(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 432 395**

(51) Int. Cl.:
C12N 5/074 (2010.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.10.2007** **E 07852651 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013** **EP 2078073**

(54) Título: **Células derivadas de riñon y metodo de uso en la reparación y regeneración tisular**

(30) Prioridad:

12.10.2006 US 829238 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.12.2013

(73) Titular/es:

ETHICON, INC. (100.0%)
US ROUTE 22
SOMERVILLE, NJ 08876-0151, US

(72) Inventor/es:

COLTER, DAVID C.;
SEYDA, AGNIESZKA;
BUENSUCESO, CHARITO S. y
GOSIEWSKA, ANNA

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO FACES, José

ES 2 432 395 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).

Células derivadas de riñon y metodo de uso en la reparación y regeneración tisular

Descripción

REMISIÓN RELATIVA A LA APLICACIÓN

[0001] Esta aplicación cuenta con el beneficio de los artículos Nro. 60/829,238 de la Aplicación Provisional de Estados Unidos archivados el 12 de octubre de 2006.

ESPECIALIDAD

[0002] El invento, en términos generales, se aplica a las poblaciones de células aisladas o purificadas derivadas de riñón humano, provenientes de tejido de riñón de mamífero. El invento, asimismo, se relaciona con los métodos para el aislamiento y la purificación de la población de células derivadas de riñón humano. También se provee la población de células del invento para su uso en un método para el tratamiento de la enfermedad del riñón.

ANTECEDENTES

[0003] Los daños nefrotóxicos e isquémicos al riñón llevan a la insuficiencia renal aguda y muy frecuentemente se manifiestan como una necrosis tubular aguda. La recuperación de la función renal luego de una insuficiencia renal aguda depende del reemplazo de las células tubulares necróticas por epitelio tubular funcional. Además, luego de daño isquémico, se observa una pronunciada respuesta proliferativa del endotelio capilar glomerular y peritubular. La ausencia o reducción de regeneración epitelial y endotelial puede predisponer a un paciente a la cicatrización renal túbulointersticial y la enfermedad renal crónica. Primariamente, el origen de las nuevas células renales generadas es indefinido, pero por analogía con otros órganos, se ha sugerido que las células pluripotentes órgano- específicas (es decir, células madre renales) son precursoras de células nuevas. Sin embargo, falta identificar las células progenitoras renales adultas. Bussolati y otros, Consejo Americano de Patología, 166: 545-555, 2005.

[0004] La evidencia no es conclusiva para demostrar el aislamiento y cultivo las células progenitoras renales. Sin embargo, algunos laboratorios han hecho algunos intentos de identificar y aislar dichas células. Por ejemplo, un estudio en roedores mostró que la papila renal es un nicho para células madre de riñón adulto. Otros experimentos demostraron que las células papilares renales aisladas poseen algún grado de diferenciación multipotencial y cuando son inyectadas directamente en la corteza renal, se injertan en el parénquima del riñón. Estos resultados sugieren que la papila renal es un nicho para una población de células progenitoras renales implicadas en el mantenimiento y la reparación del riñón. Sin embargo, debe aun determinarse la existencia de este nicho progenitor en los riñones humanos. Oliver y otros, J. of Clinical Investigation, 114: 795-804, 2004. Solicitud de Patente Internacional PCT No. W02005/021738.

[0005] Se ha aislado células progenitoras humanas putativas de tejido renal de riñón cadavérico. El aislamiento de estas células se basó en una separación de células con bolas magnéticas dirigidas al marcador de superficie CD133. Otros experimentos mostraron que las células CD133+ derivadas del riñón tienen la capacidad de expandirse en el cultivo y diferenciarse in vitro en células epiteliales o endoteliales. Al implantarse en ratones SCID, las células CD133+ formaron estructuras tubulares que expresaban marcadores epiteliales renales. Además, la inyección intravenosa en ratones con tubulonecrosis inducida por glicerol, las células CD133+ migraron y se integraron al tejido renal dañado. Bussolati y otros, Consejo Americano de Patología, 166: 545-555, 2005. Estos datos indican que existen presentes células progenitoras en el tejido del riñón humano y es posible que jueguen un rol en la reparación renal. Sin embargo, la población residente de células CD133+ en el tejido del riñón humano es muy baja y por tanto poco práctica para la terapia celular con base alogénica. Un método reciente para identificar células madre órgano–específicas utilizó métodos de aislamiento basados en la habilidad de las células progenitoras para producir el flujo de salida del colorante Hoechst 33342. Las células que demuestran esta habilidad han sido denominadas células SP y han mostrado diversos grados de características de células madre. Los estudios han mostrado que el intersticio renal de los riñones de roedores contiene células SP. Además, se inyectó células SP de riñón en ratones con insuficiencia renal aguda. Hishikawa y otros, J. of Cell Biology, 169: 921-928, 2005. Aparentemente estas células migraron al espacio intersticial y jugaron un rol en la reparación del tejido renal dañado. Sin embargo, falta determinar la existencia de células SP en el tejido de riñón humano. Existe la necesidad de mejorar la fuente de células derivadas de riñón humano o de mamífero para su uso en terapia celular, que puedan ser aisladas de tejido de riñón humano o de mamífero y desarrollado en un cultivo celular.

RESUMEN

[0006] Este invento provee una población de células aisladas o purificadas derivadas de riñón humano de tejido de riñón humano. Se proveen métodos para el aislamiento y purificación de la población de células derivadas de riñón humano. Una población particular de células derivadas de riñón humano tiene determinadas características fenotípicas, por ejemplo la morfología, el potencial de crecimiento, el fenotipo de marcador de superficie, la expresión temprana de genes y la expresión de genes de desarrollo del riñón. Tanto el fenotipo de marcador de superficie como el de expresión de genes se conservan luego de los múltiples pasajes de la población de células

derivadas de riñón humano en un cultivo.

[0007] En un aspecto de la invención se provee una población de células aisladas o purificadas derivadas del riñón humano, siendo que dicha población de células capaz de auto-renovación y expansión en el cultivo, en el que la población de células es positiva para la expresión de marcadores de superficie celular HLAI y CD44 y al menos uno de Oct-4, Rex-1, Pax-2, Cadherin-11, FoxD1, WT1, Eya1, HNF3B, CXC-R4, Sox-17 EpoR, BMP2, BMP7, o GDF5 y negativa para la expresión de marcadores de superficie celular CDI33, E-codherin, y Wnt-4 y al menos uno de Sox2, FGF4, hTert, SIX2 o GATA-4.

[0008] Otro aspecto de la población de células aisladas o purificadas derivadas de riñón humano, es que es positiva para al menos uno de los marcadores de superficie celular CD24, CD29, CD49c, CD73, CD166, o SSEA-4, negativa para al menos uno de los marcadores de superficie celular HLA II, CD31, CD34, CD45, CD56, CD80, CD86, CD104, CD105, CD117, CD138, o CD141. La población de células preferentemente es no inmunogénica para transplante alogénico en un sujeto humano. La población de células derivadas de riñón humano puede secretar al menos uno de los factores tróficos FGF2, HGF, TGFα, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 o VEGF. Preferiblemente la población de células no secreta al menos uno de los factores tróficos PDGF-bb o IL12p70.

[0009] La población de células derivadas de riñón humano pueden derivar de la región subcapsular del riñón, de la corteza o de la médula del riñón. La población de células derivadas de riñón humano puede incluir células progenitoras renales.

[0010] La población de células del invento puede usarse para tratar enfermedad isquémica del riñón en un sujeto humano donde el tratamiento implica administrar al sujeto humano una cantidad terapéuticamente efectiva de población de células aisladas o purificadas derivadas de riñón humano, tal como se describe más arriba, por ende reduciendo o eliminando la enfermedad isquémica del riñón en el sujeto humano.

[0011] También se provee la población de células del invento para su uso en un método de reemplazo de tejidos, órganos, componentes o estructuras renales que estén dañados debido a un trauma, la edad, una herida metabólica o tóxica, enfermedad o pérdida idiopática en un sujeto humano. El método comprende la administración a un sujeto humano de una cantidad terapéuticamente efectiva de una población de células aisladas o purificadas derivadas de riñón humano, por ende reduciendo o eliminando los tejidos u órganos dañados, y restaurando la función del riñón en el sujeto humano.

[0012] Otro aspecto del invento se relaciona con el método para aislar o enriquecer selectivamente la población de células derivadas de riñón humano. Este método consiste en obtener tejido de la región subcapsular, la corteza o la médula del riñón humano, incubar el tejido en presencia de una metaloproteasa, una proteasa neutra o una enzima mucolítica, sembrar las células en un recipiente de cultivo de tejido, identificar la población de células que es positiva para la expresión de los marcadores de superficie celular HLAI CD44 y al menos uno de Oct4, Rex-1, Pax-2, Cadherina-11, FoxD1, WT1, Eya1, HNF3B, CXC-R4, Sox-17, EpoR, BMP2, BMP7, o GDF5 y negativo para la expresión de los marcadores de superficie celularCDI33, E-codherin, v Wnt- 4 y al menos uno de Sox2, FGF4, hTert, SIX2 o GATA-4 y aislar la población de células derivadas de riñón humano. Otro aspecto de la población de células es que es positiva para al menos uno de los marcadores de superficie celular CD24, CD29, CD49c, CD73, CD166, o SSEA-4, y negativo para al menos uno de los marcadores de superficie celular HLA II, CD31, CD34, CD45, CD56, CD80, CD86, CD104, CD105, CD117, CD138, o CD141.

[0013] También se provee la población de células del invento para su uso en el tratamiento de una enfermedad en sujetos mamíferos con terapia de genes., donde dichas células se preparan proveyendo una población de células aisladas derivadas de riñón de mamífero, derivado de tejido de riñón humano como se describe más arriba, alterando genéticamente la población de células aisladas o purificadas derivadas de riñón humano para producir un producto de genes terapéutico y expandiendo las células alteradas genéticamente en el cultivo. Dicho tratamiento comprende la administración de células alteradas genéticamente para conseguir el producto genético deseado en el sujeto humano y para reducir o eliminar la enfermedad en el sujeto humano.

[0014] Otro aspecto es que se provee un método para la detección de una posible droga, candidata a tratar una afección que implica las células renales del sujeto humano, cuyos pasos son:

(a) preparar una población de células aisladas o purificadas derivadas de riñón humano, derivada de células de riñón humano tejido renal del paciente, siendo dicha célula capaz de autorenovación y expansión en el cultivo, donde la población de células es positiva para la expresión de los marcadores de superficie celular HLA I y CD44, y al menos para uno de Oct-4, Rex-1, Pax-2, Cadherina-11, FoxD1, WT1, Eya1, HNF3B, CXC-R4, Sox-17, EpoR, BMP2, BMP7, o GDF5 y negativa para la expresión de los marcadores de superficie celular CDI33, E-cadherina, y Wnt-4, y al menos para uno de Sox2, FGF4, hTert, SIX2, o GATA-4; (b) cultivar la población de células derivadas de riñón humano bajo condiciones de proliferación para obtener una composición celular que comprenda células con potencial o potencial aumentado de auto-renovación y expansión in vitro; (c) exponer las células cultivadas en (a) o (b) a una posible droga candidata: y (d) detectar la presencia o ausencia de algún efecto de la posible droga candidata sobre la

supervivencia de las células, en una característica morfológica, funcional o fisiológica y/o una propiedad biológica molecular de dichas células, donde un efecto que altere la supervivencia de las células, una característica morfológica, funcional o fisiológica y/o una propiedad biológica molecular de las células indique la actividad de la posible droga candidata. Otro rasgo de la población de células es que es positiva para al menos uno de los marcadores de superficie celular CD24, CD29, CD49c, CD73, CD166, o SSEA-4, y negativa para al menos uno de los marcadores de superficie celular HLA II, CD31, CD34, CD45, CD56, CD80, CD86, CD104, CD105, CD117, CD138 o CD141.

[0015] También se provee un método para analizar la toxicidad de una sustancia de ensayo para afectar la auto-renovación y la expansión en el cultivo de una población de células aisladas o purificadas derivadas de riñón humano. Este método comprende los pasos: (a) cultivar la población de células aisladas o purificadas derivadas de riñón humano, derivada de tejido de riñón humano, siendo dicha célula capaz de auto-renovación y expansión en el cultivo donde la población de células es positiva para la expresión de los marcadores de superficie celular HLA I y CD44 y al menos uno de Oct-4, Rex-1, Pax-2, Cadherina-11, FoxD1, WT1, Eya1 HNF3B, CXC-R4, Sox-17, EpoR, BMP2, BMP7, o GDF5 y negativa para la expresión de marcadores de superficie celular CDI33, E-cadherina, y Wnt-4, y al menos uno de Sox2, FGF4, hTert, SIX2 o GATA-4; (b) exponer las células cultivadas en el paso (a) para probar una sustancia; y (c) detectar la presencia o ausencia de algún efecto de la sustancia de ensayo sobre la supervivencia de las células o sobre una característica morfológica, funcional o fisiológica y/o una propiedad biológica molecular de las células, donde un efecto que altere la supervivencia de la célula, una característica morfológica, funcional o fisiológica y/o una propiedad biológica molecular de las células indique la actividad de la sustancia de ensayo. La población de células puede ser positiva para al menos uno de los marcadores de superficie celular CD24, CD29, CD49c, CD73, CD166, o SSEA-4, y negativa para al menos uno de los marcadores de superficie celular HLA II, CD31, CD34, CD45, CD56, CD80, CD86, CD104, CD105, CD117, CD138 o CD141.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Resumen

[0016] Este invento provee una población de células aisladas o purificadas derivadas de riñón humano, proveniente de tejido de riñón humano. Se provee métodos para aislar y purificar células de tejido de riñón humano. Una población particular de células derivadas de riñón humano tiene determinadas características fenotípicas, por ejemplo: la morfología, el potencial de crecimiento, el fenotipo de marcador de superficie, la expresión de genes del desarrollo del riñón, la expresión de genes de desarrollo temprano, o la expresión de genes renoprotectores Tanto los fenotipos de los marcadores de superficie como los de la expresión de genes se retienen luego de múltiples pasajes aun de la población celular derivadas de riñón humano en el cultivo.

[0017] Se provee una población de células aisladas o purificadas derivadas de riñón humano , siendo dicha población de células capaz de auto renovación y expansión en cultivo, donde la población de células es positiva para la expresión de marcadores de superficie celular HLA I y CD44 y al menos uno de Oct-4, Rex-1, Pax-2, Cadherina-11, FoxD I, WT1, Eyal, HNF3B, CXC-R4, Sox-17, EpoR, BMP2, BMP7, o GDF5 y negativa para la expresión de los marcadores de superficie celularCDI33, E-cadherina, y Wnt-4, y al menos uno de Sox2, FGF4, hTert, SIX2 o GATA-4. La población de células aisladas o purificadas derivadas de riñón humano es estable y capaz de auto-renovación y expansión en el cultivo de células. La población de células no es inmunogénica para el transplante alogénico en el sujeto humano, tal como queda demostrado por el descubrimiento de que la población de células aisladas o purificadas derivadas de riñón humano es positiva para el marcador de superficie celular HLA I, y negativa para al menos uno de los marcadores de superficie celular HLA II, CD80, o CD86.

[0018] La población de células derivadas de riñón humano puede secretar al menos uno de los factores tróficos FGF2, HGF, TGFα, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 o VEGF y no secreta al menos uno de los factores tróficos PDGF-bb o IL12p70. La población celular puede ser derivada de la región subcapsular, la corteza o la médula renal de un humano. La población de células derivadas de riñón humano puede incluir células progenitoras de riñón. Las células progenitoras de riñón son capaces de diferenciarse en diferentes linajes de células, por ejemplo adipocitos u osteoblastos.

[0019] La población de células derivadas de riñón humano de esta invención es útil en la terapia celular para la regeneración renal en la enfermedad isquémica de riñón o para los tratamientos terapéuticos de reemplazo de tejidos, órganos , componentes o estructuras renales dañados debido a trauma, la edad, daño metabólico o tóxico, enfermedad o pérdida idiopática en un sujeto humano.

[0020] Se entiende que esta invención no está limitada a métodos, reactivos, compuestos, composiciones o sistemas biológicos particulares, los cuales pueden, por supuesto, variar. También se entiende que la terminología usada aquí tiene el propósito de describir únicamente casos particulares, y no pretende ser limitante. Tal como se usa en esta especificación y las afirmaciones del anexo, las formas singulares ‘’un’’, ‘’una’’, ‘’ el’’ y ‘’la’’ incluyen referentes plurales a menos que el contenido claramente dicte otra cosa. Entonces, por ejemplo, la referencia a ‘’una célula’’ incluye la combinación de dos o más células, etc.

[0021] El término "aproximadamente" tal como es usado aquí al referirse a un valor medible como una cantidad, una duración de tiempo, etc., se usa para incluir variaciones de ±20% o ±10%, más preferentemente ±5%, y aún más ±1%, y todavía más preferentemente ±0.1% del valor específico, dado que dichas variaciones son apropiadas para realizar los métodos especificados.

[0022] A menos que se defina en otro sentido, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el significado que comúnmente entiende alguien medianamente experto en la materia al cual pertenece el invento. Aunque en la práctica de probar la presente invención puede utilizarse cualquier método o material similar o equivalente a aquellos descritos aquí, los materiales y métodos de preferencia son los aquí descritos. Al describir y especificar esta invención, se utilizará la siguiente terminología.

[0023] ‘’Células de la invención’’ se refiere a una población de células derivadas de riñón humano y las células derivadas de éstas, incluyendo células diferenciadas y desdiferenciadas. Una población de células derivadas de riñón humano puede ser positiva para la expresión de marcadores de superficie celular HLA I y CD44, y al menos uno de Oct-4, Rex-1, Pax-2, Cadherina-11, FoxD1, WT1, Eya1, HNF3B, CXC-R4, Sox-17, EpoR, BMP2, BMP7, o GDF5 y negativa para la expresión de los marcadores de superficie celular CDI33, E- cadherina y Wnt-4 y al menos uno de Sox2, FGF4, hTert, SIX2 o GATA-4.

[0024] ‘’Diferenciación" es el proceso por el cual una célula no especializada ("no comprometida") o menos especializada adquiere las características de una célula especializada, tal como una célula de riñón, por ejemplo. Una ‘’célula diferenciada o inducida a la diferenciación’’ es aquella que ha adquirido una posición más especializada ("comprometida") dentro del linaje celular. El término "comprometida", cuando se aplica al proceso de diferenciación, se refiere a una célula que, en el camino de la diferenciación, ha procedido a un punto en el que, bajo circunstancias normales, continuará diferenciándose en un tipo específico o un subtipo de células, y que no podrá, bajo circunstancias normales, diferenciarse en un tipo diferente de células o revertir a un tipo de células menos diferenciadas. ‘’Desdiferenciación’’ se refiere al proceso por el cual una célula revierte a una posición menos especializada (o comprometida) dentro del linaje celular. Tal como se lo usa aquí, el ‘’linaje’’ celular define la herencia de la célula, es decir de cuáles células proviene y qué células puede generar. El linaje celular ubica a la célula dentro de un esquema hereditario de desarrollo y diferenciación. Un ‘’marcador específico de linaje’’ se refiere a una característica específicamente asociada al fenotipo de las células de un linaje de interés y puede usarse para determinar la diferenciación de una célula no comprometida del linaje de interés.

[0025] En un sentido amplio, una ‘’célula progenitora’’ es una célula que tiene la capacidad de crear progenie más diferenciada que ella misma y que aun así retiene la capacidad de reabastecer la reserva de progenitores. Por esta definición, las células madre mismas son también células progenitoras, dado que son las precursoras más inmediatas hacia las células terminalmente diferenciadas. Esta definición amplia de ‘’célula progenitora’’ puede utilizarse al referirse a las células de esta invención, como se las describe con mayor detalle más adelante. En un sentido más restringido, una célula progenitora usualmente se define como una célula que es intermedia en el camino de la diferenciación, es decir que surge de una célula madre y es intermedia en la producción de un tipo de célula madura o un subtipo de células. Este tipo de célula progenitora generalmente no es capaz de auto-renovarse. En este sentido, si se menciona este tipo de células aquí, se las referirá como ‘’célula progenitora no renovante’’ o como ‘’ progenitora intermedia’’ o ‘’célula precursora’’. Una célula diferenciada puede derivar de una célula multipotente que a su vez deriva de una célula multipotente y así sucesivamente. Mientras cada una de estas células multipotentes puede ser considerada una célula madre, el rango de tipos de células que cada una puede generar puede variar considerablemente. Algunas células diferenciadas también tienen la capacidad de generar células de un potencial de desarrollo mayor. Esta capacidad puede ser natural o ser inducida artificialmente con diversos factores en un tratamiento. ‘’Proliferación’’ indica un aumento en el número de células.

[0026] ‘’Células progenitoras renales’’, tal como se usa aquí, son células derivadas de riñón humano que pueden generar células tales como adipocitos u osteoblastos, o puede generar uno o más tipos de tejido, por ejemplo, tejido renal, además de producir células hijas de potencial equivalente. Una ‘’célula progenitora renal’’ es una célula multipotente o pluripotente que se origina sustancialmente de tejido renal adulto o fetal. Se ha hallado que estas células poseen características de las células madre pluripotentes, incluyendo la rápida proliferación y la potencialidad de diferenciación en otros linajes celulares. Las células progenitoras renales ‘’multipotentes’’ pueden generar múltiples linajes celulares, por ejemplo linajes de células renales, linajes de adipocitos u osteoblastos. Las células progenitoras renales muestran un perfil de expresión genético para los marcadores genéticos de desarrollo temprano, marcadores genéticos del desarrollo renal, marcadores de genes mesenquimáticos metanéfricos y genes que promueven la supervivencia del mesénquima metanéfrico. Por ejemplo, las células progenitoras renales muestran un perfil de expresión genética que es positivo para la expresión de genes que incluyen, aunque no se limitan a Oct-4 y Rex-1, y negativos para la expresión de genes que incluyen, aunque no se limitan a Sox2, FGF4, hTERT y Wnt-4.

[0027] La población de células aisladas o purificadas derivadas de riñón humano es estable y capaz de auto-renovación y expansión en un cultivo celular. La población de células derivadas de riñón humano ha sido identificada fenotípicamente como células que son positivas para la expresión de al menos uno de Oct-4, Rex-1, Pax-2, Cadherina-11, FoxD1, WT1, Eya1, HNF3B, CXC-R4, Sox-17, EpoR, BMP2, BMP7, o y negativa para la

expresión de al menos uno de Sox2, FGF4, hTert, Wnt-4, SIX2 o GATA-4. Otro aspecto es que la población de células derivadas de riñón humano ha sido identificada como positiva para la expresión de al menos uno de Eya1, WT1, FoxD1, BMP7, BMP2, GDFS, EpoR o Rex-1, y negativa para la expresión de al menos uno de Sox2, FGF4, hTert o Wnt-4.

[0028] ''Tejido'' se refiere a un grupo o capa de células similarmente especializadas, que en forma conjunta realizan ciertas funciones especiales ''Órgano'' se refiere a dos o más capas adyacentes de tejido que mantienen alguna forma de interacción célula-célula y/o célula-matriz para formar una microarquitectura.

[0029] ''Riñón'' se refiere a uno de un par de órganos en el abdomen. Los riñones desechan los residuos de la sangre (como orina), producen la eritropoyetina que estimula la producción de glóbulos rojos en sangre, y juegan un rol en la regulación de la presión sanguínea. Los riñones funcionan para mantener el equilibrio apropiado de agua y electrolitos, regular la concentración ácido-base y filtrar los residuos metabólicos de la sangre, que luego son excretados como orina.

[0030] ''Cultivo primario'' se refiere a la población de células mezcladas que permite la interacción de muchos tipos de diferentes células aisladas de un tejido. La palabra ''primario'' tiene su significado usual en el contexto de cultivo de tejidos. ''Capaz de auto-renovación y expansión en el cultivo'' se refiere a poblaciones de células derivadas de riñón de mamífero que crecen y se dividen en el cultivo celular y mantienen sustancialmente el mismo fenotipo que se mide por los marcadores de células y la secreción de factores tróficos de célula madre a célula hija. En algún punto durante la réplica de población de células derivadas de riñón de mamífero, el fenotipo puede cambiar a un estado más especializado o diferenciado de la célula derivada de riñón.

[0031] La población de células derivadas de riñón humano de la invención también puede ser cultivada antes de la administración a un sujeto bajo condiciones que promuevan la proliferación y diferenciación celular. Estas condiciones incluyen el cultivo de células que permitan la proliferación y confluencia in vitro en el momento en que se puede hacer que las células formen agregados o conglomerados y secreten GDF5, BMP, o expresen receptores BMP o EPO.

[0032] Se utilizan diferentes términos para describir las células en un cultivo. ''Cultivo celular'' generalmente se refiere a células extraídas de un organismo viviente y hechas crecer bajo condiciones controladas, por ejemplo'' en cultivo''. Un ''cultivo celular primario'' es un cultivo de células, tejidos u órganos tomados directamente de organismos y antes del primer subcultivo. Las células ''se expanden'' en un cultivo cuando son ubicadas en un medio de crecimiento bajo condiciones que facilitan el crecimiento y/o división, resultando en una población más grande de células- Cuando se expanden las células en un cultivo, la tasa de proliferación de células a veces se mide como la cantidad de tiempo necesario para que las células dupliquen su número. Esto se denomina ''tiempo de duplicación''.

[0033] ''Composición celular'' se refiere a un preparado de células que puede incluir, además de las células, componentes no celulares, tales como medio de cultivo celular, por ejemplo proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, nucleótidos, coenzimas, antioxidantes, metales, etc. Además, la composición celular puede tener componentes que no afecten el crecimiento o viabilidad del componente celular, pero que son usados para proveer a las células en un formato particular, por ejemplo como una matriz polimérica para encapsulamiento, o una preparación farmacéutica.

[0034] ''Medio de cultivo'' es reconocido por los especialistas y también es comúnmente conocido como ''medio de crecimiento'', generalmente se refiere a cualquier sustancia o preparación usada para el cultivo de células vivientes. En este sentido, un ''cultivo de tejido'' se refiere al mantenimiento o crecimiento de un tejido, por ejemplo explantes de órgano primordial, región subcapsular del riñón, corteza o médula renal, o de un órgano adulto in vitro para preservar su arquitectura y función. Un ''cultivo celular'' se refiere a un crecimiento de células in vitro. Las preparaciones de cultivo celular o de tejido de la población amplificada de células derivadas del riñón humano pueden tomar una variedad de formatos. Por ejemplo, un ''cultivo en suspensión'', se refiere a un cultivo en el que las células se multiplican estando suspendidas en un medio apropiado. Del mismo modo, un ''cultivo de flujo continuo'' se refiere a un cultivo de células o explantes en un flujo continuo de medio fresco para mantener el crecimiento celular, por ejemplo la viabilidad.

[0035] Una ''línea celular'' es una población de células formada por uno o más subcultivos de cultivo celular primario. Cada ronda de subcultivos es denominado pasaje. Cuando las células son subcultivadas, se dice que ellas han experimentado un ''pasaje''. Una población específica de células, o una línea de células, en ocasiones se denomina o caracteriza por el número de veces en que la misma ha experimentado un pasaje. Por ejemplo, una población de células cultivada que ha experimentado diez pasajes, puede ser denominada cultivo "P10". El cultivo primario, es decir, el primer cultivo que sigue al aislamiento de las células del tejido, se designa P0. Siguiendo al primer subcultivo, las células se describen como cultivo secundario, (P1 o pasaje 1), Luego del segundo subcultivo, las células se convierten en un cultivo terciario (P2 o pasaje 2), etc. Los expertos en la materia entenderán que puede haber muchas duplicaciones de la población durante el período de los pasajes; por tanto, el número de duplicaciones de población de un cultivo usualmente es más grande que el número de pasajes. La expansión de las células (es decir, el número de duplicaciones de la población) durante el período entre los pasajes depende de

muchos factores, incluyendo, pero no limitado a la densidad del sembrado, el sustrato, el medio y el tiempo entre los pasajes.

[0036] Un ‘’medio condicionado’’ es un medio en el cual se ha cultivado una célula o población de células específica, y luego extraída. Mientras que las células son cultivadas en el medio, secretan factores celulares que pueden proveer soporte trófico a otras células. Estos factores tróficos incluyen, aunque no se limitan a hormonas, citoquinas, matriz extracelular (ECM), proteínas, anticuerpos y gránulos. El medio que contiene los factores celulares es el medio condicionado.

[0037] Generalmente, un ‘’factor trófico’’ se define como una sustancia que promueve la supervivencia, crecimiento, proliferación, maduración, diferenciación y/o mantenimiento de una célula, o estimula la actividad aumentada de una célula. ‘’Soporte trófico’’ se usa aquí para referirse a la capacidad para promover la supervivencia, crecimiento, proliferación, maduración, diferenciación y/o mantenimiento de una célula, o para estimular la actividad aumentada de una célula. La población de células derivadas de riñón humano de esta invención produce factores tróficos, incluyendo pero no limitado a factores de crecimiento, citoquinas y factores de diferenciación. Los factores tróficos incluyen, pero no están limitados a FGF2, HGF, TGFα, TIMP-1, TIMP-2; VEGF, MMP-2, o una combinación de los mismos.

[0038] "’’No inmunogénico’’ se refiere a células o población de células que no suscita una respuesta inmune perjudicial en la mayoría de los sujetos humanos tratados, la cual es una respuesta inmune que compromete la salud del sujeto o que interfiere con una respuesta terapéutica en el sujeto tratado.

[**0039]** "Gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto genético. El gen opcionalmente comprende la secuencia de información requerida para la expresión del gen (por ejemplo promotores, resaltadores, etc.). El término ‘’genómico’’ se relaciona al genoma de un organismo.

[0040] "Expresión del gen" se refiere a la transcripción de un gen en un producto de ARN, y opcionalmente la traducción en una o más secuencias de polipéptidos.

[0041] "Datos de la expresión genética" se refiere a uno o más conjuntos de datos que contienen información referente a los diferentes aspectos de la expresión del gen. El conjunto de datos opcionalmente incluye información referente a: la presencia de transcripciones de genes diana en la muestra de célula o derivado de célula; los niveles de abundancia relativos y absolutos de los transcripciones de genes diana; la capacidad de los diferentes tratamientos para inducir la expresión de genes específicos; la capacidad de los diferentes tratamientos para cambiar la expresión de genes específicos a diferentes niveles.

[0042] "Perfil de la expresión genética" se refiere a la representación del nivel de expresión de una pluralidad de genes sin una condición de expresión seleccionada (es decir, de referencia o control) o como respuesta a la misma (por ejemplo, la incubación de la presencia de un compuesto estándar o un compuesto de prueba en uno o diferentes momentos). La expresión de genes puede realizarse en términos de una cantidad absoluta de ARNm transcrito para cada gen, como una proporción de ARNm transcrito en una célula de prueba en comparación con una célula control, etc. También se refiere a la expresión de un gen individual y de juegos de genes individuales en un sujeto.

[0043] Al hacer referencia a células de vertebrados en cultivo, el término "senescencia" (también "senescencia replicativa" o "senescencia celular") se refiere a una propiedad atribuible a cultivos de células finitos; concretamente, su falta de capacidad de crecer más allá de un número finito de duplicaciones de población (en ocasiones denominado "límite de Hayflick"). Aunque la senescencia celular fue descrita primeramente usando células similares a los fibroblastos, la mayoría de los tipos de células humanas normales que pueden ser cultivadas en forma exitosa pasan a través de una senescencia celular. La vida útil in vitro de los diferentes tipos de células varía, pero la vida útil máxima es típicamente menor que 100 duplicaciones de la población (este es el número de duplicaciones para que todas las células en el cultivo se vuelvan senescentes y conviertan al cultivo en incapaz de dividirse). La senescencia no depende del tiempo cronológico, sino más bien es medido por el número de divisiones celulares, o la duplicación de la población que ha sufrido el cultivo. De este modo las células que se vuelven inactivas al remover los factores de crecimiento esenciales son capaces de retomar el crecimiento y la división cuando los factores de crecimiento se vuelven a introducir, y de allí en adelante llevar a cabo el mismo número de duplicaciones que aquellas células equivalentes que crecieron en forma continua. Asimismo, cuando se congelan las células en nitrógeno líquido luego de varias duplicaciones de la población y luego son descongeladas y cultivadas, pasan básicamente por el mismo número de duplicaciones que las células que se mantienen sin congelar en el cultivo. Las células senescentes no están muertas ni están muriendo; en realidad son resistentes a la muerte celular programada (apoptosis), y han sido mantenidas en su estado indiviso tanto como por tres años. Estas células están bien vivas y son metabólicamente activas, pero no se dividen. Se ha hallado que el estado indiviso de las células senescentes no es reversible por ningún agente biológico, químico ni viral.

[0044] "Condiciones de crecimiento estándar" se refiere a las condiciones atmosféricas estándar que comprenden aproximadamente un 5% de CO_2, una temperatura aproximada de 35-39°C, más preferiblemente 37°C, y una

humedad relativa de aproximadamente 100%.

[0045] "ED50" significa la dosis de droga que produce el 50% de su respuesta o efecto máximo.

[0046] "Cantidad efectiva" se refiere a las concentraciones de componentes tales como factores de crecimiento, citoquinas, células, preparaciones, o composiciones efectivas para producir un resultado deseado, incluyendo la proliferación de células derivadas de riñón, el tratamiento de una enfermedad o condición con células, preparaciones y composiciones del invento o para efectuar un transplante de células dentro del paciente a ser tratado. Una cantidad efectiva de componentes, tales como factores de crecimiento, citoquinas, células, preparaciones o composiciones, provoca un cambio en la tasa de proliferación celular y/o el estado de diferenciación de una célula.

[0047] "Administrar" o "administración" se refiere al proceso a través del cual las células, preparaciones o composiciones del invento son administradas a un paciente a los fines de un tratamiento: se puede administrar células, preparaciones, o composiciones a través de diferentes modos, incluyendo vía parenteral (por ejemplo intravenosa e intraarterial, así como otras vías parenterales apropiadas), vía oral, subcutánea, por inhalación o transdérmica. Las células, preparaciones y composiciones del invento son administradas de acuerdo con buenas prácticas médicas tomando en cuenta la condición clínica del paciente, la ubicación y el método de administración, la dosis, la edad, sexo, peso corporal del paciente, así como otros factores conocidos por los médicos.

[0048] "Animal" o "sujeto mamífero" se refiere a los mamíferos, preferentemente humanos, primates, ratas o ratones. En el mismo sentido un "paciente" o "sujeto" a ser tratado por el método del invento, puede referirse ya sea a un animal humano o no humano a quien se provee el tratamiento, incluyendo el tratamiento profiláctico, con las células, preparaciones y composiciones de este invento. Para el tratamiento de estas condiciones o estados de enfermedad para un animal específico, tal como un paciente humano, el término se refiere a ese animal específico. "Donante" se refiere a un individuo (animal, incluyendo humano) que dona células renales para uso en un paciente.

[0049] "Transplantar, "implantar", "transplante", "injerto" e "injertar" se utilizan para describir el proceso a través del cual las células, preparaciones y composiciones del invento se administran en el lugar dentro del paciente en el que se espera que las células exhiban un efecto favorable, tal como reparar un daño en los tejidos del paciente, tratar una enfermedad, herida o trauma o daño genético o ambiental a un órgano o tejido causado , por ejemplo, por un accidente u otra actividad. Las células, preparaciones y composiciones también pueden ser administradas en un área remota del cuerpo por cualquier vía de administración confiando en la migración celular al área apropiada del cuerpo para efectuar el transplante.

[0050] "Explantar" se refiere a la porción de un órgano sacado del cuerpo y hecho crecer en un medio artificial.

[0051] "Ex vivo" se refiere a las células que han sido extraídas de un cuerpo, temporariamente cultivadas in vitro, y regresadas al cuerpo.

[0052] "Esencialmente", "esencialmente efectivo", o "esencialmente puro" se refiere a una población de células o un método que es efectivo al menos en un 20+%, 30+%, 40+%, 50+%, 60+%, 70+%, 80+%, 85+%, 90+%, o 95+%, preferiblemente al menos efectivo en un 98+%, o aun más, 99+%. Por tanto un método que enriquece para una población de células dada, enriquece al menos aproximadamente un 20+%, 30+%, 40+%, 50+%, 60+%, 70+%, 80%, 85%, 90%, o un 95% de la población de células diana, más preferiblemente al menos aproximadamente un 98% de la población celular, o más preferiblemente un 99% de la población celular. En ciertos casos las células en una población enriquecida de población de células derivadas de riñón humano del invento compuesto esencialmente por células derivadas de riñón humano, por ejemplo células que son positivas para la expresión de los marcadores de superficie celular HLA I y CD44 y al menos uno deOct-4, Rex-1, Pax-2, Cadherina-11, FoxD1, WT1, Eya1, HNF3B, Cxc-R4, Sox-17, Gpo-R, BMP2, BMP7, o GDF5, y negativas para la expresión de los marcadores de superficie celular CDI33, E-cadherina, and Wnt-4, y al menos uno de Sox2, FGF4, hTert, Six2 o GATA-4.

[0053] "Aislada" o "purificada" se refiere a alterada "por la mano del hombre" de su estado natural, es decir, cualquier cosa que ocurra en la naturaleza es definida como aislada cuando ha sido extraída de su contexto original, o ambas. "Aislada" también define una composición, por ejemplo una población de células derivadas de riñón humano, separada de sus contaminantes (es decir, sustancias que difieren de la célula). En un aspecto, una población o composición de células está básicamente libre de células y materiales con los cuales pueda asociarse en la naturaleza. "Aislado" o "purificado" o "sustancialmente puro", con respecto a las células derivadas de riñón humano se refiere a una población de células derivadas de riñón humano que es pura en aproximadamente un 50%, al menos aproximadamente un 75%, preferiblemente al menos aproximadamente un 85%, más preferiblemente al menos aproximadamente un 90%, y más preferiblemente al menos aproximadamente un 95%, respecto de células derivadas de riñón humano que conforman la población total de células. Reformulando, el término ""sustancialmente puro" se refiere a una población de células derivadas de riñón humano de este invento que contiene menos de aproximadamente un 50%, o preferiblemente menos de aproximadamente un 30%, preferiblemente menos de aproximadamente un 20%, preferiblemente menos de aproximadamente un10%, preferiblemente menos de aproximadamente un 5% de células de riñón comprometidas con el linaje en la población original no amplificada y aislada, anterior al cultivo y amplificación subsiguientes. La pureza de una población o

composición de células puede ser evaluada por métodos apropiados que son bien conocidos para los expertos en la materia.

[0054] "Terapia genética" se refiere a la transferencia e inserción estable de información genética nueva a células para el tratamiento terapéutico de enfermedades o afecciones. Con estas especificaciones, es evidente que para aquellos expertos en la materia existe una variedad de medios de administración de la terapia al sujeto humano. En las especificaciones se describe las técnicas de terapia genética. Para introducir un gen transferido en toda la población de células, se transfiere un gen extranjero a una célula que prolifera. Por tanto, las células y composiciones del invento pueden ser el objetivo de la transferencia genética, dado que van a producir varios linajes que potencialmente pueden expresar el gen extraño.

[0055] La población de células derivadas del riñón humano o los precursores de la misma, generada de acuerdo al método del presente invento, puede usarse para tratar afecciones renales, por ejemplo: daño renal isquémico, insuficiencia renal, transplante de riñón o carcinoma de células renales. Para tratar un deterioro agudo o crónico de la función renal, puede administrarse al paciente células, tejido o un tejido renal en funcionamiento regenerado del mismo. Puede implantarse células renales funcionales o tejido renal regenerado en el donante de las células de riñón o en otro paciente. Las células de riñón o precursoras de ellas, también pueden usarse para construir un sistema renal artificial, por ejemplo un dispositivo basado en un sistema de filtración de fibras huecas.

[0056] Las células, preparaciones y composiciones celulares del invento pueden usarse como inmunógenos que se administran al sujeto mamífero. La administración de una población de células derivadas de riñón humano, obtenida de acuerdo con la invención, puede realizarse por diversos métodos. Los métodos de administración de células como inmunógenos en un sujeto mamífero, incluyen sin límite la inmunización, la administración a una membrana por contacto directo (por ejemplo por hisopado o raspado), la administración a membranas mucosas (por ejemplo, con aerosol) y administración por vía oral. La inmunización puede ser pasiva o activa y puede darse a través de diferentes vías, incluyendo la inyección intraperitoneal, la inyección intradérmica o la inyección local. La vía y cronograma de inmunización se realizan de acuerdo con los métodos convencionales generalmente establecidos para la estimulación y producción de anticuerpos. Los sujetos mamíferos, particularmente los ratones, y las células productoras de anticuerpos de los mismos, pueden ser manipulados para servir a los fines de la producción de líneas celulares de hibridoma de mamífero.

[0057] Las composiciones de la población de células derivadas de riñón humano del invento pueden usarse para preparar sistemas modelo de la enfermedad. Las composiciones de la población de células derivadas de riñón humano también pueden usarse para producir compuestos que incluyen pero no se limitan a factores de crecimiento, hormonas, citoquinas y compuestos inmunoestimulantes. La población de células derivadas de riñón humano del invento secreta factores que incluyen, pero no se limitan a: FGF2, HGF, TGFα,TIMP-1, TIMP-2, VEGF, o MMP-2, o una combinación de los mismos y no secreta al menos uno de los factores tróficos PDGF- bb o IL12p70 o una combinación de los mismos.

[0058] Por un lado, la invención provee un sistema de cultivo en el que puedan identificarse y aislarse los genes, las proteínas y otros metabolitos implicados en la proliferación o diferenciación de las poblaciones de células derivadas de riñón humano o células progenitoras de riñón humano. Las células en un sistema de cultivo del invento pueden compararse con otras células (por ejemplo, células diferenciadas) para determinar los mecanismos y compuestos que estimulan la producción de células derivadas de riñón humano o células progenitoras de riñón humano.

[0059] Las composiciones celulares del invento pueden usarse para examinar los genes expresados o esenciales para la diferenciación de la población de células derivadas de riñón humano. Los métodos de examen que pueden usarse incluyen el Análisis de Diferencia Representacional (por sus siglas en inglés RDA) o captura de genes con, por ejemplo, SA-lacZ. D. P. Hill y W. Wurst, 1993, Methods in Enzymology, 225: 664. Puede utilizarse la captura de genes para inducir mutaciones dominantes (por ejemplo eliminando los dominios particulares del producto genético) que afectan a la diferenciación o la actividad de las células derivadas de riñón humano y permiten la identificación de los genes expresados o esenciales para la diferenciación de estas células.

[0060] Las preparaciones ampliadas de células del invento que comprenden cantidades aumentadas de células derivadas de riñón humano, pueden usarse para ampliar el sistema inmune de un paciente. Las preparaciones de células facilitarán la ampliación o reconstitución del sistema inmune y/o renal del paciente. Una población celular derivada de riñón humano puede transfectarse con un vector para para expresar antígenos inmunogénicos, por ejemplo antígenos virales, bacteriales, parásitos o de cáncer. Esta población celular derivada de riñón humano transfectada puede usarse para tratar un sujeto humano que sufra una enfermedad y de este modo reducir o eliminar la enfermedad viral, bacterial, parasítica o reducir o eliminar el cáncer o la enfermedad neoplásica.

[0061] Aquí también se especifica un método de tratamiento que usa las poblaciones de células derivadas de riñón humano para caracterizar las respuestas celulares a los agentes biológicos o farmacológicos que implican aislar células derivadas de riñón humano de una población estadísticamente significativa de individuos, ampliando en cultivo las células derivadas de riñón humano de la población estadísticamente significativa de individuos para

establecer una pluralidad de cultivos de células de poblaciones de células derivadas de riñón humano, contactando los cultivos de células derivadas de riñón humano con uno o más agentes biológicos o farmacológicos, identificando una o más respuestas celulares a ese agente o agentes biológicos o farmacológicos, y comparando esa respuesta o respuestas celulares de los cultivos de células derivadas de riñón humano de los individuos en la población estadísticamente significativa.

[0062] También se especifica un método de tratamiento que usa células derivadas de riñón humano o poblaciones de células derivadas de riñón humano específicamente diferenciadas para la terapia que consiste en la administración de células específicamente diferenciadas al paciente. También se especifica el uso de células derivadas de riñón humano modificadas genéticamente para expresar selectivamente un gen endógeno o un transgen. La invención provee células derivadas de riñón humano hechas crecer in vivo para transplante/ administración en un animal para tratar una enfermedad. Por ejemplo, las células diferenciadas derivadas de poblaciones de células derivadas de riñón humano pueden usarse para tratar enfermedades que implican las estructuras tubulares, vasculares, intersticiales o glomerulares del riñón. Por ejemplo, las células pueden usarse para tratar enfermedades de la membrana basal glomerular tales como Síndrome de Alport; afecciones de transporte tubular, tales como Síndrome de Bartter, cistinuria o diabetes insípida nefrogénica; enfermedades del riñón progresivas de varias etiologías, tales como la nefropatía diabética o la glomerulonefritis; enfermedad de Fabry, hiperoxaluria, y para acelerar la recuperación de la necrosis tubular aguda.

[0063] Las células diferenciadas derivadas de una población de células derivadas de riñón humano también pueden ser usadas para tratar afecciones tales como insuficiencia renal aguda, síndrome nefrítico agudo, nefropatía por analgésicos, enfermedad renal ateroembólica , insuficiencia renal crónica, nefritis crónica, síndrome nefrótico congénito, enfermedad renal en etapa terminal, síndrome de Goodpasture, glomerulonefritis proliferativa mesangial IgM , nefritis intersticial, cáncer de riñón, cáncer renal, hipernefroma; adenocarcinoma de las células renales, daño renal, infección renal, herida renal, piedras en el riñón, nefritis por lupus, glomerulonefritis membranoproliferativa I, glomerulonefritis membranoproliferativa II, nefropatía membranosa, enfermedad de cambios mínimos, glomerulonefritis necrotizante, nefroblastoma, nefrocalcinosis, diabetes insípida nefrogénica, nefropatía IgA, nefrosis (síndrome nefrótico), enfermedad poliquística renal, glomerulonefritis posestreptocócica, nefropatía por reflujo, embolia de la arteria renal, estenosis de la arteria renal, afecciones renales, necrosis papilar renal, acidosis tubular renal tipo I acidosis tubular renal tipo II, subperfusión renal o trombosis de la vena renal.

[0064] La población de células derivadas de riñón humano pueden usarse para injertar una célula en un humano, lo cual implica administrar células autólogas, células alogénicas o xenogénicas para restaurar o corregir en el tejido humano la función metabólica específica, función enzimática, función estructural o cualquier otra función. Las células pueden usarse para injertar una célula en el humano, causando la diferenciación in vivo de tipos de células, y para administrar las células derivadas de riñón humano en el mamífero. Las células o su progenie diferenciada in vitro o in vivo, pueden usarse para corregir una enfermedad genética, una enfermedad degenerativa o un proceso de enfermedad del cáncer.

[0065] La población de células derivadas de riñón humano puede usarse en forma terapéutica, por ejemplo para ayudar a la recuperación de un paciente de la quimioterapia o terapia de rayos en el tratamiento del cáncer, en el tratamiento de una enfermedad autoinmune o para inducir la tolerancia en el receptor.

[0066] La presente descripción proporciona además un método de perfilado de genes de la población de células derivadas de riñón humano, y el uso de este perfilado genético en el banco de datos. El perfilado genético de las células derivadas de riñón humano puede usarse en bases de datos que ayudan al descubrimiento de drogas.

[0067] La presente descripción proporciona además el uso de población de células derivadas de riñón humano o células diferenciadas de células derivadas de riñón humano en conjunto con un mecanismo portador o un andamio para formar un riñón artificial. Los mecanismos portadores apropiados son bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, este mecanismo puede ser un dispositivo de fibras huecas que se usa con la población de células derivadas de riñón humano diferenciada. El humano también otorga un método para extraer toxinas de la sangre de un sujeto, poniendo en contacto la sangre ex vivo con la población de células derivadas de riñón humano aislada que recubren el dispositivo de fibras huecas.

[0068] Adicionalmente, en los métodos descritos arriba, las células pueden ser administradas en conjunto con una matriz aceptable, por ejemplo una matriz farmacéutica aceptable. La matriz puede ser biodegradable. La matriz también puede proveer material genético adicional, citoquinas, factores de crecimiento u otros factores que promuevan el crecimiento y la diferenciación de las células. Las células también pueden ser encapsuladas anteriormente a su administración. Las células encapsuladas pueden estar contenidas dentro de una cápsula polimérica.

[0069] Los polímeros usados para preparar los mecanismos portadores, andamios o matrices descritos aquí son biodegradables y biocompatibles. Los polímeros biodegradables fácilmente se descomponen en pequeños segmentos cuando son expuestos al tejido corporal húmedo. Los segmentos son absorbidos o expulsados por el cuerpo. De modo más particular, los segmentos biodegradados no suscitan una reacción permanente crónica al

cuerpo extraño, porque son absorbidos por el cuerpo o expulsados del mismo, de modo que el cuerpo no retiene ningún rastro permanente o residual del segmento.

[0070] Algunos ejemplos de polímeros biocompatibles, bioabsorbibles apropiados que pueden usarse, incluyen polímeros seleccionados del grupo que comprende poliesters alifáticos poliamonoácidos, copoliéter/copoliéster, oxalatos polialquilenos , poliamidas, poliminocarbonatos, poli(iminocarbonatos), poliortoesteres, polioxaesteres, poliamidoesteres, polioxaesteres que contienen grupos amino , polianhídridos, polifosfazenos, biomoléculas o mezclas de los mismos. Para el propósito de esta invención los poliésteres alifáticos incluyen pero no se limitan a homopolímeros y copolímeros de lactida (el cual incluye ácido láctico, D-láctico,1-láctico y meso láctico), glicólido(incluyendo ácido glicólico), épsilon-capronlactona, p-dioxanona (1,4- dioxan-2-ona), carbonato de trimetileno (1, 3-dioxan-2-ona), derivados alquilo de carbonato trimetileno, delta-valerolactona, beta butirolactona, gama-butirolactona, épsilon-decalactona, hidroxibutirato (repitiendo unidades), , hidroxivalerato (repitiendo unidades), 1,4- dioxepan-2-ona (incluyendo su atenuante 1,5, 8,12- tetraoxaciclotetradecano-7,14-diona), 1,5-dioxepan-2-ona, 6,6-dimethyl-1, 4-dioxan-2-ona 2,5-diquetomorfolina, pivalolactona, alfa, alfa- dietilpropiolactona, carbonato de etileno, oxalato etileno, 3-metil-1,4- dioxano-2,5-diona, 3,3-diethyl-1,4-dioxano-2,5-diona, 6,8-dioxabicicloctan-7- ona y mezclas poliméricas de los mismos.

[0071] En un caso, los polímeros que son útiles para los propósitos de esta invención son los poliésteres alifáticos, los cuales incluyen pero no se limitan a homopolímeros y copolímeros de lactida (el cual incluye ácido láctico, D-láctico, 1-láctico y meso láctico), glicólido(incluyendo ácido glicólico), épsilon-capronlactona, p-dioxanona (1,4-dioxan-2-ona), carbonato de trimetileno (1, 3-dioxan-2-ona), derivados alquilo de carbonato trimetileno, delta-valerolactona, beta butirolactona, gama-butirolactona, épsilon-decalactona, hidroxibutirato (repitiendo unidades), , hidroxivalerato (repitiendo unidades), 1,4- dioxepan-2-ona (incluyendo su atenuante 1,5, 8,12-tetraoxaciclotetradecano-7,14-diona), 1,5-dioxepan-2-ona, 6,6-dimethyl-1, 4-dioxan-2-ona y mezclas poliméricas de los mismos. En otro caso, también son apropiados para los propósitos de esta invención los polímeros naturales que incluyen pero no se limitan a colágeno, gelatina, chitina, ácido hialurónico, elastina, fibronetcina, etc. También puede usarse una combinación de polímeros sintéticos y naturales.

[0072] Otra aplicación de la terapia de genes permite el uso de una droga en altas concentraciones, la cual es normalmente considerada peligrosa, al proveer a las células normales derivadas de riñón humano de mamífero una resistencia a la droga, transfiriendo a las células un gen de resistencia a la droga. En particular, es posible llevar adelante el tratamiento usando una droga anticáncer en altas concentraciones al transferir un gen que tenga resistencia a la droga anticáncer, por ejemplo transfiriendo un gen resistente a múltiples drogas a una preparación ampliada de células que comprenden células derivadas de riñón de mamífero.

[0073] Otras enfermedades que aquellas relacionadas con el sistema renal pueden tratarse usando las preparaciones expandidas de células que comprenden poblaciones de células derivadas de riñón humano en tanto que las enfermedades se relacionen con una deficiencia de las proteínas secretoras tales como hormonas, enzimas, citoquinas, factores del crecimiento, etc.. Una proteína deficiente puede ser inducida y expresada transfiriendo un gen codificando una proteína diana en la población de células derivadas de riñón humano bajo el control de un promotor adecuado. La expresión de la proteína puede ser controlada para obtener la misma actividad que aquella obtenida por la expresión natural in vivo.

[0074] También es posible insertar un gen que codifique una ribozima, un ácido nucleico antisentido o similar, u otro gen adecuado en la población de células derivadas de riñón humano para controlar la expresión de un producto genético particular en las células o para inhibir la susceptibilidad a las enfermedades. Por ejemplo, la población de células derivadas de riñón humano puede estar sujeta a la modificación del gen para expresar un ácido nucleico antisentido o una ribozima, los cuales pueden prevenir el crecimiento de patógenos en el riñón, incluyendo pero no limitado a HIV, HTLV-I, y HTLV-II.

[0075] Las preparaciones de células que comprenden la población de células derivadas de riñón humano pueden ser introducidas en el sujeto humano, receptor del injerto de células, por ejemplo, por administración intravenosa convencional.

[0076] Estas especificaciones caracterizan un método para identificar los agentes que afectan la proliferación, diferenciación o supervivencia de las células que tienen el potencial de formar células derivadas de riñón humano. Ejemplos de estos agentes son las pequeñas moléculas, anticuerpos y proteínas extracelulares. Los agentes identificados pueden ser perfilados y evaluados para la seguridad y eficacia en animales. En otro ángulo, la invención contempla métodos para influir en la proliferación, diferenciación o supervivencia de las células que tienen el potencial de formar una población de células derivadas de riñón humano al poner en contacto las células con un agente o agentes identificados por el método precedente. Los agentes identificados pueden ser formulados como una preparación farmacéutica.

Ingeniería genética de la población celular derivada de riñón humano

[0077] La población de células derivadas de riñón humano del invento puede ser manipulada usando cualquiera

de una variedad de vectores, incluyendo pero no limitado a vectores virales integrantes , por ejemplo vector retrovirus, o vectores virales adenoasociados; vectores replicativos no integrantes, por ejemplo vectores del virus del papiloma, vectores SV40, vectores adenovirales; o vector de replicación defectuosa. Otros métodos para introducir ADN en las células incluyen el uso de liposomas, electroporación, pistola de partículas o por inyección directa de ADN.

[0078] Las células huésped preferiblemente son transformadas o transfectadas con ADN controlado por o en asociación operativa con uno o más elementos apropiados de control de la expresión, tales como secuencias promotoras o potenciadoras, terminadores de la transcripción, lugar de poliadenilación , entre otros, y un marcador seleccionable.

[0079] Luego de la introducción del ADN extraño, puede permitirse que las células manipuladas crezcan en medios enriquecidos y luego se las cambie a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el ADN extraño confiere resistencia a la selección y permite que las células integren en forma estable el ADN extraño como, por ejemplo, en un plásmido, dentro de sus cromosomas, y crezcan para formar focos que, en su momento, pueden ser clonados y expandidos en líneas de células. Este método puede ser usado convenientemente para manipular líneas de células, las cuales expresan el producto genético.

[0080] Para regular la expresión del gen insertado puede ser usado cualquier promotor. Por ejemplo, los promotores virales incluyen pero no se limitan al promotor/potenciador de CMV, SV40, virus del papiloma, virus de Epstein-Barr o promotor del gen de elastina. Preferiblemente, los elementos de control usados para controlar la expresión del gen de interés deberían permitir la expresión regulada del gen para que el producto sea sintetizado in vivo sólo cuando se lo necesite. Si se desea una expresión transitoria, se prefiere el uso de promotores constitutivos en un vector no integrador y/o un vector de replicación defectuosa. Otra alternativa sería usar los promotores inducibles para regular la expresión del gen insertado cuando sea necesario.

[0081] Los promotores inducibles incluyen, pero no se limitan a aquellos asociados a proteínas metalotioneína y proteína de choque térmico. Ya se ha descrito ejemplos de regiones de control transcripcional que exhiben especificidad tisular. Por ejemplo, el promotor de eritropoietina es específico para los tejidos de riñón; gen cotransportador Na+/glucosa (Sglt2) de alta capacidad (tipo 2), un gen que sólo se expresa precozmente en los túbulos proximales del riñón; y transportador de aniones orgánicos humanos 3 (hOAT3/SLC22A8) se expresa predominantemente en los túbulos proximales del riñón.

[0082] Las células de la invención pueden ser sometidas a ingeniería genética para "eliminar" la expresión de factores que promuevan la inflamación o rechazo en el lugar del implante. Más adelante se discuten las técnicas moduladoras negativas para la reducción de la expresión del gen diana o los niveles de actividad del producto del gen diana. "Modulación negativa", tal como se lo usa aquí, se refiere a la reducción del nivel y/o actividad del producto del gen diana relativo al nivel y/o actividad producto del gen diana en ausencia del tratamiento modulatorio. La expresión de un gen nativo de una célula derivada de riñón de mamífero puede reducirse o eliminarse usando una variedad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, la inhibición de la expresión al inactivar el gen completamente (comúnmente llamado ‘’nocáut‘’) usando la técnica de recombinación homóloga. Usualmente, un exón que codifica una región importante de la proteína es interrumpido por un marcador seleccionable positivo, por ejemplo neo, previniendo la producción de ARNm normal del gen diana y resultando en la inactivación del gen. Un gen también puede ser inactivado creando una eliminación parcial del gen, o eliminando el gen entero. Al usar una construcción con dos regiones de homología al gen diana tan separadas en el genoma. Las secuencias intervinientes las dos regiones pueden ser eliminadas (Mombaerts et al., 1991, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 88:3084-3087).

[0083] Las moléculas antisentido, ADNzimas y ribozimas, las cuales inhiben la expresión del gen diana, también pueden ser usado de acuerdo con la invención para reducir el nivel de actividad del gen diana. Por ejemplo, se ha demostrado que las moléculas ARN antisentido, las cuales inhiben la expresión de complejos de genes de gran histocompatibilidad (HLA), son muy versátiles con respecto a las respuestas inmunes. Las moléculas ARN antisentido incluyen pero no se limitan a oligonucleótidos SiRNA, o ADNc que produce oligonucleótidos SiRNA. Más aun, las moléculas de triple hélice pueden usarse para reducir el nivel de actividad del gen diana.

[0084] Estas técnicas se describen en detalle en L.G. Davis y otros (eds), 1994, Basic Methods in Molecular Biology, 2nd ed., Appleton & Lange, Norwalk, Conn.

[0085] Una vez que las células del invento han pasado por un proceso de ingeniería genética, pueden ser implantadas directamente en el paciente para permitir la mejoría de los síntomas de la enfermedad renal, al producir un producto genético antiinflamatorio, tal como, por ejemplo, los péptidos o polipéptidos que corresponden al idiotipo de neutralización de anticuerpos para GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, u otras citoquinas inflamatorias.

[0086] Otra alternativa es que las células que han pasado por un proceso de ingeniería genética se usen para producir nuevo tejido in vitro, el cual luego es implantado en el sujeto, tal como se describe más arriba.

Uso de la población de células derivadas de riñón humano para transplante

[0087] Los métodos de tratamiento del sujeto de las especificaciones incluyen la implantación en los individuos de población de células derivadas de riñón, o células trans-diferenciadas. La población de células derivadas de riñón de esta invención puede ser alogénica o autóloga, como se evidencia al encontrar que la población de células es positiva para el marcador de superficie celular HLA I, y negativa para al menos uno de los marcadores de superficie de célula HLA II, CD80, o CD86, y puede ser administrado en el lugar de la necesidad terapéutica u "hogar" del sitio. Las células de esta invención se pueden diferenciar in situ o proveer soporte trófico a las células endógenas. La dosis de implantación de células apropiado en humanos puede ser determinado de la información existente relativa a tanto la actividad de las células, por ejemplo la producción de GDF5, como la densidad de las células para tratar la enfermedad de riñón o isquemia. De los experimentos de cultivos in vitro y en animales in vivo, puede cuantificarse la cantidad de hormonas producidas, y usarlos para calcular la dosis apropiada de material implantado. Además, el paciente puede ser monitoreado para determinar si puede realizarse una implantación adicional o reducir el material implantado, según corresponda.

[0088] Para realzar la diferenciación, la supervivencia o actividad de las células implantadas, puede agregarse factores adicionales, incluyendo factores de crecimiento, tal como proteínas morfogenéticas o corticosteroides, agentes antioxidantes o antiinflamatorios tales como los inhibidores de ciclosporina, estatinas, rapamicina y quinasa p38.

[0089] Para potenciar la vascularización y supervivencia de las células transplantadas puede agregarse factores angiogénicos, tales como VEGF, PDGF o FGF2 , ya sea solos o en combinación con las células endoteliales o sus precursores, incluyendo células CD34+, CD34+/CD117+, células derivadas de tejido de ombligo humano, medio condicionado, matriz extracelular producida por las células o lisados de células.

[0090] Las poblaciones de células derivadas de riñón humano pueden usarse para tratar enfermedades o condiciones crónicas que resultan en morbidez o reducción de la expectativa de vida. Estas condiciones y enfermedades incluyen, pero no se limitan a insuficiencia renal aguda, síndrome nefrítico agudo, nefropatía analgésica, enfermedad renal ateroembólica, enfermedad renal crónica, nefritis crónica, síndrome nefrótico congénito, enfermedad renal en etapa terminal, síndrome de Goodpasture, glomerulonefritis proliferativa mesangial IgM, nefritis intersticial, cáncer de riñón, hipernefroma; adenocarcinoma de las células renales, daño renal, infección renal, herida renal, piedras en el riñón, nefritis por lupus, glomerulonefritis membranoproliferativa I, glomerulonefritis membranoproliferativa II, nefropatía membranosa, enfermedad de cambios mínimos, glomerulonefritis necrotizante, nefroblastoma, nefrocalcinosis, diabetes insípida nefrogénica, retinopatía diabética, nefropatía IgA, nefrosis (síndrome nefrótico), enfermedad poliquística renal, glomerulonefritis post-estreptocócica, nefropatía por reflujo, embolia de la arteria renal, estenosis de la arteria renal, afecciones renales, necrosis papilar renal, acidosis tubular renal tipo I acidosis tubular renal tipo II, subperfusión renal o trombosis de la vena renal. Las estrategias de manejo clínico frecuentemente se focalizan en la prevención de un mayor daño más que en el reemplazo o reparación del tejido dañado (por ejemplo, túbulos renales, glomérulos, neuronas, células gliales, músculo cardíaco). Las estrategias de manejo clínico incluyen el tratamiento con esteroides exógenos y drogas farmacéuticas sintéticas, no celulares, y tienen diversos grados de éxito, que pueden depender de la administración continua del esteroide o la droga sintética.

[0091] Se puede agregar uno o más componentes a las células transplantadas, incluyendo componentes de matriz extracelular, tales como uno o más tipos de colágeno conocido en el arte, y/o factores de crecimiento, drogas y plasma rico en plaquetas. Los factores de crecimiento que pueden ser incorporados de forma útil en la formulación de la célula incluyen uno o más factores de crecimiento del tejido conocidos en el arte o a ser identificados en el futuro, incluyendo pero no limitados a BMPs, GDFs, IGF-I y -II, u hormona del crecimiento. En forma alternativa, las células del invento pueden ser modificadas genéticamente para expresar y producir factores tróficos. En las especificaciones se provee detalles acerca de la modificación genética de las células del invento tal como conocen los expertos en la materia. Las drogas que pueden ser incorporadas de forma útil en la formulación de la célula incluyen compuestos antiinflamatorios, compuestos proangiogénicos, compuestos anti-apópticos, así como anestésicos locales.

Encapsulamiento de población celular derivadas de riñón humano para transplante

[0092] Una población de células derivadas de riñón humano puede ser alogénica o autóloga, como lo evidencia el hallazgo de que la población de células es positiva para el marcador de superficie celular HLA I, y negativa para al menos uno de los marcadores de superficie de célula HLA II, CD80, o CD86, puede no ser reconocida por el sistema inmune o puede reducir la respuesta inmune, como se observa en la reacción de los linfocitos mezclados.

[0093] Es preferible que las células diferenciadas deriven del paciente que está siendo tratado para evitar el rechazo inmune. Sin embargo, donde no hay disponibilidad de células autólogas, es útil encapsular las células diferenciadas en una cápsula permeable a los nutrientes y el oxígeno requerido por la célula y los factores terapéuticos que la célula secreta, tales como las hormonas o BMP-7, GDF5, pero impermeable a los factores y células humorales inmunes. El encapsulante es preferiblemente hipoalergénico, fácil y establemente ubicable en el

tejido diana, y provee protección adicional a la estructura implantada.

[0094] También puede proveerse protección al rechazo inmune a través de la modificación genética de las células diferenciadas, de acuerdo con el método conocido por los expertos en la materia. Puede producirse autoanticuerpos y células resistentes CTL usando métodos tales como los especificados en U.S. Pat. Nos. 5,286,632, 5,320,962, 5,342,761; y en WO 90/11354, WO 92/03917, WO 93/04169, and WO 95/17911. De otro modo, se puede lograr una selección de células resistentes transdiferenciadas cultivando estas células en presencia de autoanticuerpos o CTL asociados a IDD oCTL activados con autoantígenos específicos de IDD. Como resultado de estas técnicas, se generan células con una resistencia aumentada a la destrucción por el anticuerpo o los mecanismos dependientes del linfocito T. Dichas células pueden ser implantadas en un tejido huésped apropiado como se especifica aquí y tener una resistencia aumentada a la destrucción por procesos autoinmunes.

[0095] De modo similar, el perfil del antígeno leucocitario humano (HLA) de la célula diferenciada puede modificarse, opcionalmente por un proceso iterativo, en el cual la célula diferenciada se expone a linfocitos normales, alogénicos y son seleccionadas las células sobrevivientes. Por otro lado, se usa un enfoque de mutagénesis de sitio dirigido para eliminar los marcadores HLA de la superficie de las células diferenciadas, y se modifican las células diferenciadas generadas de ese modo, implantadas en un receptos mamífero que necesita dicho implante.

[0096] En un ejemplo específico, se usa el sistema vector del virus adenoasociado (AAV) que transporta el gen de resistencia a la neomicina. AAV también puede usarse para transfectar células eucarióticas (Laface y otros (1988) Virology 162:483). Adicionalmente, se usa el sistema vector shuttle pBABE-bleo portador del gen de resistencia a la fleomicina (Morgenstern y otros (1990) Nucleic Acids Res. 18:3587). Este vector shuttle puede usarse para transformar las células humanas con genes útiles como se describe aquí.

Criopreservación y banco de una población de células derivadas de riñón humano

[0097] Una población de células derivadas de riñón humano del invento puede ser criopreservada y mantenida o almacenada en un "bando de células". La criopreservación de células del invento puede ser realizada de acuerdo a los métodos conocidos. Por ejemplo, pero no como vía de limitación, las células pueden ser suspendidas en un "medio congelado" tal como un medio de cultivo que comprende 0 a 95% FBS y 10% dimetilsulfoxido (DMSO), un crioprotector con o sin 5 a 10% gliceron en una densidad, por ejemplo, de aproximadamente 0,5 a 10 X 106 células por mililitro. Alternativamente puede usarse otros crioprotectores, tales como carbohidratos, incluyendo pero no limitado a glucosa, sucrosa, maltosa y trehalosa. Las células se colocan en ampollas de vidrio o plástico u otro recipiente que es sellado y transferido a la cámara de congelado de un congelador de velocidad controlada. La velocidad óptima de congelado puede determinarse empíricamente. Puede usarse un congelador de velocidad programable que, por ejemplo, puede rendir una diferencia en temperatura de entre -1 a -10°C por minuto a través del calor de la fusión. Una vez que las ampollas hayan llegado a -180 °C, son transferidas a un área de almacenamiento de nitrógeno líquido. Las células criopreservadas pueden almacenarse por un período de años, aunque deben ser chequeadas al menos cada 5 años para el mantenimiento de la viabilidad.

[0098] Las células criopreservadas del invento constituyen un banco de células, porciones de las cuales pueden ser "retiradas" descongelándolas y usadas como se necesite. El descongelamiento generalmente debe ser realizado rápidamente, por ejemplo, transfiriendo una ampolla del nitrógeno líquido a un baño de agua a 37°C. El contenido descongelado de la ampolla debe ser transferido inmediatamente bajo condiciones estériles a un frasco de cultivo que contenga un medio apropiado, tal como DMEM condicionado con 10% de FBS.

Uso de una población de células derivadas de riñón humano para una in vitro de eficacia y toxicidad de la droga.

[0099] La población de células derivadas de riñón humano del invento puede usarse in vitro para investigar una amplia variedad de compuestos en cuanto a la efectividad y citotoxicidad de los agentes farmacológicos, los factores de crecimiento/reguladores y agentes antiinflamatorios. Con este fin las células del invento o los cultivos de tejidos descritos más arriba se mantienen in vitro y son expuestos al compuesto que será evaluado. La actividad del compuesto citotóxico puede ser medido por su capacidad para dañar o matar células en un cultivo. Esto puede ser fácilmente evaluado por técnicas de tinción vital.. El efecto de los factores de crecimiento/reguladores puede ser evaluado analizando el número de células vivas in vitro, por ejemplo por un conteo total de células y conteo diferencial de células. Esto puede conseguirse usando técnicas citológicas estándar y/o histológicas, incluyendo el uso de técnicas inmunocitoquímicas que emplean anticuerpos que definen los antígenos celulares tipo-específicos. El efecto de varias drogas en las células de esta invención ya sea en un cultivo en suspensión o en el sistema tridimensional descrito más arriba, puede ser evaluado.

[0100] Las células y tejidos del invento pueden ser usados como sistemas modelo para el estudio de condiciones fisiológicas o patológicas. Por ejemplo, la población de células derivadas de riñón humano de esta invención puede usarse para estudiar los estados de la enfermedad, por ejemplo la insuficiencia renal aguda, la insuficiencia renal crónica, el cáncer de riñón, el cáncer renal, hipernefroma, adenocarcinoma de las células renales, daño renal,

infección renal, herida renal, piedras en el riñón, nefritis por lupus, enfermedad poliquística del riñón o trombosis de la vena renal.

[0101] Las células y tejidos de la invención también pueden usarse para estudiar el mecanismo de acción de las citoquinas, factores de crecimiento, por ejemplo EPO, mediadores inflamatorios, por ejemplo IL-1, TNF y prostaglandinas. Además puede investigarse los agentes citotóxicos y/o farmacéuticos que son más eficaces para un paciente particular, tales como aquellos que revierte, reducen o evitan la enfermedad renal o la isquemia renal, o de otro modo potencian el crecimiento equilibrado del tejido renal. Los agentes que prueban ser eficaces in vitro podrían ser usados para tratar terapéuticamente al paciente.

Uso de población de células derivadas de riñón humano para producir moléculas biológicas

[0102] En otro caso particular, la población de células derivadas de riñón humano de la invención puede ser cultivada in vitro para producir productos biológicos en alto rendimiento. Por ejemplo, dichas células, ya sea que naturalmente produzcan un producto biológico particular de interés (por ejemplo: un factor de crecimiento, un factor regulador o una hormona péptida) o hayan sido manipuladas genéticamente para producir un producto biológico, pueden ser expandidas en formas de clones usando, por ejemplo, un sistema de cultivo de células tridimensional. Si las células excretan el producto biológico en el medio nutriente, el producto puede ser fácilmente aislado del medio empobrecido o condicionado usando técnicas de separación estándar, como por ejemplo precipitación diferencial de proteínas, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, elecgtroforesis y HPLC, para nombrar sólo unos pocos. Puede usarse un "biorreactor" para sacar ventaja del método de flujo para alimentar, por ejemplo, un cultivo in vitro tridimensional.

[0103] Esencialmente, a medida que el medio fresco sufre un pasaje a través del cultivo tridimensional, el producto biológico es eliminado del cultivo y puede ser aislado del flujo de salida, como se describe más arriba.

[0104] En otros casos, un producto biológico de interés puede permanecer dentro de la célula y de este modo puede ser necesario para su recolección que las células sean lisadas. El producto biológico entonces puede ser purificado usando cualquiera o más de las técnicas listadas más arriba.

Métodos de administración

[0105] En los métodos descritos aquí, la cantidad terapéuticamente efectiva de población de células derivadas de riñón humano puede estar en un rango entre el máximo número de células que pueda ser recibido en forma segura por el sujeto y el mínimo número de células necesarias para, ya sea la inducción de la formación de nuevos vasos sanguíneos en el tejido renal isquémico, ya para el aumento de flujo sanguíneo al tejido renal isquémico, o para reparar o regenerar el tejido de la región subcapsular renal, de la corteza o médula renal. Generalmente, la cantidad terapéuticamente efectiva de una población de células derivadas de riñón humano es al menos 1 x 104 por kg corporal de peso del sujeto y, más generalmente, no necesita ser más que 1 x 107 de cada tipo de célula por kg. Aunque es preferible que la población de células derivadas de riñón humano sea autóloga o HLA compatible con el sujeto, la población de células derivadas de riñón humano puede ser aislada de otros individuos o especies o de cepas endogámicas de donante manipuladas genéticamente, o de cultivos de células in vitro. La población de células aisladas o purificadas derivadas de riñón humano es positiva para los marcadores de superficie celular HLA I, y negativa para los marcadores de superficie celular HLA II, CD80, o CD86. La población celular no es inmunogénica para el transplante alogénico en el sujeto mamífero.

[0106] La cantidad terapéuticamente efectiva de la población de células derivadas de riñón humano puede ser suspendida en un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Este portador incluye pero no se limita a un medio de cultivo basal más 1% de albúmina en suero, solución salina, solución salina isotónica, dextrosa, agua, colágeno, alginato, ácido hialurónico, adhesivo de fibrina, polietilenglicol, polivinilalcohol, carboximetilcelulosa, y combinaciones de los mismos. La formulación debe ajustarse al modo de administración. De acuerdo con esto, la invención provee el uso de tejido renal humano que produce una población de células derivadas de riñón humano de la invención para la fabricación de un medicamento para tratar un tejido isquémico en un paciente. En algunos casos, el medicamento comprende además polopéptidos recombinantes, tales como factores de crecimiento, quemoquinas o citoquinas.. En otros casos, los medicamentos comprenden una población de células derivadas de riñón humano. Las células usadas para fabricar los medicamentos pueden ser aisladas, derivadas o enriquecidas usando cualquiera de las variaciones provistas por los métodos descritos aquí.

[0107] La preparación o composición de células derivadas de riñón humano se formula de acuerdo con loro procedimientos de rutina como composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa, intraarterial o dentro de la cápsula renal, son soluciones acuosas estériles isotónicas amortiguadas. Allí donde es necesario, la composición también puede incluir un anestésico local para mitigar cualquier dolor en el lugar de la inyección. Generalmente, los ingredientes son provistos en forma separada o mezclados en forma de dosis única, por ejemplo como un concentrado criopreservado en un contenedor herméticamente sellado, como una ampolla, indicando la cantidad del agente activo. Cuando la composición deba ser administrada a través de una infusión, puede ser preparada con una botella

de infusión conteniendo agua de calidad farmacéutica o solución salina. En el caso que la composición sea administrada por inyección, puede proveerse una ampolla con agua estéril o solución salina, para que los ingredientes de puedan mezclar antes de la administración.

[0108] Los portadores farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que se administre, así como por el método particular usado para administrar la composición. De acuerdo con esto, hay una amplia variedad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas (ver, por ejemplo, Alfonso R Gennaro (ed), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, anteriormente Remington's Pharmaceutical Sciences 20th ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 2003). Las composiciones farmacéuticas generalmente son formuladas como estériles, , básicamente isotónicas y en cabal cumplimiento de toda normativa Buenas Prácticas de Fabricación (GMP por sus siglas en inglés) de la Administración de Alimentos y Drogas de los EEUU.

[0109] En vista de esta especificación, para los expertos en la materia queda claro que existe una variedad de vías de administración de células a los sujetos. Dichos métodos incluyen la inyección de células en el sitio diana en un sujeto. Puede insertarse las células en un dispositivo de distribución, el cual facilita la introducción en los sujetos a través de inyección o implantación. Dichos dispositivos de distribución pueden incluir tubos, por ejemplo catéteres, para inyectar células y fluidos en el cuerpo del sujeto receptor. En un caso, tos tubos tienen adicionalmente una aguja, por ejemplo una jeringa, a través de la cual las células del invento pueden ser introducidos al sujeto en el lugar deseado. En otro caso, se formula las poblaciones de células derivadas de riñón humano para la administración en el vaso sanguíneo vía catéter (donde el término "catéter" incluye cualquiera de los sistemas de tubo o similar para la administración de sustancias a un vaso sanguíneo). De otro modo, las células pueden ser insertadas en un andamio, incluyendo pero no limitado a textiles, tal como tejidos, trenzas, mallas y filmes no tejidos, esponjas y espumas, y collares de cuentas, tal como las cuentas sólidas y porosas, micropartículas, nanopartículas, etc.. Las células pueden ser preparadas para su administración en una variedad de formas diferentes. Por ejemplo, las células pueden ser suspendidas en una solución o un gel. Pueden mezclarse con un portador farmacéuticamente aceptable o diluyente en el cual permanezcan viables las células del invento. Los portadores y diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones salinas acuosas estériles amortiguadas, o solventes, o un medio de dispersión. El uso de estos portadores y diluyentes es bien conocida por los expertos en la materia. La solución es preferiblemente estéril y fluida, y frecuentemente será isotónica. Preferiblemente, la solución es estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento, y preservada contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos, a través del uso de, por ejemplo: parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares.

[0110] Los modos de administración de la población de células derivadas de riñón humano del invento incluyen pero no se limitan a la inyección sistémica, intrarrenal, intravenosa o intraarterial e inyección directa en el tejido, en el lugar pretendido de actividad. La preparación puede administrarse por cualquier vía conveniente, por ejemplo por infusión o inyección en bolo, y puede administrarse conjuntamente con otros agentes biológicamente activos. La administración preferiblemente es sistémica. Preferiblemente, el lugar de administración es cerca o lo más cercano posible al lugar pretendido de actividad. En los casos en los que el sujeto sufre de una isquemia global, se prefiere la administración sistémica, tal como la intravenosa. Sin intentar verse atado por el mecanismo, la composición que comprende una población de células derivadas de riñón humano, cuando sea administrada, migrará o se alojará en el tejido isquémico, por ejemplo en el riñón, en respuesta a los factores quemotácticos producidos debidos a la herida. El tejido isquémico que puede ser tratado por los métodos del invento incluye pero no se limita a la isquemia renal.

[0111] Los métodos descritos aquí proveen un polipéptido recombinante o una droga es administrada a un sujeto en combinación con la administración de células.. El polipéptido o droga puede ser administrada al sujeto antes, concurrentemente o luego de la administración de las células. En un caso particular, el polipéptido recombinante o droga promueve la angiogénesis, vasculogénesis ambas. En otro caso, el polipéptido recombinante o droga promueve la proliferación o diferenciación de población de células derivadas de riñón humano. En un caso, el polipéptido recombinante es VEGF, FGF2, SDF, CXCR-4 o CXCR-5, o un fragmento de los mismos, lo cual retiene la actividad terapéutica hacia el tejido isquémico.

[0112] En particular, los métodos del invento son útiles para la vasculogénesis terapéutica en el tratamiento de la isquemia renal en humanos. La administración de una población de células derivadas de riñón humano de acuerdo con los métodos del invento puede usarse como un tratamiento único o como adjunto a una cirugía y/o modalidades de tratamiento médico. Por ejemplo, los métodos descritos aquí para el tratamiento de la isquemia renal pueden ser usados en conjunto con un tratamiento de cáncer del riñón, infección renal daño renal, transplante de riñón o piedras en los riñones. Los métodos descritos aquí son particularmente útiles para sujetos que tienen revascularización incompleta del área isquémica luego de tratamientos quirúrgicos y, por tanto, tiene áreas de tejido renal isquémico pero viable. Los sujetos que pueden beneficiarse en modo significativo de la vasculogénesis de acuerdo con los métodos descritos aquí, son aquellos que tienen áreas amplias de tejido de riñón viable en riesgo por el deterioro de la perfusión de los vasos que son dianas pobres para los métodos de técnicas de revascularización.

[0113] La cantidad terapéuticamente efectiva de población de células derivadas de riñón humano del invento es un número máximo de células que pueda ser recibido en forma segura por el sujeto. Debido a que la vía preferida de

inyección es la intrarrenal, la dosis máxima debe tomar en consideración el tamaño de los vasos en las cuales se infundan las células, de modo que los vasos no se congestionen ni se tapen. El mínimo número de células necesario para la introducción de nueva formación de vasos sanguíneos en el tejido isquémico renal puede ser determinado empíricamente, sin demasiada experimentación, por estudios de aumento de dosis. Por ejemplo, dicha aumento de dosis podría empezar con aproximadamente 104 de células derivadas de riñón de mamífero por kg. de peso corporal.

[0114] Otro aspecto que provee el invento es una formulación farmacológica que incluye: (a) población de células derivadas de riñón humano del invento y un portador farmacéuticamente aceptable. En algunos casos, la formulación comprende entre 104 y 109 células derivadas de riñón de mamífero. En otro caso, la formulación es preparada para su administración por catéter.

[0115] La práctica de esta invención empleará, donde sea apropiado, y a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología celular, cultivo de células, biología molecular, biología transgénica, microbiología, la recombinación del ADN y la inmunología, los cuales están dentro de los conocimientos de los expertos en la materia. Estas técnicas están descritas en la literatura. Ver, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed., ed. por Sambrook y Russell (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2001); el tratamiento, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Using Antibodies, Second Edition por Harlow y Lane, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; Current Protocols in Cell Biology, ed. por Bonifacino, Dasso, Lippincott-Schwartz, Harford, and Yamada, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1999.

[0116] Otros casos y usos serán claros para los expertos en la materia a la luz de estas especificaciones.

CASOS EJEMPLARES

EJEMPLO 1

Aislamiento de células derivadas de riñón humano

[0117] Los riñones humanos normales se obtuvieron en el National Disease Research Interchange (NDRI, Philadelphia, PA). Cada riñón fue lavado en un medio modificado Eagles, De Dulbecco (DMEM-baja glucosa, Invitrogen, Carlsbad, CA) o solución salina amortiguada con fosfato (PBS, Invitrogen) para remover la sangre y los deshechos. El tejido se diseccionó de la región de la corteza externa, la región medular interna y la región subcapsular del riñón. Los tejidos fueron mecánicamente disociados en las placas de cultivo de tejido hasta que el tejido estuvo molido en una fina pulpa. Entonces el tejido fue transferido a un tubo cónico de 50 mililitros. El tejido fue digerido en alguna de estas prácticas de manipulación: (GMP): mezclas de enzimas con contenido de 0,25 unidades PZ de actividad/mililitro de colagenasa (NB6, N0002779, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany), 2,5 unidades/mililitro de dispasa (Dispase II 165 859, Roche Diagnositics Corporation, Indianapolis, IN), 1 unidad/mililitro de hialuronidasa (Vitrase, ISTA Pharmaceuticals, Irvine, Ca) o mezclas de enzima de grado no-GMP conteniendo 500 unidades/mililitro de colagenasa (Sigma, St Louis, MO), 50 unidades/mililitro de dispasa (Invitrogen) y 5 unidades/mililitro de hialuronidasa (Sigma). Las células derivadas de riñón también fueron aisladas con 50 unidades/mililitro de dispasa. La mezcla de enzimas se combinó ya sea con un medio de crecimiento epitelial renal (REGM) (Cambrex, Walkersville, MD) o con un medio de crecimiento de células madres mesenquimáticas (MSCGM) (Cambrex). Los tubos cónicos que contenían el tejido, el medio y las enzimas digestivas se incubaron a 37°C en un agitador orbital a 225 rpm por 1 hora.

[0118] La solución de digestión se centrifugó a 150 x g por 5 minutos y el sobrenadante se aspiró. El sedimento celular resultante fue resuspendido en 20 mililitros de REGM o MSCGM. La suspensión celular fue filtrada a través de un tamiz de nylon para células, de 40 micrones BD FALCON (BD Biosciences, San Jose, CA). El filtrado fue resuspendido en el medio (volumen total 50 mililitros) y centrifugado a 150 x g por 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y el sedimento celular se resuspendió en 50 mililitros de un medio de cultivo fresco. Este proceso se repitió dos veces más.

[0119] Luego de la centrifugación final se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en 5 mililitros de medio de cultivo fresco. El número de células viables se determinó usando el instrumento Guava (de Guava Technologies, Hayward, CA). Las células fueron sembradas en una densidad de sembrado de 5000 células/cm2 en 2% de gelatina o en frascos de cultivo de tejido revestido en laminina y cultivadas en una atmósfera con bajo oxígeno (hipoxia) o normal (normoxia). La Tabla 1 muestra la información y condiciones de crecimiento del donante usados para aislar poblaciones de células derivadas de riñón . Para obtener clones derivados de célula única de una célula renal, se realizaron técnicas de dilución limitativa. En total, las células fueron aisladas usando veinticuatro condiciones diferentes, de cuatro donantes cadavéricos de 39. 46, 21 y 10 años de edad.

EJEMPLO 2

Morfología de la célula derivada de riñón

[0120] Siete días después del aislamiento, se evaluaron las poblaciones de células derivadas de riñón a través del microscopio de luz y se observaron las características morfológicas de las células. En modo consecuente, todas las condiciones de aislamiento dieron como resultado células con una morfología epitelial (Tabla 1).

Tabla 1: Condiciones usadas para establecer cultivos de células derivadas de riñón. Enzimas de grado no GMP. Enzimas grado GMP (B). Dispasa (C). Edad del donante en años (Edad). Atmósfera donde crecieron los cultivos. (Atm). Normoxia (N). Hipoxia (H).

Aislación	Edad	Género del donante	Fuente del tejido	Enzimas	Medios	Sustrato	Atm	Morfología
1	39	Masculino	Corteza	A	REGM	Gelatina	N	Epitelial
2	39	Masculino	Médula	A	REGM	Gelatina	N	Epitelial
3	39	Masculino	Corteza	A	MSCGM	Gelatina	N	Epitelial
4	39	Masculino	Médula	A	MSCGM	Gelatina	N	Epitelial
5	39	Masculino	Corteza	A	REGM	Gelatina	H	Epitelial
6	39	Masculino	Médula	A	REGM	Gelatina	H	Epitelial
7	39	Masculino	Corteza	A	MSCGM	Gelatina	H	Epitelial
8	39	Masculino	Médula	A	MSCGM	Gelatina	H	Epitelial
9	39	Masculino	Corteza	A	REGM	Laminina	N	Epitelial
10	39	Masculino	Médula	A	REGM	Laminina	N	Epitelial
11	39	Masculino	Corteza	A	MSCGM	Laminina	N	Epitelial
12	39	Masculino	Médula	A	MSCGM	Laminina	N	Epitelial
13	39	Masculino	Corteza	A	REGM	Laminina	H	Epitelial
14	39	Masculino	Médula	A	REGM	Laminina	H	Epitelial
15	39	Masculino	Corteza	A	MSCGM	Laminina	H	Epitelial
16	39	Masculino	Médula	A	MSCGM	Laminina	H	Epitelial
17	46	Masculino	Subcapsular	B	REGM	Gelatina	N	Epitelial
18	46	Masculino	Corteza	B	REGM	Gelatina	N	Epitelial
19	46	Masculino	Corteza	A	REGM	Gelatina	N	Epitelial
20	46	Masculino	Médula	B	REGM	Gelatina	N	Epitelial
21	46	Masculino	Médula	A	REGM	Gelatina	N	Epitelial
18	46	Masculino	Corteza	B	REGM	Gelatina	N	Epitelial
22	21	Masculino	Subcapsular	A	REGM	Gelatina	N	Epitelial
23	21	Masculino	Corteza	A	REGM	Gelatina	N	Epitelial
24	10	Femenino	Corteza	C	REGM	Gelatina	N	Epitelial

[0121] Estos datos ilustran que las células derivadas de riñón humano pueden ser aisladas de un donante de cualquier edad o género, tanto como aisladas usando varias formulaciones de crecimiento del medio o condiciones del cultivo. La sencillez y consistencia del proceso de aislamiento muestra que las células derivadas de riñón son una valiosa fuente de células para su uso en terapias de base celular.

EJEMPLO 3

Potencial de crecimiento de células derivadas de riñón

[0122] Las células derivadas de riñón pueden ser propagadas ampliamente en un cultivo y son capaces de generar números significativos de células en un corto tiempo. Este es un criterio para el desarrollo de terapias celulares alogénicas.

[0123] Las células derivadas de riñón fueron sembradas en un cultivo de 5.000 células/cm2 en frascos T75 en REGM o MSCGM y cultivadas a 37°C en 5% de dióxido de carbono. Las células sufrieron un pasaje cada 2 a 5 días. En cada pasaje, las células fueron contabilizadas y se midió la viabilidad usando un instrumento Guava (Guava Technologies, Hayward, CA). Las poblaciones de células sufrieron pasajes continuos por varis semanas hasta que se llegó a la senescencia. La senescencia se determinó cuando las células ya no alcanzaron más que una duplicación de población durante el intervalo de tiempo del estudio. E este momento se calcularon las duplicaciones de la población [ln(rendimiento celular final/número inicial de células sembradas)/ln2].

[0124] Para el análisis de cariotipo, el pasaje 4 y el pasaje 10 de células derivadas de riñón, de aislamiento 22 a 23, se sembraron en frascos T25 y se y se dejó que adhirieran toda la noche. Entonces los frascos fueron llenados con REGM y se realizó el análisis de cariotipo.

[0125] Tabla 2 es un resumen de los datos d crecimiento para los aislamientos evaluados No hubo ningún efecto notorio en las características de crecimiento de las células con relación a la edad del donante, la fuente del tejido o las enzimas usadas para aislar las células.

[0126] El análisis de cariotipo se realizó en las aislamientos 22 y 23 tanto en el pasaje 4 como en el pasaje 10. Ambas demostraron un cariotipo normal en el pasaje 4 el pasaje 10.

Tabla 2: Resumen de los datos de potencial de crecimiento. Duplicación de la población (PD). Consulte la Tabla 1 para el número de aislamiento de referencias cruzadas.

Aislamiento	Días hasta la senescencia	Pasaje	PD	Viabilidad (%)
1	54	12	31.2	98
2	54	12	26.8	98
17	51	11	30.2	98
18	48	10	26.8	97
19	42	9	24.9	97
20	48	10	31.0	98
21	48	10	29.0	98
22	47	16	28.7	97
23	47	16	27.9	97

[0127] En promedio, las duplicaciones de población (DP) en la senescencia fue de 28,5, mientras que la viabilidad promedio fue de 97,6%.

[0128] En resumen, las células derivadas de riñón humano tienen un fuerte potencial de crecimiento en cultivo. Estos datos pueden usarse para estimar el número total de células generadas de un riñón humano completo. Si se procesara todo el tejido de riñón, y las células resultantes de cultivaran para 31 duplicaciones de la población, un riñón humano completo rendiría una estimación de 1,89 x1016 de células totales. Por tanto, considerando que una dosis terapéutica, de células es 1 x 108 células por persona, las células derivadas de riñón, aisladas de un riñón simple, serían suficientes para tratar 189 millones de pacientes. Por último, estas células son una fuente altamente expandibles de células para su uso en terapias celulares con base alogénica.

EJEMPLO 4

Fenotipo del marcador de superficie celular derivado de riñón

[0129] Se realizó un análisis citométrico de flujo de las células derivadas de riñón para determinar el fenotipo del marcador de superficie celular. Las células de 9 de los aislamientos en el Ejemplo 1 se expandieron al pasaje 4 y pasaje 10 en REGM en frascos T75 a37°C y 5% de dióxido de carbono. Las células adherentes fueron lavadas en PBS despegadas con TrypLE Select (Gibco, Grand Island, NY). Las células fueron cosechadas, centrifugadas y resuspendidas en 3% (v/v) FBS en PBS a una concentración de 2 x 105 células/mililitro. El anticuerpo específico se agregó a 100 microlitros de suspensión celular y la mezcla fue incubada en la oscuridad por 30-45 minutos a 4°C. Luego de la incubación, las células fueron lavadas con PBS y centrifugadas para remover el exceso de anticuerpo. Las células fueron resuspendidas en 500 microlitros de PBS y analizadas por coitometría de flujo. El análisis de citometría de flujo se realizó con un instrumento Guava (Guava Technologies, Hayward, CA). En la Tabla 3 se muestran los anticuerpos usados para caracterizar el fenotipo del marcador de superficie.

Tabla 3: Anticuerpos utilizados en la caracterización de celulas del fenotipo marcador de superficie de las celulas derivadas de riñón.

Anticuerpos	Fabricante	Número de catálogo
CD34	BD Pharmingen	555821
CD44	BD Pharmingen	555478
CD45R	BD Pharmingen	555489
CD117	BD Pharmingen	340529
CD141	BD Pharmingen	559781
CD31	BD Pharmingen	555446
CD49c	BD Pharmingen	556025
CD73	BD Pharmingen	550257
CD90	BD Pharmingen	555596
HLA-I	BD Pharmingen	555553
HLA-II	BD Pharmingen	555558
CD133	Miltenyi Biotech	120-001-243
SSEA4	R&D Systems	FAB1435P
CD105	SantaCruz Biotech	SC-21787
CD104	BD Pharmingen	555720
CD166	BD Pharmingen	559263
CD29	BD Pharmingen	555442
CD24	BD Pharmingen	555428
CD56	AbCAM	MEM188
CD138	BD Pharmingen	550805
CD80	BD Pharmingen	557226
CD86	BD Pharmingen	555659
E-cadherina	BD Pharmingen	612130

Anticuerpos	Fabricante	Número de catálogo
IgG-FITC	BD Pharmingen	555748
IgG-PE	BD Pharmingen	555749

[0130] La Tabla 4 muestra un resumen de los datos del fenotipo de todos los marcadores de superficie. Todos los aislamientos mostraron ser positivos a la tinción con CD24, CD29, CD44, CD49c, CD73, CD90, CD166, SSEA-4 y HLA I y negativos para la tinción con CD31, CD34, CD45, CD56, CD80, CD86, CD104, CD105, CD117, CD133, CD138, CD141, E-cadherina y HLA II. Además, todos los aislamientos analizados fueron expandidos en varias generaciones (pasaje 10) y aun así retenido su fenotipo de marcador celular.

[0131] Estas células expresan HLA I, pero no expresan HLA II, CD80 o CD86. Estas características de expresión celular reflejan la capacidad de la célula de evadir un sistema inmune huésped. Estos datos demuestran que las células derivadas de riñón son no inmunogénicas y pueden administrarse a un paciente sin la necesidad tipificación tisular o inmunosupresión.

[0132] En resumen, estos datos demuestran que las células derivadas de riñón de múltiples donantes pueden ser aisladas bajo diferentes condiciones (Tabla 1) y aun así mantener su fenotipo de marcador de superficie. Además, expresan marcadores progenitores putativos tales como CD24 y SSEA-4, pero no expresan marcadores maduros, comprometidos con el linaje, tal como E-cadherina. Finalmente, las células derivadas de riñón son no inmunógenas y por tanto son una atractiva fuente de células para su uso en terapias celulares alogénicas.

Tabla 4 : Resumen de los análisis de marcadores de superficie. Indeterminado (ND). Tinción positiva (+) . Tinción negativa (-).

		Aislamiento									
		1	2	17	18	19	20	21	22	23	24
Marcadores de superficie	**Nombre alternativo**										
CD29	B1-integrina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD44	HCAM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD49C	a3-integrina	ND	ND	+	+	+	+	+	+	+	+
CD166	ALCAM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD24	Heat shock antiqen-1	ND	ND	+	+	+	+	+	+	+	+
CD73	SH3	ND	ND	+	+	+	+	+	+	+	+
CD90	Thy-1	ND	ND	+	+	+	+	+	+	+	+
SSEA4	none	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CD31	PECAM-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD34	qp105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD45	Ly5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD56	NCAM	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-
CD104	b4-integrina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD138	Syndecan-1	ND	NO	-	-	-	-	-	-	-	-
CD141	Thrombomodulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E-CADHERINA	none	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD105	Endoglin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD117	c-Kit	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD133	AC133	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD80	B7-1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-
CD86	B7-2	NO	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-
HLA I	MHC-a,b,c	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+
HLAII	MHC-DP ,DQ. DR	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-

EJEMPLO 5

Expresión del gen de la célula derivada de riñón

[0133] Se extrajo ARN de las células de los aislamientos 1, 2 y 17-23, usando un equipo de extracción de ARN (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Valencia, CA). El ARN se eluyó en 50 microlitros de agua tratada DEPC, y fue almacenado a -80°C. El ARN se transcribió en forma inversa usando hexámeros aleatorios con los reagentes de transcripción inversa TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) a 25°C por 10 minutos, a 37°C por 60 minutos y a 95°C por 10 minutos. Las muestras se almacenaron a - 20°C. Usando los primeros descritos en la Tabla 5, se investigaron los genes seleccionados a través de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) convencional. La PCR se realizó en muestras de ADNc usando sets de primer RT2 PCR (SuperArray Biosciences Corp, Frederick MD).

Tabla 5: Cebadores utilizados en el studio

Gen	Número de Catálogo SuperArray
Oct-4	PPH02394A
Rex 1	PPH02395A
Sox2	PPH02471A
Human TERT (hTERT)	PPH00995A
FGF4	PPH00356A
Pax 2	PPH06881A
Cadherina-11	PPH00667A
WT1	PPH00254A
FOXD1	PPH01990A
WNT4	PPH02445A
Epo	PPH01338A
EpoR	PPH02642A
Eya1	PPH10542A
HNF3B	PPH00976A
Sox17	PPH02451A
Gata4	PPH010860A
Six2	PPH10860A
CXCR4	PPH00621 A
BMP-2	PPH00549A
BMP-7	PPH00527A
GDF5	PPH01912A

[0134] Se mezclaron el cebador con 1 microlitro de ADNc y 2X ReactionReady™ SYBR Green PCR Master Mix (Super- Array Biosciences) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se realizó la PCR usando un sistema ABI Prism 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las condiciones de ciclo termal inicialmente fueron de 50°C por 2 min y 95°C por 10 min, seguido por 34 ciclos de 95°C por 15 seg y 60°C por 1 min. Para GAPDH, se realizó PCR usando cebador GAPDH de Applied Biosystems (cat#: 402869) 1 microlitro de solución ADNc y mezcla universal 1 3 AmpliTaq Gold para la reacción moderada PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La concentración de cebador en la reacción final PCR fue 0,5 micromolar para tanto el cebador directo como el inverso y no se agregó la sonda TaqMan . Se realizaron muestras en 2% (w/v) de gel de agarosa y se tiñó con bromido de etidio (Sigma, St. Louis, MO). Se tomaron imagenes usando una película 667 Universal Twinpack (VWR International, South Plainfield, NJ) y una distancia focal de cámara Polaroid™ (VWR International, South Plainfield, NJ). Para cada gen analizado el producto PCR final fue extirpado del gel y la secuencia diana fue confirmada por la secuencia de ADN.

Análisis de RT-PCR

[0135] Todas las aislaciones analizadas mostraron un perfil de expresión de genes constante y estable. El análisis RT-PCR se realizó en aislaciones 1, 2, y 17-23 para detectar la expresión de marcador de genes de desarrollo temprano (Oct-4, Rex-1, Sox2, FGF4, hTert), marcadores de genes de desarrollo del riñón (Pax-2, WT-1, Eya-1, Wnt-4, BMP-7, Cadherin-11, FoxD1), marcadores de genes mesenquimáticos metanéfricos (Pax-2, Eya-1, WT-1, Six2, and FoxD1), y genes que promueven la supervivencia del mesénquima metanéfrico (BMP-7). Adicionalmente, se analizó la expresión de otros genes del desarrollo, tales como genes endoderermales (HNF3B, CXC-R4, Sox-17, GATA-4) así como marcadores de genes que promueven la reparación renal o tienen valor terapéutico en el tratamiento de la enfermedad de riñón (Epo, EpoR, BMP-7, BMP-2, GDF5).

[0136] Tal como se muestra en la Tabla 6, todas las aislaciones mostraron expresión positiva para Oct-4 y Rex-1 y expresión negativa para Sox2, FGF4, hTERT y Wnt-4. Las aislaciones 17-23 mostraron expresión positiva para Pax-2, WT1, Cadherin-11 y FoxD1. Las aislaciones 22 y 23 mostraron expresión positiva para Eya-1, Sox-17 y CXCR-4 y expresión negativa para GATA-4. Las aislaciones 17-23 expresaron EpoR, pero no expresaron Epo. Las aislaciones 17-22 expresaron BMP-2, BMP-7 y GDF5. Adicionalmente, todas las aislaciones pueden ser expandidas por varias generaciones (pasaje 10) y aun así retener su fenotipo de expresión de genes.

Tabla 6: Resumen del análisis de la expresión génica. Expresión positiva (+). Expresión negativa (-). Indeterminado (ND) . Los genes que funcionan durante el desarrollo temprano (Desarrolloprecoz) . Los genes que funcionan durante el desarrollo del riñón (desarrollo renal). Marcadores mesenquimales metanéfricos (Met) . Marcadores de linaje endodérmico (endodermo) . Los genes implicados en la supervivencia del riñón (renoprotector) . Los genes implicados en la supervivencia mesénquima metanéfrico (Supervicencia) .

Nombre del Gen	**Función**	**Aislamiento**								
		1	2	17	18	19	20	21	22	23
Oct4/pfu	Desarrollo precoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rex-1	Desarrollo precoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sox2	Desarrollo precoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FGF4	Desarrollo precoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hTert	Desarrollo precoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pax2	Desarrollo renal, Met	ND	ND	+	+	+	+	+	+	+
Cadherin-11	Desarrollo renal	ND	ND	+	+	+	+	+	+	+
FoxD1	Desarrollo renal, Met	ND	ND	+	+	+	+	+	+	+
WT-1	Desarrollo renal, Met	ND	ND	+	+	+	+	+	+	+
Eya1	Desarrollo renal	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+
Wnt-4	Desarrollo renal	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
S IX2	Met	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-
GATA-4	Endodermo	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	-	-

Nombre del Gen	Función	Aislamiento								
		1	2	17	18	19	20	21	22	23
HNF3B	Endodermo	ND	ND	ND	NO	ND	ND	NO	+	+
CXC-R4	Endodermo	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+
Sox-17	Endodermo	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	+
Epo	Renoprotector	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-
EpoR	Renoprotector	ND	ND	+	+	+	+	+	+	+
BMP2	Renoprotector	ND	ND	+	+	+	+	+	ND	ND
GDF5	Renoprotector	ND	ND	+	+	+	+	+	ND	ND
BMP7	Desarrollo renal, supervivencia	ND	ND	+	+	+	+	+	ND	ND

[0137] En resumen, las células derivadas de riñón expresan genes implicados en el desarrollo temprano y el desarrollo del riñón. Expresan marcadores para el mesénquima metanéfrico y marcadores para las células progenitoras renales. Expresan marcadores endodermales así como factores Implicados en la reparación renal y la tubulogénesis.

[0138] En total estos datos demuestran que las células derivadas de riñón son una fuente de células progenitoras putativas que pueden ser usadas para terapias de base celular para proteger o reparar el tejido renal dañado.

EJEMPLO 6

Análisis de secreción de factores tróficos

[0139] Las células derivadas de riñón mostraron producir en forma consecuente factores tróficos que protegen y reparan el riñón. Por tanto, estas células pueden servir como agente terapéutico para tratar enfermedad del riñón.

[0140] Las células del pasaje 3, de las aislaciones 17-21 se sembraron en 5.000 células/cm2 en un frasco de aislación T75, cada uno conteniendo 15 mililitros de REGM. Se cultivó las células a 37°C en 5% de dióxido de carbono. Luego de una noche de cultivo, el medio fue cambiado a un medio libre de suero (DMEM baja glucosa (Gibco), 0,1% (w/v) de albúmina de suero bovino (Sigma), penicilina (50 unidades/mililitro) y estreptomicina (50 microgramos/mililitro) (Gibco) y cultivada por otras 8 horas. El medio controlado libre de suero fue recogido al final de la incubación por centrifugación a 14.000 x g por 5 min y almacenado a -20°C.

[0141] Se lavó las células con PBS, se las separó usando 4 milímetros de TrypLE Select (Gibco) y de las contó con un instrumento Guava (Guava Technologies, Hayward, CA) para estimar el número de células en cada frasco. Al usar Searchlight Proteome Arrays (Pierce Biotechnology Inc), se ensayó las muestras con ELISA para los siguientes factores tróficos: inhibidor tisular de metalproteinasa-1 (TIMP-1), inhibidor tisular de metalproteinasa-2 (TIMP-2), factor de crecimiento epitelial bb derivado de plaquetas (PDGF-bb), factor de crecimiento de queratinocito (KGF), factor de crecimiento del hepatocito (HGF), factor de crecimiento de fibroblastos básicos (FGF2), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factor de crecimiento epidérmico heparina-aglutinante (HB-EGF), proteína-1 quemotáctica de monocitos (MCP-1), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina -8 (IL-8), factor transformador del crecimiento alfa (TGFα), factor neutrófico derivado del cerebro (BDNF), factor 1b derivado del estroma humano (SDFIb), factor neutrófico ciliar (CNTF), factor básico de crecimiento nervioso (b-NGF), neurotrofina-3 (NT-3), oncógeno relacionado con el crecimiento alfa (GRO-α), interleuquina-1b (IL-1b), interleuquina-12p40 (IL-12p40), interleuquina-12p70 (IL-12p70), interleuquina-11 (IL-11), interleuquina-15 (I-15), metalproteina de matriz-2 (MMP-2), metalproteina de matriz matrix -9 (MMP-9), angiopoietina-2 (ANG-2) y hormona del crecimiento humano (HGH).

Análisis de la producción de factores tróficos

[0142] La secreción de 27 diferentes factores de crecimiento y citoquinas fueron analizados en las aislaciones 17-21. El resultado se resume en la Tabla 7. Todas las aislaciones secretadas TIMP-1, TIMP-2, VEGF, y MMP-2 a más de 300 picogramos/ mililitro/1x106 células/8 horas. Secretaron 50-300 picogramos/mililitro/1x106 células/8 horas de FGF2 y HGF y 1-50 picogramos/mililitro 1x106 células/8 horas de KGF, PDGF-bb, b-NGF, IL-12p40 y IL-11. No se detectó SDF-1, ANG-2, HGH y II-12p70.

[0143] En resumen, estos datos muestran que las células derivadas de riñón secretan varios factores tróficos para proteger y reparar el tejido renal dañado. Por ejemplo, FGF2, HGF, y TGFα han sido implicados en la reparación renal. Las células derivadas de riñón secretan estos factores en niveles elevados y consecuentes. Por tanto, estas células son una fuente valiosa de células para usar en terapias que apunten a enfermedades renales.

Tabla 7: Reflector multiplexado análisis de ensayo ELISA en la producción de factor trófico de las células derivadas renales. Aislamiento de " los medios " es una muestra de control en el medio libre de suero solo, sin condicionamientoLas unidades de los datos mostrados son pictogramas/milímetros/1x10^6 células/ 8 horas. Los resultados mostrados son la media de las medidas duplicadas.

Aislamiento	TIMP1	ANG2	KGF	KGF2	PDGF-bb	HGF	VEGF	HB-EGF	TGFa
Medio	<9.8	<9.8	<2.0	<10.9	<2	<6.2	<9.8	<3.7	<2.3
17	5699.4	<9.8	20	148.4	<2	91.9	416.3	46.1	67.7
18	6054.8	<9.8	11.1	62.4	5.7	91	329.7	35.1	59.1
19	6710.6	<9.8	35.1	160.1	<2	320.9	580.5	70.2	119
20	9483.7	<9.8	14.1	86.6	5	80.3	294.3	24.6	37.4
21	2705	<9.8	13.8	91.5	<2	162	298.4	32.4	34.6

Aislamiento	HGH	SDF1b	BNGF	MMP9	IL1b	MMP2	GROa	MCP1	IL6
Medio	<9.8	<50.0	1.2	<39.1	<0.4	<62.5	<0.8	2.1	<0.8
17	<9.8	<50.0	3	<39.1	<0.4	3240	36.8	29.8	38.7
18	<9.8	<50.0	6.5	145	1.6	3487.6	95	32.7	40.5
19	<9.8	<50.0	20.8	<39.1	3.3	3565.9	37.1	48.8	44.9
20	<9.8	<50.0	6.2	108	1.4	3191.3	499.8	340.9	80
21	<9.8	<50.0	5.8	<39.1	2.2	2814.1	14.2	30.2	19.5

Aislamiento	BDNF	NT3	IL15	TIMP2	IL8	IL11	IL12p40	IL12P70	CNTF
Medio	<6.2	<1.6	<0.8	10	<0.8	<2	<1.2	<1.2	9
17	<6.2	<1.6	3.4	2266.2	31.6	20.5	14.9	<1.2	30.1
18	<6.2	5.4	2.7	1841.4	115.8	20.8	6.2	<1.2	<7.8
19	<6.2	13	5.2	1376.7	36.4	29.3	21.5	<1.2	93
20	16.2	12.3	2.3	1785	622.2	20.5	8.7	<1.2	21.7
21	<6.2	<1.6	<0.8	1193	12	19.1	9.3	<1.2	<7.8

EJEMPLO 7

Crecimiento de células derivadas de riñón en andamios de poliéster.

[0144] Hay una necesidad significativa de materiales básicos que puedan usarse para reconstruir el tejido de un órgano. Las células derivadas de riñón fueron hechas crecer en andamios sintéticos de poliéster para dar como resultado estructuras similares al tejido, que son como bloques de material de construcción básicos para las aplicaciones en la manipulación del tejido renal.

[0145] Las células derivadas de riñón fueron hechas crecer en diversas películas de poliéster de fundición por solvente. Se preparó películas de 100 mm de diámetro 35/65 poli(epsilon- caprolactona-co-glicólido) (PCL/PGA) . Se preparó una solución de polímero 5 wt. % disolviendo 20 g de 35/65 PCL/PGA (Ethicon, Somerville, NJ) (viscosidad inherente = 1.45 decilitros/gram) en 380 g of 1,4-dioxano, anhidro (Aldrich, Milwaukee, WI) a 70 °C. Las películas fueron fundidas vertiendo 3,5 mililitros de solución de polímero en recipientes Petri con 100 x 15 mm de polimetilpenteno NALGENE (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA).

[0146] Se preparó películas de 100 mm de diámetro 45/55 poli(epsilon-caprolactona-co-glicólido) (PCL/PGA). Se preparó una solución de polímero 5 wt. % disolviendo 20 g de 45/55 PCL/PGA (Ethicon, Somerville, NJ) (viscosidad inherente = 1.88 decilitros/gram) en 380 g de 1,4-dioxano, anhidro (Aldrich, Milwaukee, WI) a 70 °C. Las películas fueron fundidas vertiendo 3,5 mililitros de solución de polímero en recipientes Petri con 100 x 15 mm de polimetilpenteno NALGENE (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA).

[0147] Se preparó películas de 55 mm de diámetro 45/55 poli(epsilon-caprolactona-co-gicolido) (PCL/PGA). 45/55 poli(epsilon-caprolactona-co-glicólido) (PCL/PGA). Se preparó una solución de 10 wt. % de polímero disolviendo 40 g de 45/55 PCL/PGA (Ethicon, Somerville, NJ) (viscosidad inherente = 1,88 decilitros/gram) en 360 g de 1,4-dioxano, anhidro (Aldrich, Milwaukee, WI) a 70 °C. Las películas fueron fundidas vertiendo 5.0 mililitros o 2.5 mililitros de solución polímero en recipientes Petri de polipropileno, de 55 x 15 mm (Ted Pella Inc., Redding, CA).

[0148] Se preparó películas de 55 mm de diámetro 40/60 poli(epsilon-caprolactona-co-L-láctido) (PCL/PLA) . Se preparó una solución de 10 wt. % de polímero 40 g de 45/55 PCL/PLA (Birmingham Polymers, Inc., Birmingham,

Al) (viscosidad inherente = 1,20 decilitros/gram) en 360 g de 1,4-dioxano, anhidro (Aldrich, Milwaukee, WI) (Aldrich, Milwaukee, WI). . Las películas fueron fundidas vertiendo 5.0 mililitros de solución polímero en recipientes Petri de polipropileno, de 55 x 15 mm (Ted Pella Inc., Redding, CA).

[0149] Todas las películas fundidas fueron colocadas en capas sueltas y ubicadas dentro de una vitrina de aspiración que opera con un flujo de velocidad de 100 pies/min por 4 días. El solvente residual se retiró de las películas por medio del secado en un horno de vacío (0,1-0,2 mm Hg) a 70°C por un mínimo de 4 días. Luego de enfriarse hasta alcanzar la temperatura del cuarto, las películas se esterilizaron incubando en 100% de etanol durante una noche a temperatura ambiente. Las películas entonces se secaron con aire, lavadas con PBS y se sembraron células de las aislaciones 17 o 18 en las películas a 5.000 células/cm2 en REGM y cultivadas a 37ºC por 4-9 días.

Análisls del crecimiento de las células derivadas del riñón sobre andamios de poliéster.

[0150] Las aislaciones 17 o 18 fueron cultivadas en REGM sobre varias películas de poliéster de fundición por solvente, como se resume en la Tabla 8. En cada caso, los andamios con base en PCL/PGA soportaron el crecimiento de una monocapa de células intactas. Además, las construcciones de la combinación célula/película fueron levantadas del recipiente de fundición, mientras se mantuvo una estructura en monocapa de células Estas construcciones célula/película de las células derivadas de riñón pueden ser usadas como láminas de material en las aplicaciones de manipulación de tejidos.

Tabla 8: Resumen de las células derivadas de riñón probado en diferentes películas.

Aislamiento	ANDAMIO
Aislamiento 17	35/65 PCL/PGA
Aislamiento 18	45/55 PCUPGA
Aislamiento 18	60/40 PCUPLA
Aislamiento 18	45/55 PCUPGA
Aislamiento 18	35/65 PCL/PGA

EJEMPLO 8

Tubogénesis in vitro de células derivadas de riñón

[0151] Las células derivadas de riñón pueden ser descongeladas en el pasaje 4 y pasaje 10 y luego trituradas en una suspensión celular simple de 4 x 104 células/mililitros en una solución de colágeno tipo I conteniendo 66% de nitrógeno 100 (3 miligramos/mililitro (Cohesion Technologies, Palo Alto, CA). Las células en suspensión pueden ser sembradas en una membrana epiplón descelularizada. La mezcla colágeno/célula puede ser incubada por 30 minutos a 37°C, 5% CO2, 95% de aire para permitir que el colágeno se gelifique, entonces de agrega medio de cultivo. Las células son alimentadas cada 3 días por 7 días. En el 7ºdía, los cultivos se tratan con diferentes concentraciones de factor de crecimiento hepatocito y luego cultivado hasta que se observa tubulogénesis. Estas observaciones demuestran que las células derivadas de riñón se pueden autoorganizar en estructuras tubulares in vitro. Estas estructuras tienen valor como bloques de construcción para las aplicaciones de reconstrucción del riñón así como para las pruebas de drogas en desarrollo y ensayos toxicológicos.

EJEMPLO 9

Células derivadas de riñón para pruebas de drogas y ensayos toxicológicos

[0153] Las células derivadas de riñón humano ofrecen nuevas oportunidades de descubrimientos in vitro y evaluación segura de nuevas moléculas terapéuticas. Los túbulos derivados de células derivadas de riñón habilitan el desarrollo de un modelo de sistema nefrotóxico así como nefrogénico para el descubrimiento de nuevas drogas regenerativas de riñón o renoprotectoras. Este descubrimiento de drogas de células derivadas de riñón y sistema de plataforma de ensayo toxicológico promoverá la investigación y el desarrollo de nuevos compuestos para el tratamiento de enfermedad de riñón.

[0154] Las células derivadas de riñón humano pueden ser cultivadas en 5.000 células/cm2 en pozos de una placa de 96 pozos usando los métodos descritos en el Ejemplo 8. Estas siembras sirven como sistema de ensayo para evaluar varios compuestos y pequeñas moléculas por su capacidad de promover o prevenir a formación de túbulos. Para determinar los efectos de los diferentes compuestos, se analizan pozos individuales a través de microscopio de

luz para la tubulogénesis y la formación de redes ramificadas de túbulos.. Además puede conducirse RT-PCR en las células en cada pozo individual, utilizando los métodos descritos en Ejemplo 5.

[0155] Las células derivadas de riñón pueden ser cultivadas en formato de 96 pozos y puede modularse la tubogénesis por la adición de varios compuestos y pequeñas moléculas de droga. Diferentes factores de crecimiento y drogas pueden inducir la tubulogénesis de las células derivadas de riñón y la ramificación así como aumentar la expresión genética de BMP-7, BMP-2, GDF5, BMP receptor-1 y BMP receptor-2. La regulación ascendente de estos genes se correlaciona con la formación aumentada de túbulos. Un aumento en BMP-7 también sugiere que la droga de prueba promoverá la reparación renal al aumentar el BMP-7 en el riñón dañado. De modo similar, una regulación descendente o ausencia de expresión genética, se correlaciona con la inhibición de tubulogénesis o citotoxicidad así como una capacidad disminuida para estimulación de la reparación del riñón por la droga de prueba.

[0156] En resumen, la explotación de la capacidad de las células derivadas de riñón para formar túbulos así como la expresión de moléculas BMP y sus receptores, ofrece la oportunidad de desarrollar un sistema de plataforma para el nuevo descubrimiento de una droga y un nuevo ensayo de toxicidad. Este sistema de ensayo propiciará la investigación y desarrollo de nuevos compuestos para el tratamiento de la enfermedad de riñón.

EJEMPLO 10

Multipotencialidad de las células derivadas de riñón

[0157] Las células derivadas de riñón son una fuente potencial de células progenitoras, capaces de diferenciación en adipocitos u osteoblastos. Estos datos demuestran la naturaleza multipotencial de las células derivadas de riñón e ilustran sus características como célula progenitora.

[0158] Para los ensayos de diferenciación, las células derivadas de riñón pueden ser cultivadas en un medio REGM en 5%-CO2 a 37°C por 1 semana antes de cambiar a un medio de diferenciación adipogénico (DMEM/F12, 3% FCS, 33 biotina micromolar,17 pantotenato micromolar, 100 insulina nanomolar, 1 dexametasona micromolar, 0,25 microgramo/mililitro de anfotericina B y 0,25 IBMX milimolar) u osteogénico (DMEM, 10% FCS, 0.2 ácido ascórbico milimolaracid, 25 β-glicerofosfato milimolar, 500 dexametasona nanomolar, y 20 glutamina nanomolar).Las células pueden ser cultivadas por 3 semanas adicionales con cambio de medio día por medio, luego fijadas por 10 minutos en 4% paraformaldehido. Adypocitesare es identificado por la tinción con Rojo Nilo (Molecular Probes; 1 :2000 in PBS) por 15 min. Los osteoblastos se identifican por el ensayo de fosfatasa alcalina usando 0,1 miligramos/mililitro Fast Blue BB salt (Sigma), 0,1 miligramos/mililitro de fosfato Naphthol AS-MX (Sigma), y 2 MgCl2 milimolar en 0,1 Tris-HCl molar (pH 8,5). Se captura imágenes con una cámara digital Nikon conectada con el microscopio invertido Nikon TS 100 ECLIPSE . 10T1/2 células se usaron como un control positivo en los ensayos de diferenciación.

[0159] Luego de tres semanas en un medio adipogénico, puede identificarse adipocitos por la acumulación de gotas rojas de lípidos manchados dentro del compartimento citoplasmático de las células derivadas de riñón. Luego de tres semanas en un medio osteogénico, puede identificarse los osteoblastos por un aumento en la actividad fosfatasa alcalina comparada con el crecimiento de células derivadas de riñón en únicamente REGM.

[0160] En resumen, estos datos demuestran que las células derivadas de riñón son potenciales células progenitoras capaces de diferenciación en al menos dos linajes celulares bien diferenciados, adipocitos y osteoblastos. Por tanto estas células son una fuente para aplicaciones de la terapia celular para la regeneración renal.

EJEMPLO 11

Tubulogénesis *in vivo* de células derivadas de riñón

[0161] Se sembraron tres películas 35/65 PCL/PGA (10 cm diámetro x 2 mm grosor) con células derivadas de riñón humano (10.000 células/cm2) y se las cultivaron en REGM (Cambrex) a 37°C y 5% de dióxido de carbono por 8 días (como se describe en el Ejemplo 7). Se preparó un andamio de espuma 35/65 PCL/PGA de acuerdo con los métodos descritos en Patente de EEUU Nro. 6,355,699. La construcción película/célula se removió del recipiente de fundición de la película, despegada en tres capas y aplicada a un soporte en andamio de espuma 35/65 PCL/PGA. Esta construcción fue cultivada por 24 horas más y luego cortada en piezas cuadradas de 3 x 3 mm anterior a la implantación. Los implantes fueron lavados con PBS y transferidos a un sembrado de 6 pozos llenos de PBS para el transporte.

[0162] Los implantes fueron implantados subcutáneamente en forma bilateral en la región dorsal lateral torácico lumbar de los ratones SCID. Los ratones SCID machos (Fox Chase SCID CB 17SC strain) fueron comprados a Taconic Inc., (Hudson, NY) y tenían 5 semanas de edad. Los implantes fueron colocados en cada ratón SCID. Se hizo dos incisiones en la piel, cada una de aproximadamente 5 mm de largo, en el dorso del ratón. Las incisiones se ubicaron transversalmente sobre el área lumbar cerca de 5 mm de la zona craneal hacia la cresta ilíaca palpable,

una en cada lado de la línea media. La piel se separó del tejido conectivo subyacente para hacer un pequeño bolsillo, y se colocó el implante a 10 mm en disección craneal de la incisión. Luego se cerraron las incisiones de la piel con clips de metal para heridas Reflex 7. Luego de 3 semanas se removieron los implantes del bolsillo subcutáneo, fijado en 10% de formalina, incrustado en una cera de parafina, seccionado, teñido con hematoxilina y eosina (H&E) y evaluado por un patólogo usando técnicas microscópicas.

[0163] Las células derivadas de riñón formó estructuras tubulares dentro de las capas de la película PCL/PGA. Estos túbulos mostraron una pared epitelial particular y un lumen claro. Las células derivadas de riñón infiltraron el andamio de espuma, depositando matriz extracelular y formaron una estructura densa, semejante a tejido. Adicionalmente, las células derivadas de riñón dentro de la espuma estimularon la angiogénesis y la formación de redes vasculares.

[0164] En resumen, las células específicas de riñón humano formaron estructuras tubulares luego de la exposición a un microambiente in vivo. La capacidad de las células derivadas de riñón para responder a las señales del microambiente y para instruir a las células a que formen túbulos, ilustra también a naturaleza progenitora renal de estas células. Además, las células migraron hacia los andamios de espuma, formando una estructura similar a tejido que promovió la angiogénesis. estos datos ilustran la utilidad de las células derivadas de riñón como bloques de construcción para reconstruir túbulos y en última instancia para el uso en aplicaciones de ingeniería de tejidos renales.

EJEMPLO 12

Las células derivadas de riñón son renoprotectoras en animales modelos con enfermedad renal

[0165] Las células derivadas de riñón secretan varios factores tróficos implicados en la reparación y la regeneración renal (véase el Ejemplo 6). Por lo tanto, cuando las células derivadas de riñón se administran a un animal que ha sufrido una lesión renal, las células producirán factores tróficos que protegen y reparan el riñón dañado. Las células derivadas de riñón serán probadas como protección renal en tres animales modelos diferentes con insuficiencia renal, lesión inducida por fármacos, lesión por reflujo isquémico y obstrucción de uréter inducida por lesión.

Inducción de insuficiencia renal

[0166] La isquemia / lesión por reflujo será inducida como se explica a continuación. Los ratones serán colocados en una jaula limpia con agua suficiente. El área quirúrgica será preparada recortando el cabello. Los ratones (ratones C57BL/6J de seis a ocho semanas de edad adquiridos en el laboratorio de Jackson, Bar Harbor, Maine) serán anestesiados por inyección de ketamina (100 miligramos / kilogramo) y xilazina (miligramos / kilogramo) a través de inyección intraperitoneal. El nivel de anestesia se evalúa por la ausencia de reflejo de pellizco del dedo del pie.

[0167] Los ratones anestesiados serán colocados sobre su lado dorsal y la parte ventral se desinfectara con betadina. Se realizará una pequeña incisión de línea media, primero en la piel y luego en el músculo peritoneal. Los intestinos se moverán suavemente a un lado, los riñones serán expuestos y las arterias renales identificadas. Las dos arterias renales se sujetarán por 25 o 30 minutos usando abrazaderas vasculares. Durante este tiempo, el ratón se mantendrá caliente utilizando agua en circulación con almohadillas térmicas. Además, el área expuesta se mantendrá caliente con trozos de gasa empapados en una en solución salina estéril y solución salina caliente. Treinta minutos más tarde, se quitarán las abrazaderas, la pared peritoneal será suturada con uno o dos puntos de sutura discontinua y la piel se cerrará con grapas para heridas. La Insuficiencia renal inducida por fármacos se llevará a cabo en los ratones utilizando una única inyección subcutánea de cisplatino (5 o 10 miligramos / kilogramo).

[0168] La insuficiencia renal inducida por obstrucción del uréter se generará en los ratones de la siguiente manera. Los ratones serán anestesiados con isofluorano (1-3%). El abdomen se afeitará y se lavará con alcohol al 70% seguido de betadina. Se realizara una incisión de línea media abdominal de 2 centímetros y la pared abdominal se abrirá. El riñón izquierdo y el uréter Serán diseccionados libres de grasa. Se colocarán dos lazos 8-0 no absorbibles en el uréter que se secciona a continuación, entre las ligaduras. Los intestinos se introducen en el abdomen, la capa de músculo será cerrada con Dexon 4-0 y la piel fijada con grapas.

Trasplante de la célula

[0169] En el momento de la inyección de células, las células derivadas de riñón se descongelarán a 37°C (baño de agua) se lavarán dos veces en PBS y serán resuspendidas en 1 ml de PBS. Las células se contarán utilizando un hemocitómetro. La viabilidad celular será determinada por exclusión del colorante azul de tripano. Las células deben tener una viabilidad del 75% o mayor en el momento de la inyección. Si la viabilidad es de menos de 75%, las células serán descartadas. Las células serán reconstituidas a una concentración de 0,5 x 106 microlitros de PBS o células/300 0.1x106 células/300 microlitros de PBS. Las células suspendidas en PBS (vehículo portador) se inyectarán en la vena facial anterior utilizando una jeringa de 1 ml provista de una aguja de calibre 26. Para los estudios de isquemia / reflujo y estudios de lesiones inducidas por obstrucción del uréter, se inyectará a diez ratones

por grupo de tratamiento con células o de PBS dos horas después de una lesión. Para los estudios de insuficiencia renal inducidos por fármacos, todos los animales reciben células o PBS veinticuatro horas después de la lesión.

[0170] Las muestras de sangre (50 microlitros) serán obtenidas de la vena de la cola antes de la inducción de la insuficiencia renal y en los días 2, 5, y 7. La creatinina en suero será analizada usando la detección por HPLC. Los niveles sanguíneos de urea-nitrógeno (BUN) serán medidos usando un kit de detección de Roche Diagnostics Systems (Branchburg, NJ).

[0171] Debido a la secreción de factores tróficos renoprotectores, las células derivadas de riñón pueden prevenir el daño renal en modelos animales de insuficiencia renal.

EJEMPLO 13

Evaluación de la eficacia renoprotectora de células derivadas de riñón humano de enfermedad de obstrucción nefropatía en un modelo roedor

[0172] El propósito de este estudio piloto fue evaluar los efectos renoprotectores de células derivadas de riñón humano (HKDC) en un modelo de lesión renal de una obstrucción del uréter unilateral (OUU). El modelo UUO es un modelo efectivo a corto plazo en nefropatía obstructiva y fibrosis túbulo-intersticial. Para evaluar la eficacia renoprotectora, se evaluaron en los ratones lesionados la biodistribución de células, sangre, urea, nitrógeno (BUN), la creatinina sérica (SCR) y la lesión histológica doce días después del trasplante de células. En este informe, los datos muestran que en el momento de la necropsia, HKDC estaban presentes tanto en lesionados como no riñones lesionados. La evaluación histológica demostró que la administración de 0.2 X 106 HKDC causó una reducción mensurable en la medida global de la obstrucción del uréter inducida por la lesión tubular.

[0173] A pesar de las muchas etiologías diferentes de la enfermedad de renal crónica (ERC), la inflamación dentro del espacio tubulointersticial, que conduce a la fibrosis, es una característica histológica de la insuficiencia renal crónica. Aunque el uso generalizado de conversión de la angiotensina- inhibidores de la enzima y bloqueadores del receptor de angiotensina para ERC representan un éxito notable médico, estas drogas rara vez detienen la fibrosis renal. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas estrategias que prevengan o inhiban la fibrinogenesis intersticial es un objetivo importante para mejorar el estándar de atención actual. A pesar de los esfuerzos enfocados en el desarrollo de terapias farmacológicas sobre moléculas pequeñas, las investigaciones basadas en terapia con un enfoque en las células son limitadas.

[0174] Estudios recientes han demostrado que la médula ósea deriva células madre mesenquimales (MSC) son renotrópicas y ayudan a reparar los riñones después de la droga y la lesión inducida por isquemia-reperfusión. Morigi y otros, las células madre mesenquimales son renotrópicas, ayudando a reparar el riñón y mejorar la función en la insuficiencia renal aguda. J Am Soc Nephrol. 2004 Jul. 15 (7): 1794-804; Klahrand Morrissey. Nefropatía obstructiva y fibrosis renal. Am. J Physiol Renal. 2002 Nov. 283 (5): F861-75. 2002. También se demostró que las MSC podrían prevenir la insuficiencia renal aguda inducida por glicerol. Herrera et al, las células madre mesenquimales contribuyen a la reparación de la lesión renal epitelial tubular aguda. Int. J Mol Med. Diciembre 2004, 14 (6):1035-41. Curiosamente, estos MSC-mediadas, efectos protectores no pueden no actuar a través de diferenciación de células madre mecanismos, sino más bien a través de la secreción de factores tróficos importantes que impiden la lesión celular y promueven la reparación epitelial y endotelial.

[0175] las MSC de hecho han mejorado los resultados de la lesión renal aguda en varios modelos animales, pero si las MSC puede retrasar la insuficiencia renal en la enfermedad renal crónica todavía no se ha determinado. Los estudios han demostrado recientemente que las MSC trasplantadas podrían prevenir la pérdida de capilares peritubulares, así como reducir los marcadores de fibrosis renal en un modelo de ratón de la enfermedad de Allport. Las células madre mesenquimales multipotentes Ninichuk y otros, reducen la fibrosis intersticial, pero que no retrasa la progresión de la enfermedad renal crónica en ratones con deficiencia de collagen4A3. Kidney Int... 2006 Jul; 70 (1): 121-9. Desafortunadamente, este estudio también muestra que las MSC trasplantadas fueron incapaces de promover la supervivencia de los animales o incluso retrasar la aparición de la insuficiencia renal.

[0176] En el presente estudio fueron investigados los efectos renoprotectores y anti-fibróticos de HKDC en el modelo de ratón WO. El modelo OUU de la nefropatía obstructiva ha demostrado ser una herramienta valiosa para el estudio de los cambios moleculares y celulares que se producen dentro del intersticio del riñón. Este modelo también ha demostrado utilidad en la determinación de la eficacia de los tratamientos destinados a detener o incluso revertir la fibrosis, y en última instancia, la progresión de muchas enfermedades renales crónicas.

Métodos

[0177] *Modelo animal.* Trece, ratones hembra CS7BL/6J (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) fueron anestesiados con isofluorano 1-3%. El abdomen de cada animal fue afeitado y se limpió con alcohol al 70%, seguido de betadine. Se realizó una incisión de línea media abdominal. La pared abdominal se abrió y los intestinos se

movieron hacia fuera sobre el pecho y fueron protegidos con una gasa húmeda. Se localizó el riñón izquierdo y se diseccionó el uréter de grasa. Dos, lazos no absorbibles 8-0 fueron colocados en el uréter. Para el grupo de tratamiento falso, no se utilizaron los lazos. Los intestinos se introducen en el abdomen y un centímetro cúbico de solución salina caliente se colocó en la cavidad peritoneal. La capa muscular entonces fue cerrada con Dexon 4-0 y la piel se cerró con grapas. El isoflurano se interrumpió y a los ratones se les permitió recuperarse con oxígeno al 100% en un cojín de calefacción hasta ser ambulatorios.

[0178] *Preparación de células*. HKDC, número de lote 032906, el pasaje 6 fue aislado y expandido como se describe en el informe CBAT del invento, "Aislamiento de células renales humanas derivadas (Estudio 2)", 29 de marzo de 2006, David Colter, Agnes Seyda, Charito Buensuceso, Walter Laredo). HUTC (lote # 2512380, pasaje 6) fue obtenido del tallo de la célula Venture interna (Radnor, PA).

[0179] *Trasplante de células.* Inmediatamente después de que los animales se recuperaron de la cirugía, el HUTC y el paso 10 hKDCs se descongelaron a 37°C, se lavaron dos veces en solución salina equilibrada de Hanks sin Ca^{++}/Mg^{++} (HBSS) y se resuspendieron en un mililitro de HBSS. A continuación las células se contaron usando un hemocitómetro y la viabilidad celular se determinó por exclusión del colorante azul de tripano. Las células se reconstituyeron en una concentración células viables / mililitro de $1.0x10^6$ en HBSS. Las células suspendidas en 200 microlitros de HBSS fueron luego trasplantadas, a través de inyección en la vena de la cola, usando una jeringa de un mililitro provista de una aguja de calibre 27.

Tabla 9. *Diseño experimental.* Los animales de simulación fueron sometidos a procedimientos quirúrgicos. Sin embargo, el uréter no estaba obstruido.

Grupo de Tratamiento	Número de animales	Género	Material de prueba	Dósis celular
1	3	Femenino	Sham	NA
2	5	Femenino	HUTC	$0.2x10^6$
3	5	Femenino	hKDC	$0.2x10^6$

[0180] *Biodistribución* . Todos los animales se sacrificaron por asfixia con dióxido de carbono el día 12 después del trasplante de células.
Los riñones, los pulmones, el cerebro y el corazón se eliminaron de cada animal. La mitad de cada riñón se fijó entonces en formalina tamponada al 10% para análisis histológico. El medio riñón restante, y todos los demás órganos se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido. Todos los órganos congelados se homogeneizaron utilizando un homogeneizador Omni TH equipado con una sonda desechable rotor de generador de estator 7 mm (Omni International , Inc. , Marietta , GA) . A continuación se extrajo el ARN total utilizando un kit de RNeasy Plus Mini (Qiagen, Valencia , CA) . El ARN se eluyó con 50 ml de agua tratada con DEPC y se cuantificó utilizando un NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) . Luego se transcribe el ARN, revertir usando hexámeros aleatorios y reactivos de transcripción reversa TaqMan (Applied Biosystems , Foster City, CA). Las reacciones de PCR se realizaron a continuación en muestras de cDNA utilizando sondas específicas para humanos de microglobulina β2 (número de catálogo 4310886E , Applied Biosystems , Foster City , CA) . El PCR se realizó a continuación, utilizando un Prisma 7900 HT sistema de detección de secuencias ABI (Applied Biosystems , Foster City , CA).

[0181] *Análisis químico del suero .* En el momento de la necropsia, se recogió sangre entera, se dejó coagular, se colocó en tubos de microcentrifugación y se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos para separar el suero de otros componentes de la sangre. Las muestras de suero fueron analizados utilizando un analizador químico VetAce (Alfa Wassermann Diagnostic Technologies, LLC , West Caldwell , NJ).

[0182] *Evaluación de Histología.* El tejido renal fijo se ha integrado con cera de parafina, se seccionaron (5 mm de grosor) y se tiñeron con hematoxilina / eosina (H & E) y tricrómico de Masson. Las secciones fueron marcadas para la lesión tubular (necrosis tubular, dilatación, intersticial infiltrado celular) y la fibrosis intersticial (deposición de colágeno) usando un índice de puntuación que oscila entre 1 y 4 (1 = mínima, 2 = leve, 3 = moderado, 4 = severo). El evaluador estaba cegado a la asignación del grupo de tratamiento.

Resultados

[0183] *Biodistribución.* Para evaluar la biodistribución de órganos de las células trasplantadas, se aplicó un método basado en RT-PCR. Se utilizó un cebador / sonda PCR específico para microglobulina β2 transcrita de RNA humano en tiempo real. Como se muestra en la 35 Tabla 10 y la Tabla 11, tanto HUTC como hKDCs podría ser detectada en muchos, pero no en todos los animales. El tratamiento simulado sirvió como un control negativo eficaz debido al hecho de que no hay células humanas trasplantadas en estos animales. Como se muestra en la Tabla 10, el corazón del animal 1 mostró valores de Ct en las tres mediciones replicadas. El valor medio de Ct para esta muestra fue de 36,5. Por lo tanto, la señal positiva se determina cuando todas las mediciones replicadas mostradas

en la Tabla 10 tienen un valor positivo Ct, y el valor medio es Ct <36,5. Debido a que el animal 1 no recibió las células humanas, un valor de Ct del 36,5 o mayor indica que no se detectan células humanas. Como se muestra en la Tabla 11, ningún tejido de los animales tratados mostró transcripciones celulares humanas. Sin embargo, se detectó HUTC en los órganos de 2 de los 5 animales del grupo. Se detectaron las células en los pulmones, el riñón lesionado y el no lesionado del animal 7, y ambos riñones, el cerebro y los pulmones del animal 8. Se detectó hKDCs en 3 de los 5 animales del grupo. Se detectaron las células en el riñón lesionado y el no lesionado, corazón, cerebro y los pulmones del animal 11. También Se detectó en el riñón lesionado, en el no lesionado, y el corazón del animal 12. También se detectaron hKDCs en el riñón no lesionado, corazón y pulmones del animal 13.

[0184] *Química sérica.* Para evaluar la función renal, se midió BUN y SCR. En el modelo de obstrucción unilateral, uno de los dos riñones permanece ileso. Por consiguiente, el animal es capaz de compensar cualquier pérdida de la función renal sostenida del riñón lesionado. Debido al riñón ileso restante, es esperable que tanto BLTN como SCR estén dentro del rango normal. Como se muestra en la Tabla 12, los niveles séricos tanto de BUN como de SCr permanecen sin cambios entre todos los grupos de tratamiento. El tratamiento simulado mostró una medición de BUN media de 20.7 +/- 3.2 mg/dL y SCr de 0.4 +/- 0.06 mg/dL. El tratamiento HUTC dio lugar a una medición media de BUN de 25,6 + / -5,0 mg / dl y SCr de 0,4 + / - 0,07. El tratamiento HKDC resultó en una medición de BUN media de 26,0 +/- 4.7 mg/dL y SCr de 0.4 +/- 0.04 mg/dL.

[0185] *Histología.* La lesión tubular y el grado de fibrosis intersticial se midieron cualitativamente en las secciones histológicas de simulado HUTC y animales tratados con HKDC. Como se muestra en la Tabla 13, el tratamiento simulado produjo lesión tubular mínima, con una puntuación de 1,0 en los tres animales evaluados. HUTC El tratamiento dio como resultado reparación tubular mínima, con una puntuación media de El tratamiento La lesión de 4,0 Sin embargo, en comparación con HUTC, el tratamiento HKDC resultó en una reducción en el alcance general de la lesión tubular, con los cinco animales presentando una puntuación de la lesión de 3,0En lo que respecta a los cambios fibróticos, los animales tratados con simulación mostraron un grado mínimo de deposición de colágeno en el intersticio de los riñones y por lo tanto fibrosis mínima (puntuación = 1,0 media). Sin embargo, los tratamientos HUTC y HKDC mostraron evidencia de fibrosis leve, con puntuaciones medias de 2,4 y 2,0, respectivamente.

[0186] En este informe se describen los efectos renoprotectores y anti-fibróticos de HKDC. Los datos muestran que las células humanas trasplantadas residen en ambos riñones lesionados y no lesionados doce días después del transplante. El tratamiento HKDC causó una reducción mensurable en el grado general de lesión tubular en comparación con el tratamiento HUTC. Por lo tanto, este estudio piloto indica que HKDC provoca efectos renoprotectores en el modelo OUU de la nefropatía obstructiva.

Tabla 10: Biodistribución. El tejido del órgano fue evaluado mediante RT-PCR por la presencia de los transcritos de microglobulina β2 de ARN humanos. El análisis se llevó a cabo tres veces para cada tejido. Consulte la Tabla 9 para las asignaciones del grupo de tratamiento. "Cu", ciclo umbral. "nd", no se detecta. "Riñón (I)", el riñón lesionado. Los datos que se muestran aquí se resumen en la Tabla 11.

Grupo de tratamiento 1			Grupo de tratamiento 2			Grupo de tratamiento 3		
Animal	**Tejido**	**Cu**	**Animal**	**Tejido**	**Cu**	**Animal**	**Tejido**	**Cu**
1	Corazón	35.78	4	Riñón (I)	37.86	9	Riñón (I)	nd
1	Corazón	37.20	4	Riñón (I)	nd	9	Riñón (I)	nd
1	Corazón	36.40	4	Riñón (I)	nd	9	Riñón (I)	nd
1	Cerebro	nd	4	Corazón	nd	9	Corazón	nd
1	Cerebro	nd	4	Corazón	nd	9	Corazón	nd
1	Cerebro	39.13	4	Corazón	nd	9	Corazón	nd
1	Pulmones	nd	4	Cerebro	nd	9	Cerebro	37.37
1	Pulmones	37.76	4	Cerebro	nd	9	Cerebro	nd
1	Pulmones	nd	4	Cerebro	nd	9	Cerebro	nd
2	Corazón	nd	4	Pulmones	nd	9	Pulmones	nd
2	Corazón	nd	4	Pulmones	35.84	9	Pulmones	nd
2	Corazón	nd	4	Pulmones	nd	9	Pulmones	nd
2	Cerebro	nd	5	Riñón (I)	nd	10	Riñón (I)	nd
2	Cerebro	nd	5	Riñón (I)	nd	10	Riñón (I)	37.36
2	Cerebro	nd	5	Riñón (I)	nd	10	Riñón (I)	nd
2	Pulmones	nd	5	Corazón	nd	10	Corazón	nd
2	Pulmones	nd	5	Corazón	nd	10	Corazón	nd
2	Pulmones	nd	5	Corazón	nd	10	Corazón	nd
3	Corazón	38.72	5	Cerebro	nd	10	Cerebro	nd
3	Corazón	nd	5	Cerebro	32.80	10	Cerebro	nd
3	Corazón	nd	5	Cerebro	nd	10	Cerebro	nd
3	Cerebro	nd	5	pulmones	nd	11	Riñon (I)	36.48
3	Cerebro	nd	5	Pulmones	nd	11	Riñón (I)	38.58
3	Cerebro	nd	5	Pulmones	nd	11	Riñón (I)	35.72
3	Pulmones	nd	6	Riñón (I)	nd	11	Riñón	32.57
3	Pulmones	nd	6	Riñón (I)	nd	11	Riñón	32.22
3	Pulmones	nd	6	Riñón (I)	nd	11	Riñón	31.61
			6	Corazón	nd	11	Corazón	33.55

(continuación)

Grupo de tratamiento 1			Grupo de tratamiento 2			Grupo de tratamiento 3		
Animal	**Tejido**	**Cu**	**Animal**	**Tejido**	**Cu**	**Animal**	**Tejido**	**Cu**
			6	Corazón	nd	11	Corazón	34.21
			6	Corazón	nd	11	Corazón	32.91
			6	Cerebro	nd	11	Cerebro	35.33
			6	Cerebro	nd	11	Cerebro	34.94
			6	Cerebro	37.62	11	Cerebro	35.28
			6	Pulmones	nd	11	Pulmones	33.73
			6	Pulmones	nd	11	Pulmones	34.01
			6	Pulmones	nd	11	Pulmones	33.99
			7	Riñón (I)	33.41	12	Riñón (I)	34.62
			7	Riñón (I)	33.12	12	Riñón (I)	34.84
			7	Riñón (I)	33.45	12	Riñón (I)	34.51
			7	Riñón	34.07	12	Riñón	34.94
			7	Riñón	33.78	12	Riñón	35.55
			7	Riñón	33.81	12	Riñón	34.32
			7	Corazón	nd	12	Corazón	34.52
			7	Corazón	38.79	12	Corazón	34.71
			7	Corazón	39.97	12	Corazón	34.38
			7	Cerebro	nd	12	Cerebro	25.19
			7	Cerebro	nd	12	Cerebro	nd
			7	Cerebro	nd	12	Cerebro	nd
			7	Pulmones	31.69	12	Pulmones	nd
			7	Pulmones	31.84	12	Pulmones	nd
			7	Pulmones	31.92	12	Pulmones	39.21
			8	Riñón (I)	nd	13	Riñón (I)	nd
			8	Riñón (I)	nd	13	Riñón (I)	38.66
			8	Riñón (I)	nd	13	Riñón (I)	nd
			8	Riñón	34.16	13	Riñón	33.52
			8	Riñón	34.61	13	Riñón	33.36
			8	Riñón	34.08	13	Riñón	32.69
			8	Corazón	nd	13	Corazón	34.76
			8	Corazón	nd	13	Corazón	34.55
			8	Corazón	nd	13	Corazón	34.28
			8	Cerebro	31.59	13	Cerebro	nd
			8	Cerebro	31.73	13	Cerebro	38.78
			8	Cerebro	31.76	13	Cerebro	38.01
			8	Pulmones	32.64	13	Pulmones	33.52
			8	Pulmones	32.96	13	Pulmones	33.79
			8	Pulmones	33.44	13	Pulmones	34.11

Tabla 11: Resumen de biodistribución. Los datos mostrados describen el número de animales positivos para las células humanas/número total de animales analizados. Se determina como señal positiva cuando las tres mediciones repetidas que se muestran en la Tabla 10 tienen un valor Ct positivo y el valor Ct medio es <36.5. Consulte la Tabla 9 para las asignaciones del grupo de tratamiento. "nd",no determinado. "Riñón (I)", riñón lesionado

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Riñón (I)	nd	1/5	2/5
Riñón	nd	1/5	3/5
Corazón	0/3	0/5	3/5
Cerebro	0/3	1/5	1/5
Pulmones	0/3	1/5	2/5

Tabla 12: Química del suero. Consulte la Tabla 9 para el grupo de tratamiento asignaciones EEM, error estándar de la media.

Tratamiento	Número de Animal	BUN (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
1	1 2 3	22 23 17	0.4 0.4 0.3
		Promedio: 20.7 **EEM: 3.2**	**Promedio: 0.4** **EEM: 0.06**
2	4 5 6 7 8	24 21 26 23 34	0.4 0.5 0.4 0.4 0.3
		Promedio: 25.6 **EEM: 5.0**	**Promedio: 0.4** **EEM: 0.07**
3	9 10 11 12 13	33 24 20 26 27	0.5 0.4 0.4 0.4 0.4
		Promedio: 26.0 **EEM: 4.7**	**Promedio: 0.4** **EEM: 0.04**

Tabla 13: Histología. El grado de lesión tubular renal (necrosis tubular, dilatación y el infiltrado intersticial celular) y la fibrosis (deposición de colágeno) se calificaron, de una manera ciega, usando un índice de puntuación que oscila de 1 a 4 (1 = mínimo, 2 = leve, 3 = moderado, 4 = grave).

Grupo de Tratamiento 1

Animal	Fibrosis	Lesión Tubular
1	1	1
2	1	1
3	1	1
	Promedio: 1.0	**Promedio: 1.0**

Grupo de Tratamiento 2

Animal	Fibrosis	Lesión Tubular
4	2	4
5	2	4
6	2	4
7	3	4
8	3	4
	Promedio: 2.4	**Promedio: 4.0**

Grupo de Tratamiento 3

Animal	Fibrosis	Lesión Tubular
9	2	3
10	2	3
11	2	3
12	2	3
13	2	3
	Promedio: 2.0	**Promedio: 3.0**

[0187] Aunque la invención anterior se ha descrito con algún detalle a modo de ilustración y ejemplo para una mayor claridad de comprensión, será fácilmente evidente para un experto en la técnica a la luz de las enseñanzas de este invento que ciertos cambios y modificaciones pueden ser realizadas a la misma sin apartarse del alcance de las reivindicaciones anexas.

Reivindicaciones

1. Una población de células aisladas o purificadas derivadas del riñón humano, dicha población de células capaces de auto-renovación y expansión en cultivo, en el que la población de células es positiva para la expresión de marcadores de superficie celular HLA I y CD44 y al menos una de Oct-4, Red-1, Pax-2, Cadherina-11, FoxD1, WT1, Eyal, HNF3B, CXC-R4, Sox-17, EpoR, BMP2, BMP7, o GDF5 y negativas para la expresión de marcadores de superficie celular CD133, E-cadherina, y Wnt-4 y al menos una de Sox2, FGF4, hTert, SIX2 o GATA-4.

2. La población de células de la reclamación 1 que es positiva para al menos uno de los marcadores de la suerficie celular CD24, CD29, CD49c, CD73, CD 166, o SSEA-4, y negativa para al menos uno de los marcadores de la superficie celular HLA II, CD31, CD34, CD45, CD56, CD80, CD86, CD104, CD105, CD117, CD138, o CD141.

3. La población de células de la reclamación 1, en el que las células se derivan de la corteza renal, médula renal o región renal subcapsular.

4. La población de células de la reivindicación 1, aquí la población de células secreta al menos uno de los factores tróficos FGF2, HGF, TGFα, TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 o VEGF y no secreta al menos uno de los factores tróficos PDGF-bb o IL12p70.

5. Un método para la preparación de una población aislada de células de riñón humano derivada que comprende,incubar el tejido obtenido a partir de una región subcapsular, una corteza o una médula de un riñón humano en la presencia de uno o más metaloproteasas, proteasa neutra, o enzima mucolítica para disociar al menos una parte del tejido en células individuales en placas de las células en un sustrato, identificando dentro de dichas células un subconjunto de las células que es positivo para la expresión de marcadores de superficie celular HLA I y CD44 y al menos uno de Oct-4, Rex-1, Pax-2, Cadherina-11, FoxD1, WT1, Eyal, HNF3B, CXC-R4, Sox-17, EpoR, BMP2, BMP7, o GDF5 y negativo para la expresión de marcadores de superficie celular CD133, E-cadherina, and Wnt-4 y al menos uno de Sox2, FGF4, hTert, SIX2 o GATA-4, y aislar ese subconjunto de células para proporcionar dicha población celular derivada de riñón humano.

6. Un método para la detección de un candidato a medicamento para el tratamiento de un trastorno que involucra células renales en un sujeto humano que comprende las etapas de:

(a) proporcionar una población celular derivada de riñón humano aislada o purificada obtenida de una región subcapsular, una corteza o una médula de un riñón humano, dicha población capaz de auto-renovación y expansión en cultivo, en el que la población de células es positiva para la expresión de marcadores la superficie celular HLA I y CD44 y al menos una de Oct-4, Red-1, Pax-2, Cadherina-11, FoxD1, WT1, Eyal, HNF3B, CXC-R4, Sox-17, EpoR, BMP2, BMP7, o GDF5 y negativos para la expresión de marcadores de superficie celular CD133, E-cadherina, y Wnt-4 y al menos una de Sox2, FGF4, hTert, SIX2 o GATA-4;
(b) cultivo de la población de células de riñón humano derivada de las condiciones de proliferación para obtener una composición celular que comprende células con potencial o aumento potencial de auto-renovación y expansión in vitro;
(c) exponer las células cultivadas obtenidas a partir de la etapa (a) o (b) al candidato a medicamento; y
(d) detectar la presencia o ausencia de un efecto del candidato a medicación sobre la supervivencia de las células o una característica morfológica, funcional, o fisiológica y / o propiedad biológica molecular de dichas células, en donde una alteración en la supervivencia celular, una característica fisiológica, morfológica o funcional de las células, y / o una propiedad biológica molecular de las células indica una actividad del candidato a medicación para tratar el trastorno de células renales.

7. Un método para ensayar la toxicidad de una sustancia de prueba para afectar la función celular de riñón que comprende las etapas de:

(a) proporcionar una población celular derivada de riñón humano aislada o purificada obtenida de una región subcapsular, una corteza o una médula de un riñón humano, en el que la población de células es capaz de auto-renovación y expansión en cultivo, es positiva para la expresión de marcadores de superficie celular HLA I y CD44 y al menos uno de Oct-4, Rex-1, Pax-2, cadherina-11, FoxD1, WT1, Eyal, HNF3B, CXC-R4, SOX-17, EpoR, BMP2, BMP7, o GDF5 y negativos para la expresión de marcadores de superficie celular CD133, e-cadherina, y Wnt-4 y al menos uno de Sox2, FGF4, hTERT, SIX2 o GATA-4;
(b) la exposición de la población de células a la sustancia de prueba; y
(c) detectar la presencia o ausencia de efecto de la sustancia de ensayo sobre la supervivencia de las células en la población o en una característica morfológica, funcional, o fisiológica y / o propiedad biológica molecular de las células en la población, por lo que el efecto de alterar la supervivencia celular, una característica morfológica, funcional, o fisiológica de las células y / o una propiedad biológica molecular de las células en la población indica la toxicidad de la sustancia de prueba a la función de las células del riñón.

8. Las células genéticamente alteradas para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad en un

sujeto humano con terapia de genes están caracterizadas porque se preparan a través de:

proporcionar una población aislada o purificada de células derivadas de riñón humano obtenida de una región subcapsular, una corteza o una médula de un riñón humano, en el que la población de células es capaz de auto-renovación y expansión en cultivo, positivo para la expresión de marcadores de superficie celular HLA I y CD44 y al menos uno de Oct-4, Rex-1, Pax-2, cadherina-11, FoxD1, WT1, Eyal, HNF3B, CXC-R4, Medias-17, EpoR, BMP2, BMP7, o GDF5 y negativo para la expresión de marcadores de superficie celular CD133, e-cadherina, y Wnt-4 y al menos uno de Sox2, FGF4, hTERT, SIX2 o GATA-4 alterar genéticamente al menos una célula de la población celular derivada de riñón humano aislada o purificada para producir un producto génico terapéutico, expandiendo las células genéticamente modificadas en cultivo.

9. La población de células de la reclamación 1 que es negativa para al menos uno de los marcadores de la superficie celular HLA II, CD80, o CD86.

10. Células alteradas genéticamente para uso en un método de tratamiento de una enfermedad de acuerdo con la reclamación 8, en el que la población de células es negativa para al menos uno de los marcadores de la superficie celular HLA II, CD80, o CD86.

11. La población de células no-inmunogénicas de la reclamación 9 para su uso en el tratamiento de un sujeto humano mediante trasplante alogénico.

12. Células genéticamente alteradas para uso en un método para tratar una enfermedad de acuerdo con la reclamación 10 mediante trasplante alogénico.

13. **13.** La población de células de acuerdo con cualquiera de las reclamaciones 1-4 para uso en la reducción o eliminación de la enfermedad del tejido isquémico del riñón o para la sustitución de los tejidos renales, órganos, componentes o estructuras que estén dañados debido a un trauma, la edad, lesión metabólica o tóxica, enfermedad o pérdida idiopática en un sujeto humano.

14. Las células alteradas genéticamente para su uso en un tratamiento de una enfermedad de acuerdo con la reclamación 10 o la reclamación 12, en el que el tratamiento consiste en la reducción o eliminación de la enfermedad del tejido isquémico del riñón o para la sustitución de los tejidos renales, órganos, componentes o estructuras que son dañadas debido a un traumatismo, edad, lesión metabólica o tóxica, enfermedad o la pérdida idiopática en un sujeto humano.

15. La población de células de acuerdo con cualquiera de las reclamaciones 1-4 para uso de acuerdo con la reclamación 13, en el que un efecto seleccionado de: (a) formación de los vasos sanguíneos que suministran sangre al tejido isquémico; (b) flujo de sangre al tejido isquémico; (c) suministro de oxígeno al tejido isquémico, y (d) combinaciones de los mismos se inducen.

16. Las células alteradas genéticamente para su uso acuerdo con la reclamación 14, en el que un efecto seleccionado de: (a) formación de los vasos sanguíneos que suministran sangre al tejido isquémico; (b) flujo de sangre al tejido isquémico; (c) suministro de oxígeno al tejido isquémico, y (d) combinaciones de los mismos se inducen.

17. La población de células de acuerdo con cualquiera de las reclamaciones 1-4 para su uso acuerdo con la reclamación 13, en el que el tratamiento consiste en la inducción de la formación de tejido de la región subcapsular renal, tejido de la corteza renal, o tejido de médula renal.

18. Las células alteradas genéticamente para su uso acuerdo con la reclamación 14, en el que se induce la formación de tejido de la región subcapsular renal, tejido de corteza renal, o tejido de médula renal.

19. El método de la reclamación 5, que comprende además el aislamiento de una célula única derivada de riñón humano por dilución limitante y la ampliación de la célula en cultivo celular.

20. Las células alteradas genéticamente para su uso de acuerdo con la reclamación 8, en la que la enfermedad se selecciona entre enfermedad renal, lesión renal, isquemia renal, o un defecto genético en el sujeto humano.

21. Las células genéticamente alteradas para su uso en el tratamiento de una enfermedad de acuerdo con la reclamación 8, caracterizada porque las células se trasplantan en el útero para producir células de riñón humano en el sujeto humano prenatal o postnatal después del trasplante, en el que las células producen productos terapéuticos para reducir o eliminar la enfermedad en el sujeto humano.

22. El método de la reclamación 6 o 7, en el que la característica morfológica, funcional, o fisiológica de la célula aumenta la formación de túbulos renales o de expresión de BMP o receptor de BMP.

23. El método de la reclamación 6 o 7, en el que la característica morfológica, funcional, o fisiológica de las células aumenta la secreción de al menos uno o más de los factores tróficos FGF2, HGF, TGFa, TIMP-1, TIMP-2, VEGF, o MMP -2.

24. El método de la reclamación 6, en el que el trastorno es la enfermedad renal isquémica o daño a los tejidos del riñón, órganos, componentes o estructuras debido a un trauma, edad, lesión metabólica o tóxica, enfermedad o pérdida idiopática en un sujeto humano.

25. El método de la reclamación 7, en el que la mayor toxicidad de la sustancia de prueba se mide como disminución de la formación de túbulos renales o disminución de la expresión de la BMP o receptor de BMP.