas se describen a continuación con detalle:

a. Niveles de nitrógeno en sangre (BUN) se midieron en diversos intervalos en ratones tratados con glicerol que recibieron solución salina (línea roja) o células CD24+ CD133+ (línea negra). Las columnas representan valores de media  $\pm$  DT.  $n = 8$  para cada punto de tiempo; total 80 ratones.  $*p < 0,01$  y  $**p < 0,001$  frente a glicerol + solución salina en los mismos momentos.

b. Comparación de niveles de nitrógeno en sangre (BUN) entre ratones sanos (blanco), ratones tratados con solución salina (gris claro) y ratones tratados con células CD24+ CD133+ (gris oscuro) el día 14.

c. Fotomicrografía representativa de riñones de ratones tratados con solución salina, teñidos para la presencia de  $\alpha$ -SMA (verde). Los núcleos se tiñen con To-Pro-3 (Bar 100  $\mu\text{m}$ ).

d. Fotomicrografía representativa de riñones de ratones tratados con células CD24+ CD133+ y teñidos para la presencia de  $\alpha$ -SMA (verde). Los núcleos se tiñen con To-pro-3 (Bar 100  $\mu\text{m}$ ).

**REIVINDICACIONES**

1. Células madre de riñón **caracterizadas por que** las mismas co-expresan CD133 y CD24.
- 5    2. Células de riñón de acuerdo con la reivindicación 1 **caracterizadas por que** las mismas se originan a partir de la cápsula de Bowman.
3. Composición que comprende células madre de riñón de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2.
- 10   4. Proceso para aislamiento de células madre renales de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, en el que:
  - los glomérulos renales se aislaron mediante una técnica de separación convencional que emplea tamices con permeabilidad diferente;
  - 15   - la suspensión glomerular obtenida de este modo se cultivó directamente en placas plásticas que contenían EGM®-MV complementado con FBS al 20%;
  - se aislaron las células que salen de los glomérulos en cultivo y expresan marcadores CD133 y CD24.
- 20   5. Proceso para el aislamiento de células de acuerdo con las reivindicaciones 1-2 mediante separación inmunomagnética a partir de tejido de riñón completo digerido con colagenasa, usando marcadores CD133 y CD24.
6. Uso de población de células madre de acuerdo con la reivindicación 1-2 para la preparación de una composición para reparación de daño de riñón.



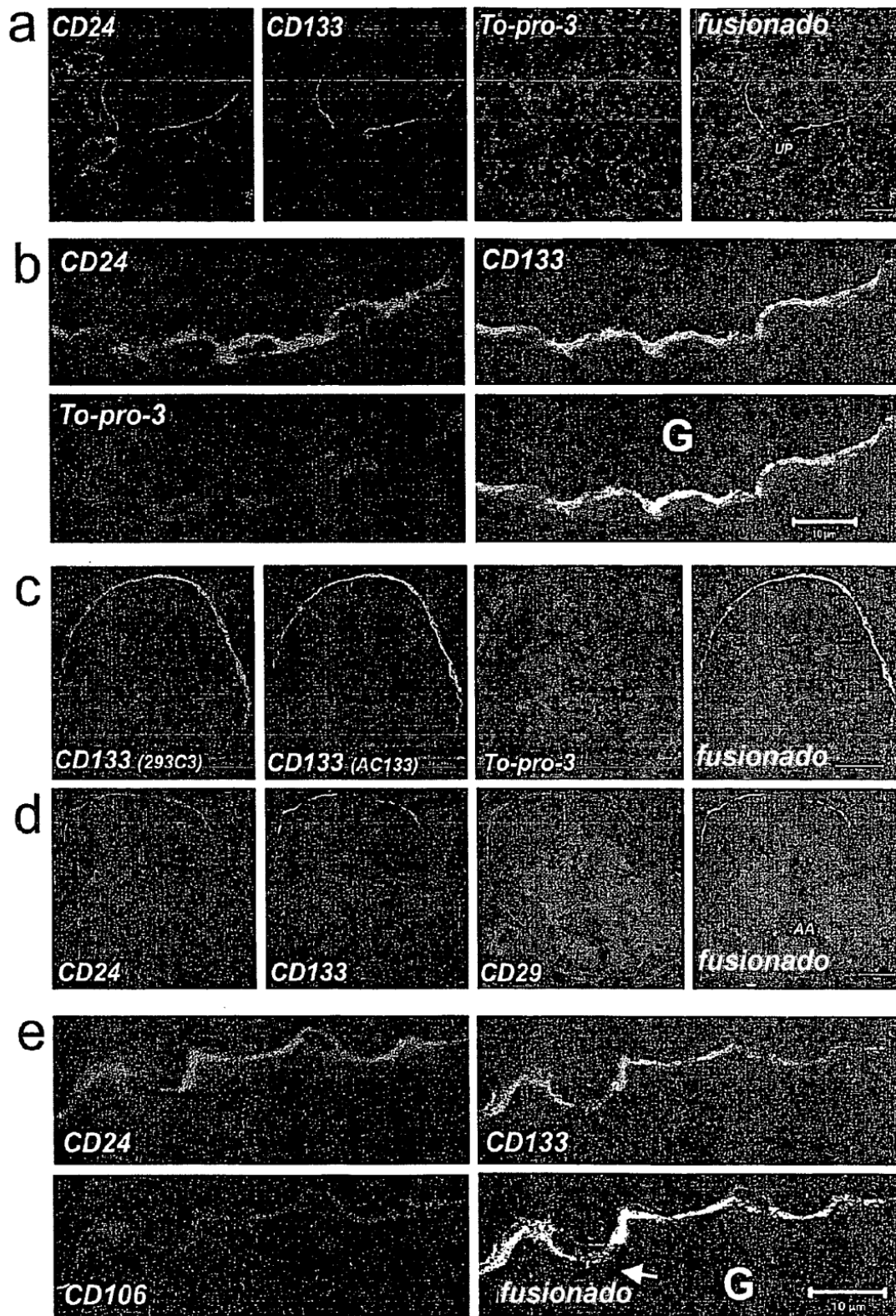


Fig. 1

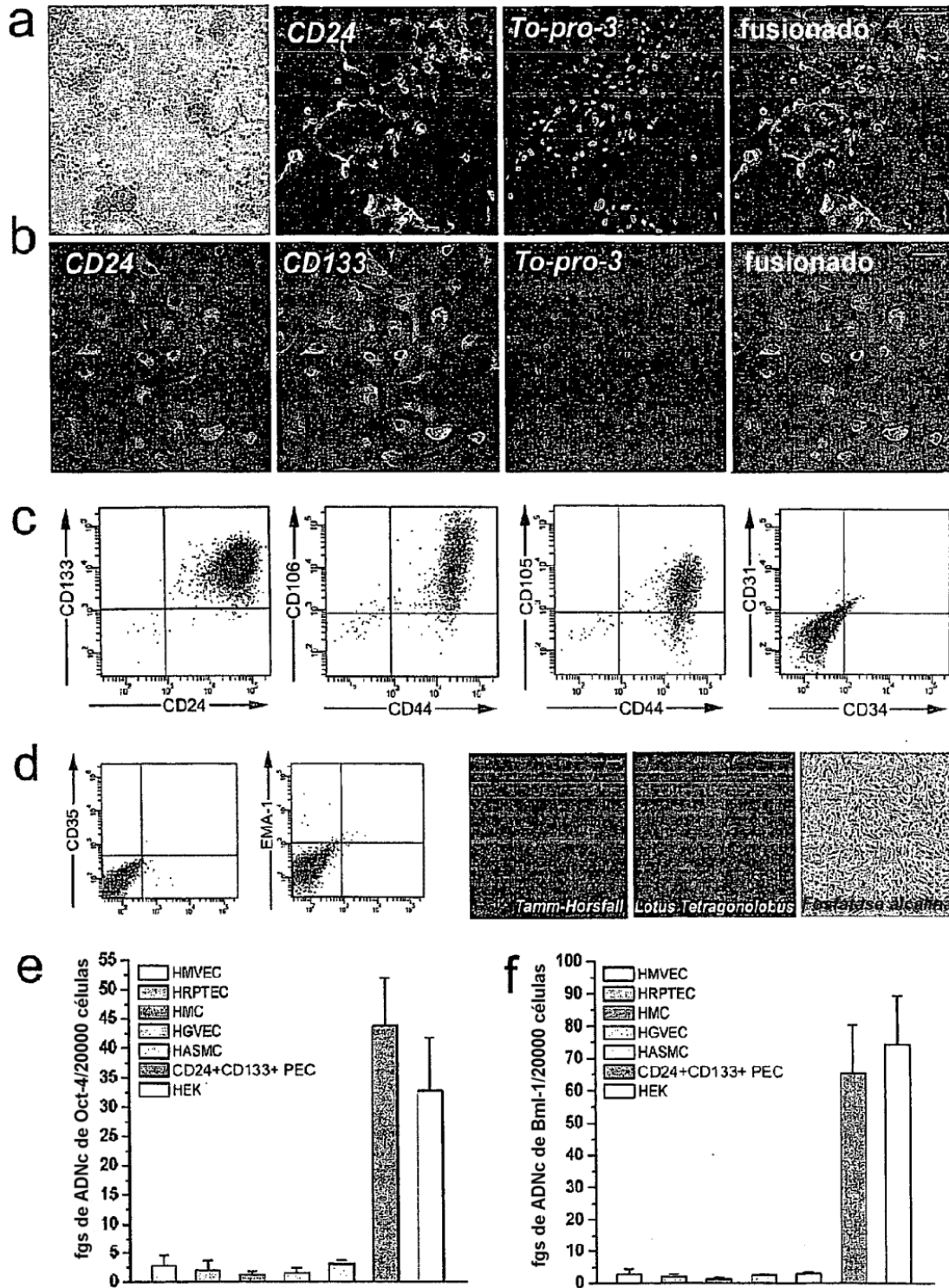
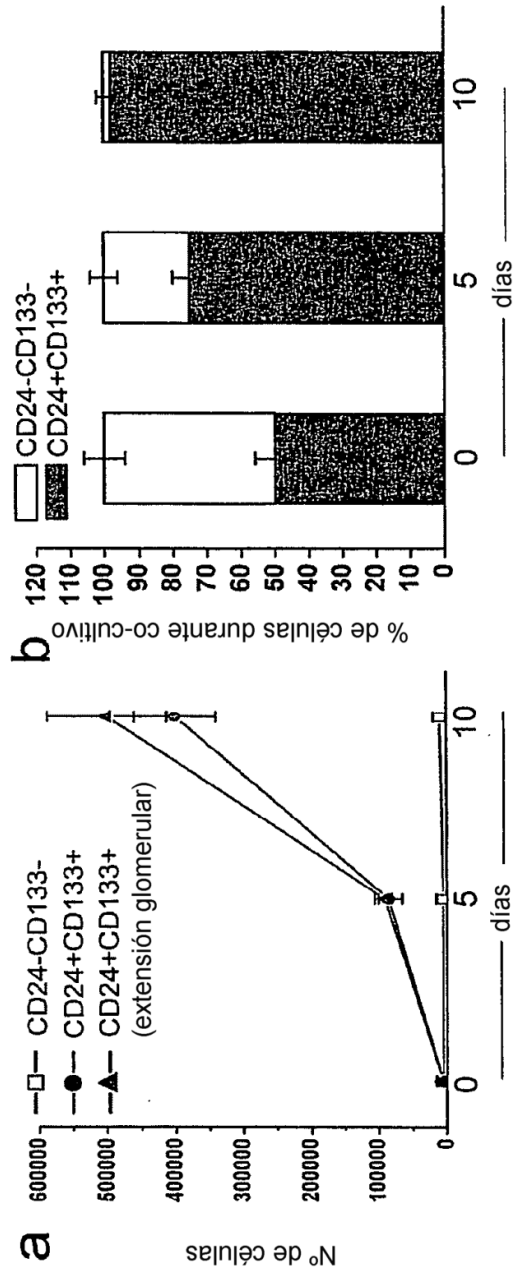


Fig. 2

Fig. 3



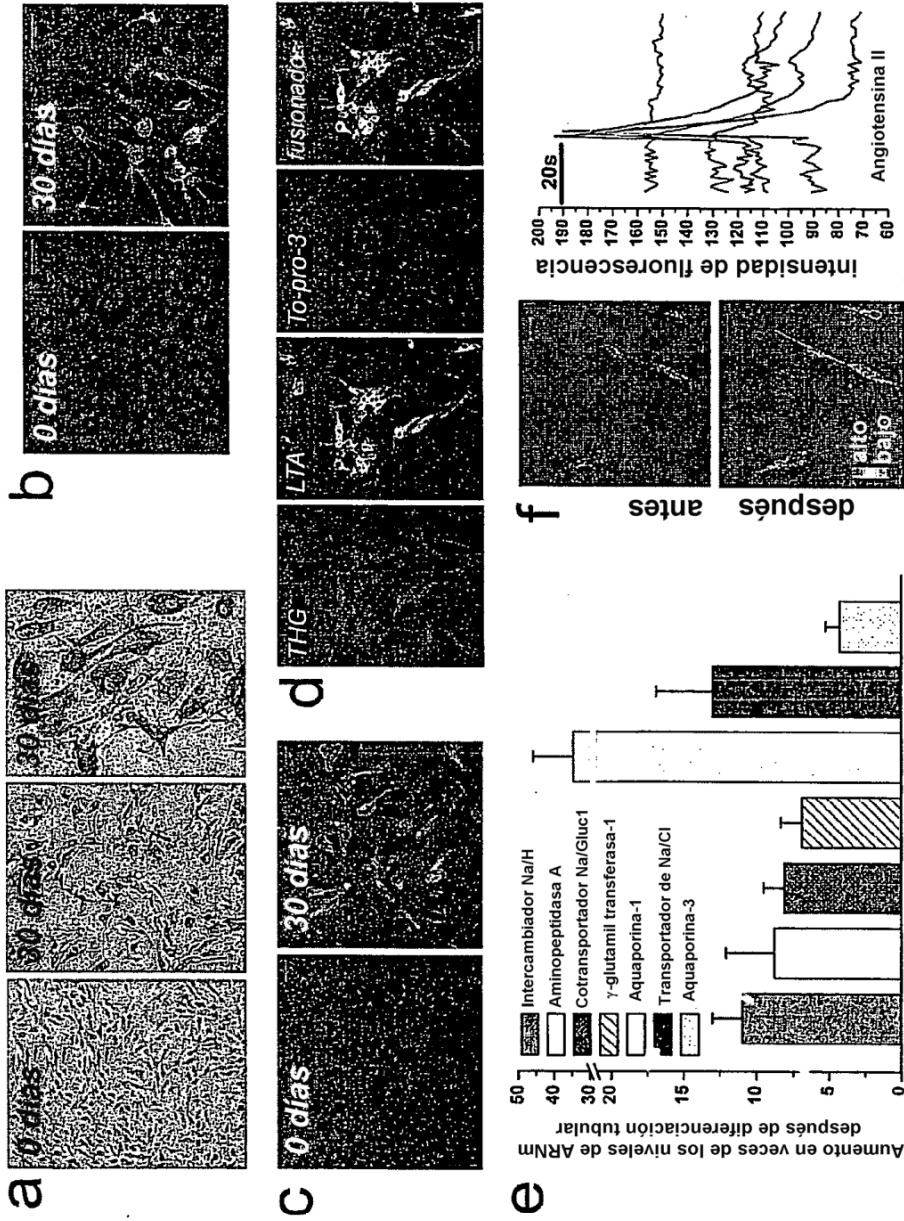


Fig. 4

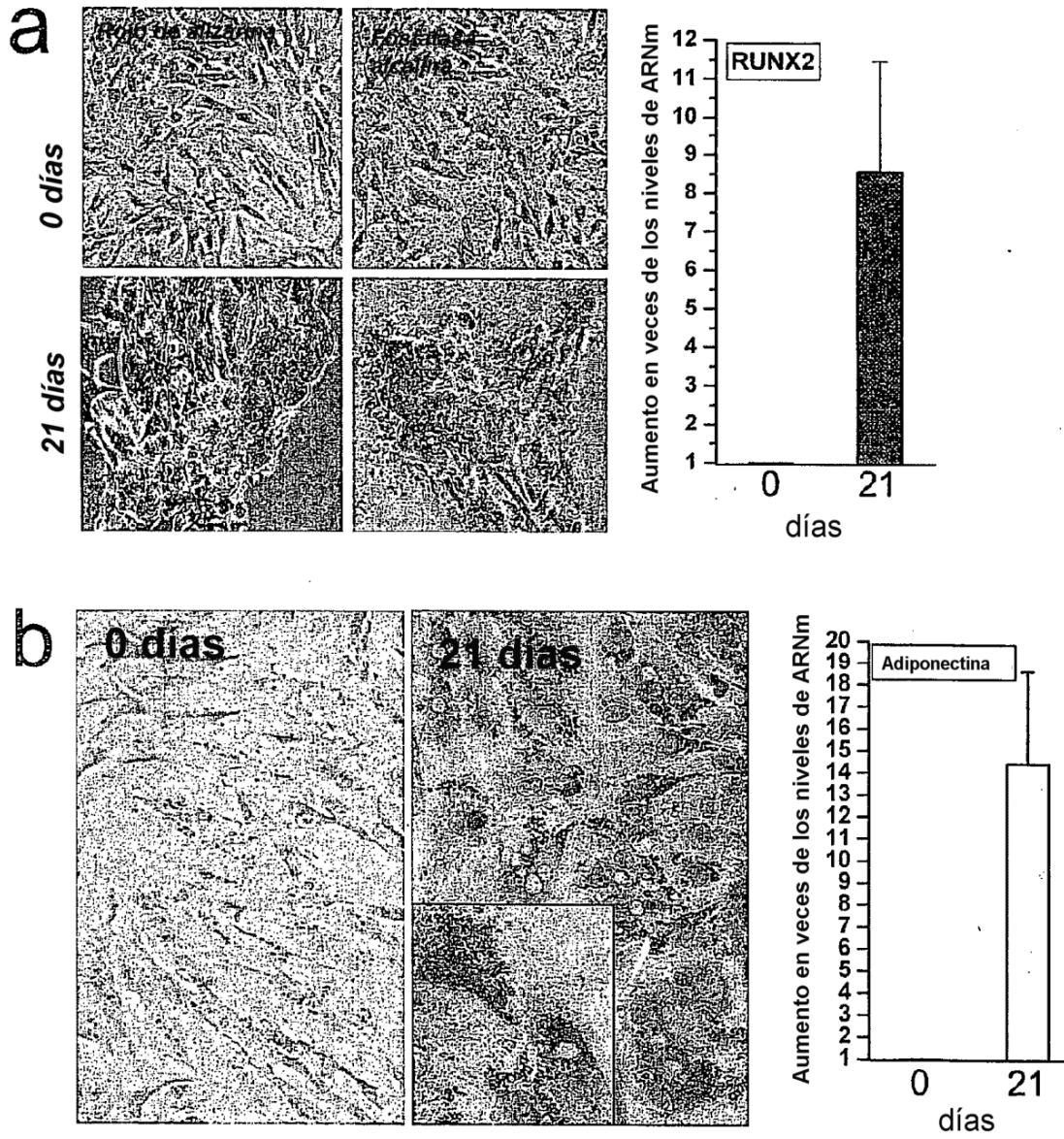
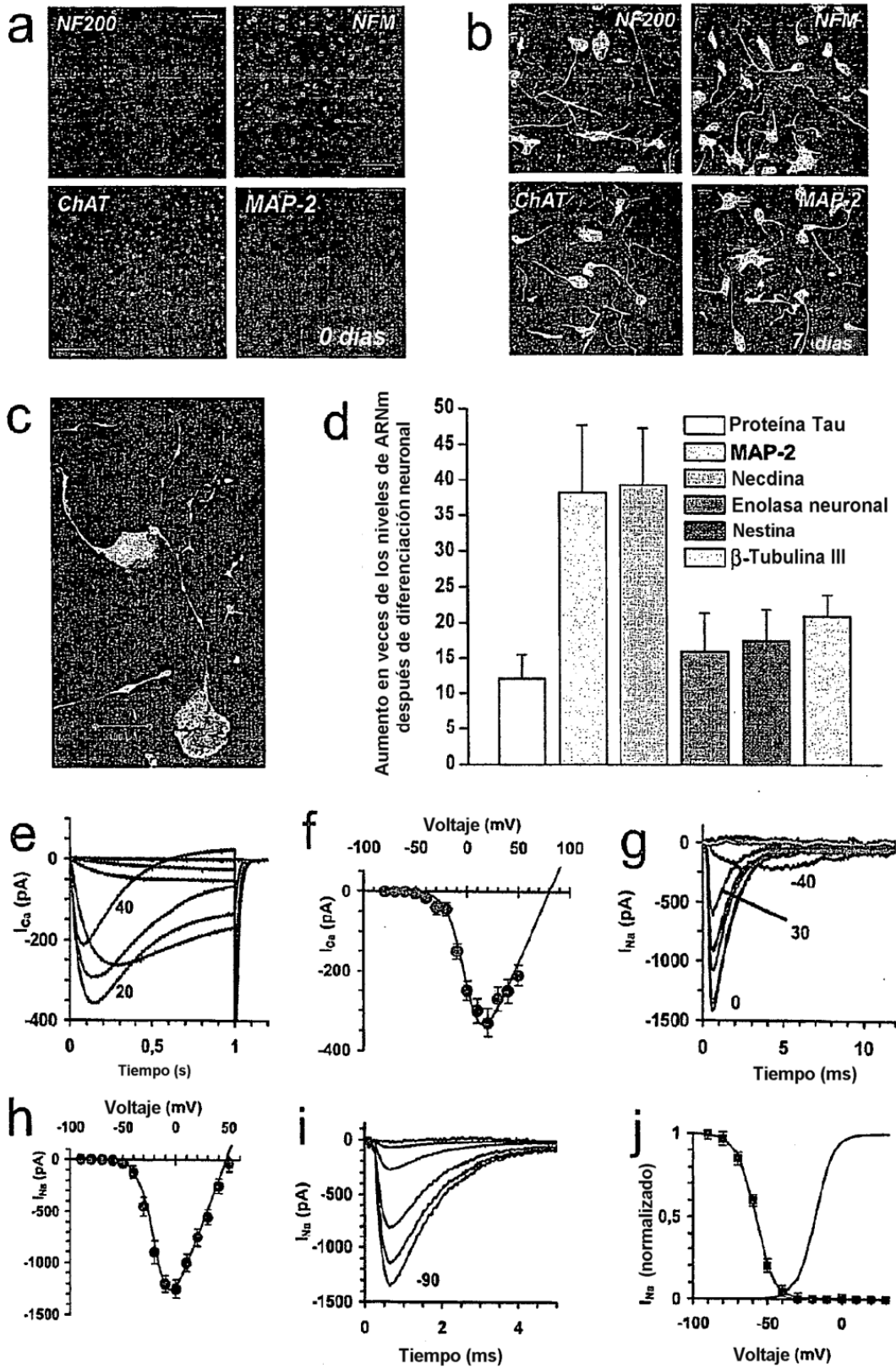


Fig. 5



**Fig. 6**

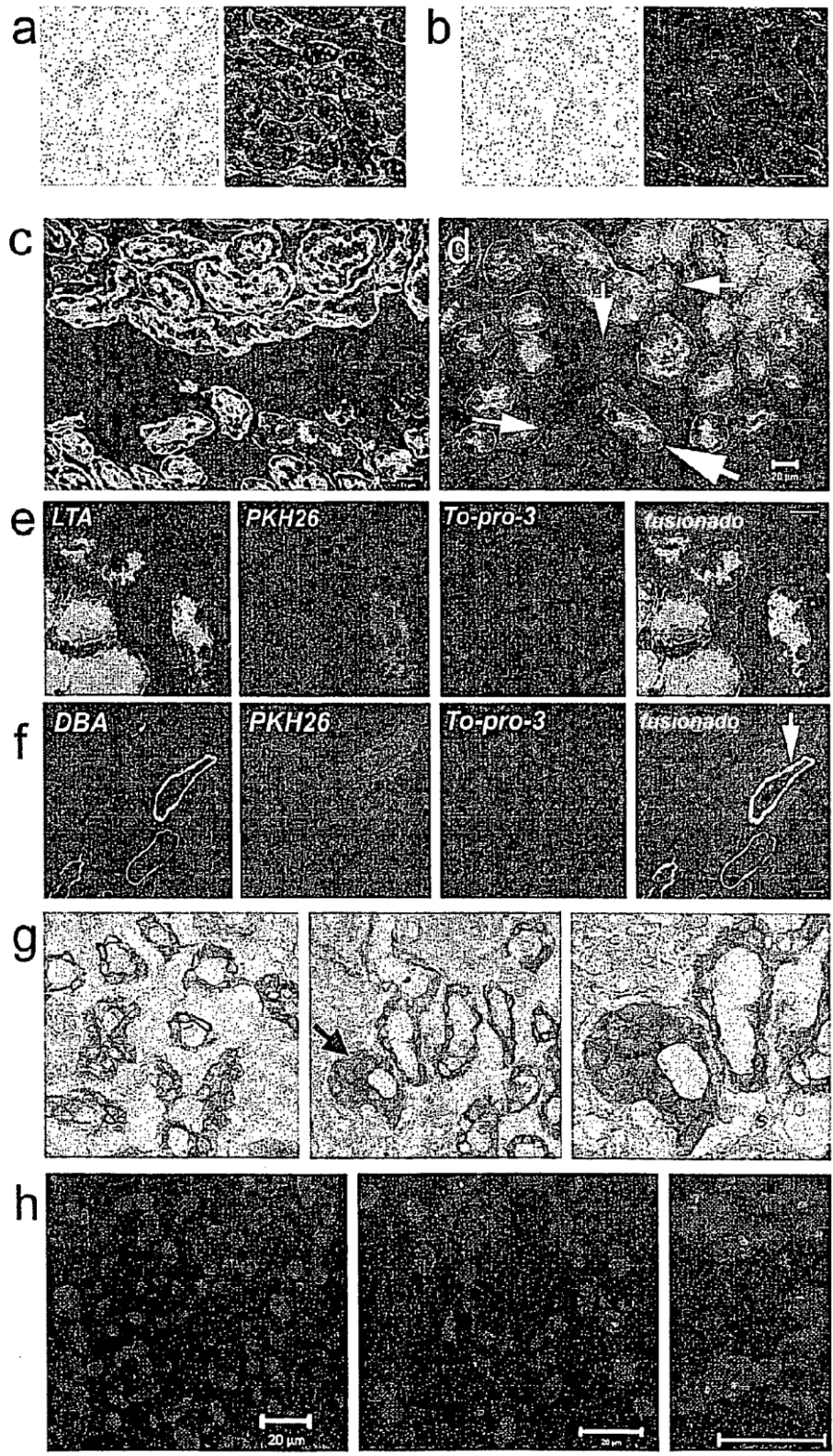


Fig. 7

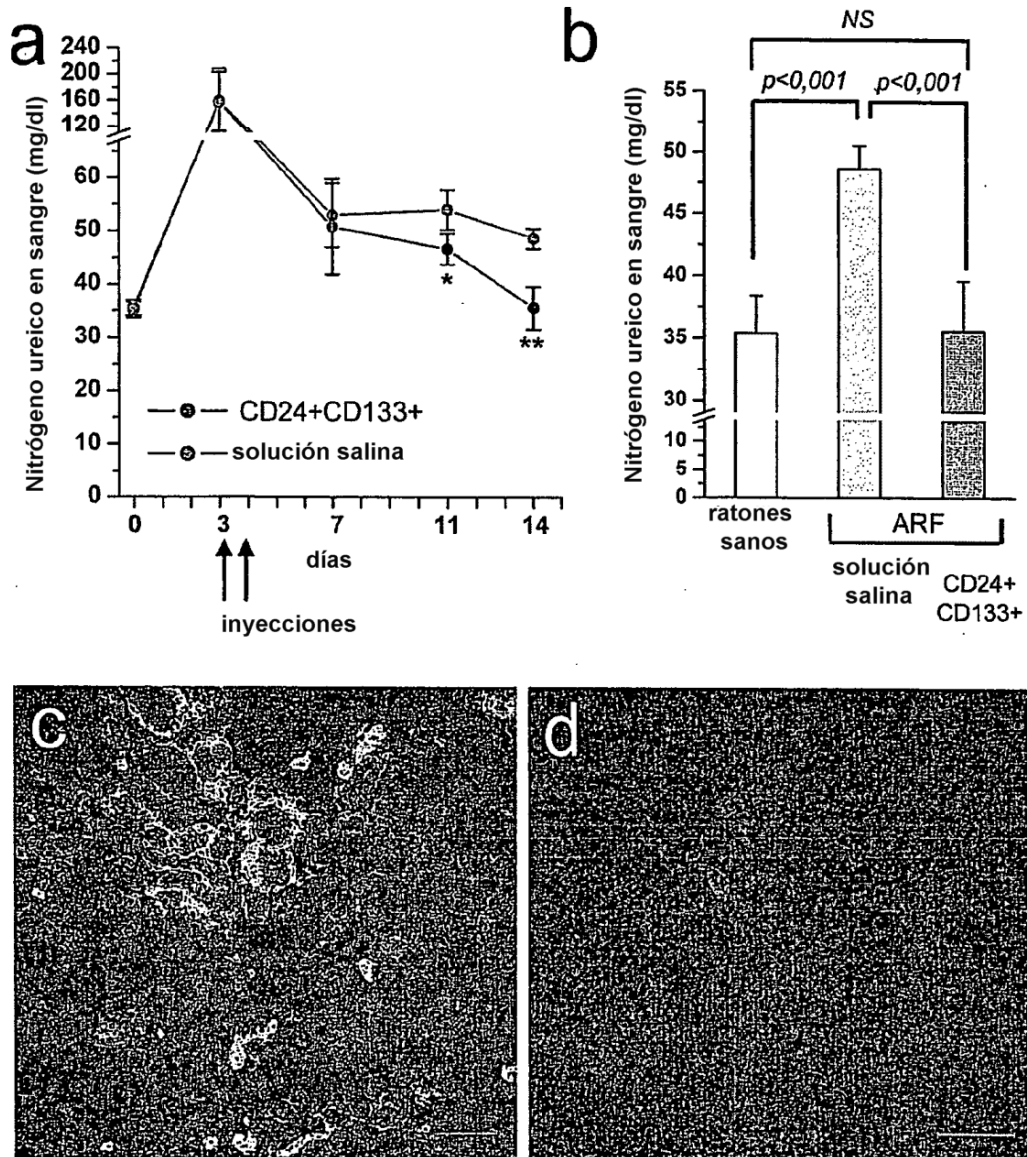


Fig. 8