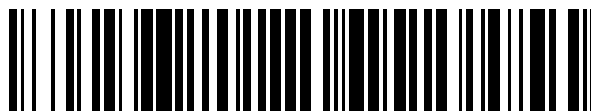


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 590**

51 Int. Cl.:

A61K 35/22 (2015.01)

A61P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2010 E 10795525 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2512493**

54 Título: **Método de reparación y regeneración renal y el tratamiento de nefropatía diabética**

30 Prioridad:

15.12.2009 US 286421 P

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

10.12.2015

73 Titular/es:

**DEPUY SYNTHES PRODUCTS, INC. (100.0%)
325 Paramount Drive
Raynham, MA 02767, US**

72 Inventor/es:

**COLTER, DAVID C. y
KAZANECKI, CHRISTIAN C.**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 553 590 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).

Método de reparación y regeneración renal y el tratamiento de nefropatía diabética

DESCRIPCIÓN

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

La divulgación se refiere a terapias basadas en células para el tratamiento de enfermedad renal crónica. En particular, la divulgación se refiere al uso de células derivadas de riñón humano (hKDC) para el tratamiento de nefropatía diabética.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La nefropatía diabética es una causa frecuente de enfermedad renal terminal, y su incidencia está aumentando en el mundo. Del treinta al cuarenta por ciento de los pacientes con diabetes mellitus dependiente de insulina padecen nefropatía diabética terminal, que se desarrolla 35 a 40 años después de la aparición de la diabetes. Una vez la nefropatía diabética se vuelve sintomática, no hay terapia curativa, y la mayoría de los pacientes con el tiempo progresan a enfermedad renal terminal.

15

La enfermedad renal es una afección médica grave insatisfecha con una carga de costes anual en los EE.UU. que supera los 27 billones de dólares. Actualmente, más de 40 millones de estadounidenses están en riesgo de o tienen enfermedad renal, y la incidencia está aumentando a una tasa alarmante del 6 % por año. Por tanto, por el año 2020, una estimación de una de cada cuatro personas tendrán enfermedad renal terminal (ERT), requiriendo tanto diálisis como trasplante de riñón. Para aliviar estos retos económicos y médicos, son necesarias tecnologías transformacionales para el tratamiento de la enfermedad renal crónica (ERC).

20

25

La ERC es una pérdida gradual y progresiva de la función del riñón. Generalmente es irreversible y por último lugar conduce a enfermedad renal terminal. En los Estados Unidos, la ERC está siendo cada vez más común y está asociada a malos desenlaces de salud y altos costes médicos. La Fundación Nacional del Riñón estima que 20 millones de estadounidenses tienen ERC, y al menos 20 millones adicionales de personas están en riesgo de desarrollar ERC. Si se deja sin tratar, la ERC puede conducir a morbilidad y mortalidad significativa de anemia, desequilibrios de electrolitos, enfermedad ósea, enfermedad cardiovascular e insuficiencia renal.

30

La enfermedad renal progresiva crónica resulta de una combinación de la lesión de enfermedad inicial (por ejemplo, hipertensión), seguido de una respuesta renal inadaptada a esa lesión. Una respuesta tal incluye la producción de citocinas pro-inflamatorias y pro-fibróticas y factores de crecimiento. Por tanto, una estrategia para ralentizar la progresión de ERC es mejorar la respuesta inflamatoria y fibrótica, además de la reparación o inversión del daño renal existente. Se ha mostrado que la administración de factores de crecimiento puede ralentizar la progresión de ERC. Por ejemplo, la proteína-7 morfogénica ósea (BMP-7) previno la atrofia tubular, inflamación intersticial y fibrosis en ratas con obstrucción ureteral unilateral. Similarmente, la administración de BMP-7 redujo la fibrosis tubulointersticial y glomerulosclerosis en un modelo de ratón de nefritis lúpica. Además, se ha mostrado que el factor de crecimiento de hepatocitos tiene una potente eficacia antiinflamatoria y antifibrótica en una amplia variedad de modelos animales de lesión renal. Otros factores que han mostrado promesa terapéutica incluyen factor de crecimiento-β1 transformante, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de tejido conjuntivo, factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2), interleucinas, factor de necrosis tumoral y proteína-1 quimiotáctica de monocitos. Se ha mostrado que las células mesenquimatosas multipotentes del estroma (MSC) contribuyen a la regeneración de tejido en hueso y cartílago lesionados, además de en el corazón infartado, cerebro y riñón. Ezquer et al. (Biology of Blood and Marrow Transplantation 14:631-640, 2008) han sugerido que las MSC también podrían contribuir a la regeneración de páncreas y riñón en individuos diabéticos. Ezquer et al. (Biol Blood Marrow Transplant 15:1354-1365, 2009) también mostraron que las MSC pueden prevenir insuficiencia renal en ratones diabéticos. Además, Semedo et al. (Mesenchymal Stem Cells Attenuate Renal Fibrosis Through Immune Modulation and Remodeling Properties in a Rat Remnant Kidney Model. Stem Cells Empress, Sept 2009) probaron la hipótesis de que células del estroma multipotentes de médula ósea humana pueden ralentizar la progresión de fibrosis renal. Estos estudios demuestran todos que la administración de células es un enfoque terapéutico prometedor para el tratamiento preventivo de ERC.

35

40

45

50

55

A pesar de existir opciones de tratamiento médico, las tasas de mortalidad siguen siendo muy altas y la incidencia de enfermedad renal está en aumento. Por tanto, existe la necesidad de una terapia mejorada posiblemente curativa. Hoy en día, ninguna intervención terapéutica intenta detener o incluso invertir la progresión de la nefropatía diabética.

60

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención se refiere a una población de células derivadas de riñón humano para su uso en un método para tratar nefropatía diabética que comprende administrar una cantidad terapéutica de $0,18 \times 10^6$ a $1,00 \times 10^6$ de las células derivadas de riñón humano a un sujeto mamífero; en la que las células derivadas de riñón humano son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo; en la que las células derivadas de riñón humano son positivas para la

65

expresión del marcador de la superficie celular de HLA I y CD44, y para la expresión génica de Oct-4, Pax-2 y WT1; y en la que las células derivadas de riñón humano son negativas para la expresión del marcador de la superficie celular de CD 133, y la expresión génica de Wnt-4.

5 **BREVE DESCRIPCIÓN de LAS FIGURAS**

10 **Figura 1: Preparación de implante:** Se sembraron hKDC sobre sacabocados de GELFOAM (Pharmacia) y se cultivaron durante siete días en recipientes de bioreactor giratorios. Andamiaje vacío (A). Andamiaje sembrado con hKDC (B). Se obtuvieron imágenes usando un microscopio de disección a 7X aumentos (A) o 12,5x aumentos (B).

Figura 2: Tasa de eliminación de proteína: Se determinó la tasa de eliminación de proteína total para ratones normales, además de para animales tratados con GELFOAM y animales tratados con GELFOAM cargados con hKDC en el día 0 y día 14 después del trasplante. Las barras de error representan EEM. * = p = 0,05.

15 **Figura 3: Glucosa en sangre:** La leyenda muestra el número del grupo de tratamiento de animales descrito en la Tabla 8. Las barras de error representan la desviación estándar.

Figura 4: Tasa de eliminación de glucosa en orina: Se determinó la tasa de eliminación de glucosa en orina para ratones normales en comparación con animales tratados en el día 0 y día 28 después del trasplante. Las barras de error representan EEM. Los grupos de tratamiento se describen en la Tabla 7.

20 **Figura 5: Tasa de eliminación de proteína total:** Se determinó la tasa de eliminación de proteína total para ratones normales en comparación con animales tratados en el día 0 y día 28 después del trasplante. Las barras de error representan EEM. Los grupos de tratamiento se describen en la Tabla 7. * = p < 0,002.

25 **Figura 6: Tasa de supervivencia:** Se determinó la tasa de supervivencia en un modelo de ratón SCID normal y en comparación con el modelo de ratón SCID diabético con y sin tratamientos de células como se describe en la Tabla 11.

25 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

La invención se define en las reivindicaciones.

30 Diversos términos referentes a los métodos y otros aspectos de la invención se usan en toda la memoria descriptiva y reivindicaciones. A tales términos se les da su significado común en la materia, a menos que se indique lo contrario.

35 La divulgación se refiere a un método para tratar nefropatía diabética en un sujeto mamífero que comprende administrar al sujeto mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de células derivadas de riñón humano aisladas.

40 Las células derivadas de riñón humano aisladas se aíslan como se describe en la publicación de patente de EE.UU. Número 2008/0112939. Las células derivadas de riñón humano se aíslan de un riñón humano que es adecuado para el trasplante de órganos. Brevemente, se eliminan la sangre y los residuos del riñón lavando con cualquier medio adecuado o tampón tal como solución salina tamponada con fosfato. Las células derivadas de riñón humano se aíslan entonces del riñón troceando el riñón y a continuación seguido de digestión enzimática. Se usan combinaciones de colagenasa, dispasa e hialuronidasa para disociar las células del tejido de riñón humano. A continuación, las células aisladas se transfieren a recipientes de cultivo de tejido estériles que se recubren inicialmente con gelatina. Las células derivadas de riñón humano se cultivan en cualquier medio de cultivo capaz de mantener el crecimiento de las células tales como, pero no se limitan a, medio de crecimiento epitelial renal (REGM).

45 Las células derivadas de riñón humano se someten a pases a un recipiente de cultivo que contiene medio fresco del mismo tipo o un tipo diferente al usado inicialmente, en el que la población de células puede expandirse mitóticamente. Las células pueden usarse en cualquier punto entre el pase 0 y la senescencia. En una realización, las células se someten a pases entre aproximadamente 3 y aproximadamente 20 veces. En otra realización, las células se someten a pases entre aproximadamente 4 y aproximadamente 20 veces. En otra realización más, las células se someten a pases entre aproximadamente 10 y aproximadamente 11 veces. Las células derivadas de riñón humano se caracterizan por características fenotípicas, por ejemplo, morfología, potencial de crecimiento, fenotipo de marcador superficial, expresión génica del desarrollo temprano, expresión génica del desarrollo renal y secreción de factor trófico. El fenotipo de marcador de superficie, de expresión génica y de secreción de factor trófico se retiene después de múltiples pases de las células derivadas de riñón humano en cultivo.

50 Una célula derivada de riñón humano aislada es capaz de auto-renovarse y expandirse en cultivo, en el que la célula es positiva para la expresión de 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 negativa para la expresión de al menos uno de Sox2, FGF4, hTert, Wnt-4, SIX2 o GATA-4. La célula es positiva para la expresión de al menos uno de Eyal, WT1, FoxD1, BMP7, BMP2, GDF5, EpoR o Rex-1, y negativa para la expresión de al menos uno de Sox2, FGF4, hTert o Wnt-4. La célula derivada de riñón humano también es positiva para al menos uno de los marcadores de la superficie celular HLA I, CD24, CD29, CD44, CD49c, CD73, CD166 o SSEA-4, y negativa para al menos uno de marcadores de la superficie celular HLA II, CD31, CD34, CD45, CD56, CD80, CD86, CD104, CD105, CD117, CD133, CD138, CD141 o E-cadherina. La célula es preferentemente no inmunogénica para trasplante alógeno en un sujeto mamífero. La célula

derivada de riñón humano puede secretar al menos uno de los factores tróficos FGF2, HGF, TGF α , TIMP-1, TIMP-2, MMP-2 o VEGF. Preferentemente, la célula no secreta al menos uno de los factores tróficos PDGF-bb o IL12p70.

Los presentes inventores definen una cantidad terapéuticamente eficaz de células derivadas de riñón humano para indicar una dosificación de células que detiene o invierte la progresión de la enfermedad renal crónica. La detención o inversión de la progresión de nefropatía diabética puede demostrarse por una reducción en la tasa de eliminación de proteína total en mamíferos con nefropatía diabética. Además, una cantidad terapéuticamente eficaz de células ralentizará el progreso de la lesión renal y retrasará la aparición de insuficiencia renal terminal. En una realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de células es aproximadamente 0,18e6 a aproximadamente 1,00e6. En un ejemplo, 0,18e6 hKDC, sembradas sobre un andamiaje de GELFOAM, ralentizó la progresión de nefropatía diabética en un modelo de diabetes transgénica. En otro ejemplo, 1,00e6 hKDC, administradas bajo la cápsula renal, causaron una reducción en la tasa de eliminación de proteína total en comparación con el tratamiento con vehículo en un modelo de diabetes STZ.

Las células se administran localmente por cualquier método adecuado para administrar terapias de células. Métodos adecuados para la administración local de células derivadas de riñón humano incluyen, pero no se limitan a, trasplante, implante, inyección, infusión y similares. En una realización, las células se administran al riñón. En otra realización, las células se administran a la cápsula renal de un riñón. En otra realización más, las células se administran a la región subcapsular del riñón.

En una realización, las células derivadas de riñón humano se administran al sujeto mamífero por inyección local o infusión. Las células se combinan con un vehículo adecuado para facilitar la inyección o infusión. Vehículos adecuados para inyección incluyen, pero no se limitan a agua, solución salina tamponada, disolución de tampón fosfato, solución salina equilibrada con Hank, solución salina tamponada con Tris, solución salina tamponada con HEPES y similares. Opcionalmente, las células podrían formularse con potenciadores de la viscosidad tales como alginato, ácido hialurónico, gel de colágeno, pegamento de fibrina, coágulo de fibrina, poli(N-isopropilacrilamida), agarosa, quitina, quitosano, celulosa, polisacáridos, poli(oxalquileno), un copolímero de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno), poli(alcohol vinílico), poli(acrilato), coágulo de plasma rico en plaquetas (PRP), coágulo de plasma pobre en plaquetas (PPP), Matrigel, coágulo de sangre, adhesivos de gelatina-resorcinol-formalina, adhesivos basados en mejillones, adhesivos basados en dihidroxifenilalanina (DOPA), transglutaminasa, adhesivos basados en poli(aminoácido), adhesivos basados en celulosa, adhesivos basados en polisacáridos, adhesivos basados en acrilato sintético, ésteres de ácidos grasos de glicerol líquidos y semi-sólidos y ácido succínico (MGSA), copolímeros de MGSA/polietilenglicol (MGSA/PEG), polivinilpirrolidona (PVP), copolímeros de PVP, gelatina, albúmina, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, laminina, elastina, proteoglicanos, y combinaciones de los mismos.

Por ejemplo, las células se combinan con un vehículo de solución salina tal como solución salina tamponada con fosfato y a continuación las células se inyectan directamente bajo la cápsula renal de uno o ambos riñones. La dosificación de células eficaces en roedores es de aproximadamente $0,18 \times 10^6$ a aproximadamente $1,00 \times 10^6$ células por riñón por roedor. Un experto en la materia sería capaz de extrapolar la dosificación eficaz de células adecuadas para tratar un ser humano con enfermedad renal crónica.

En otra realización, las células se administran por implantación. Las células pueden implantarse con o sin un andamiaje adecuado. Andamiajes adecuados incluyen, pero no se limitan a, textiles, tales como ligamentos, tejidos de punto, galones, mallas y no tejidos; películas perforadas; esponjas y espumas; y perlas, tales como perlas sólidas o porosas, micropartículas, nanopartículas y similares. En una realización, el andamiaje es una espuma.

Los polímeros usados para preparar los andamiajes descritos en el presente documento son polímeros naturales, polímeros sintéticos, y combinaciones de los mismos. Los polímeros son biodegradables y biocompatibles. Los polímeros biodegradables se degradan fácilmente en pequeños segmentos cuando se exponen a tejido del cuerpo húmedo. Los segmentos son entonces tanto absorbidos por el cuerpo, como pasan por el cuerpo. Más particularmente, los segmentos biodegradados no provocan la reacción de cuerpos extraños crónica permanente, debido a que son absorbidos por el cuerpo o pasan del cuerpo, de forma que el cuerpo no retiene traza permanente o residual del segmento.

Ejemplos de polímeros biodegradables biocompatibles sintéticos adecuados que podrían usarse incluyen polímeros seleccionados del grupo que consiste en poliésteres alifáticos, poli(aminoácidos), copoli(éter-ésteres), poli(oxalatos de alquileno), poliamidas, poli(iminocarbonatos), poliortoésteres, polioxaésteres, poliamidoésteres, polioxaésteres que contienen grupos amina, poli(anhídridos), polifosfacenos, biomoléculas y mezclas de los mismos. Con el fin de la presente invención, los poliésteres alifáticos incluyen, pero no se limitan a, homopolímeros y copolímeros de lactida (que incluyen ácido láctico, d-, l- y meso lactida), glicolida (que incluyen ácido glicólico), épsilon-caprolactona, p-dioxanona (1,4-dioxan-2-ona), carbonato de trimetileno (1,3-dioxan-2-ona), derivados de alquilo de carbonato de trimetileno, delta-valerolactona, beta-butirolactona, gamma-butirolactona, épsilon-decalactona, hidroxibutirato (unidades de repetición), hidroxivalerato (unidades de repetición), 1,4-dioxepan-2-ona (que incluyen su dímero 1,5,8,12-tetraoxaciclotetradecano-7,14-diona), 1,5-dioxepan-2-ona, 6,6-dimetil-1,4-dioxan-2-ona, 2,5-dicetomorfolina, pivalolactona, alfa,alfa-dietilpropiolactona, carbonato de etileno, oxalato de etileno, 3-metil-1,4-dioxano-2,5-diona,

3,3-dietil-1,4-dioxan-2,5-diona, 6,8-dioxabicycloctan-7-ona y mezclas de polímeros de los mismos.

En una realización, el andamiaje puede prepararse a partir de poliésteres alifáticos que incluyen, pero no se limitan a, homopolímeros y copolímeros de lactida (que incluyen ácido láctico, D-,L- y meso-lactida), glicolida (que incluyen ácido glicólico), épsilon-caprolactona, p-dioxanona (1,4-dioxan-2-ona), carbonato de trimetileno (1,3-dioxan-2-ona), derivados de alquilo de carbonato de trimetileno, delta-valerolactona, beta-butirolactona, gamma-butirolactona, épsilon-decalactona, hidroxibutirato (unidades de repetición), hidroxivalerato (unidades de repetición), 1,4-dioxepan-2-ona (que incluyen su dímero 1,5,8,12-tetraoxaciclotetradecano-7,14-diona), 1,5-dioxepan-2-ona, 6,6-dimetil-1,4-dioxan-2-ona y mezclas de polímeros de los mismos.

En otra realización, los andamiajes pueden prepararse a partir de polímeros naturales que incluyen, pero no se limitan a, colágeno, gelatina, quitina, ácido hialurónico, elastina, fibronectina y similares también son adecuados para los fines de la presente invención. En otra realización más, el andamiaje se prepara a partir de gelatina.

Las células pueden cultivarse libremente en cultivo, sacarse del cultivo y sembrarse sobre un andamiaje. Por ejemplo, se siembra un andamiaje de espuma basada en colágeno de un centímetro de largo por cuatro milímetros de ancho con células derivadas de riñón humano en un bioreactor giratorio o sistema equivalente. El andamiaje sembrado con células se cultiva entonces durante siete días y a continuación se implanta quirúrgicamente bajo la cápsula renal del sujeto mamífero.

Opcionalmente, las células derivadas de riñón humano pueden administrarse en secuencia con o co-administrarse con uno o más agentes biológicamente activos, tales como agentes antitrombogénicos, agentes antiapoptóticos, agentes antiinflamatorios, inmunosupresores (por ejemplo, ciclosporina, rapamicina), antioxidantes, u otros agentes generalmente usados en la materia para tratar daño renal. Tales agentes incluyen, pero no se limitan a, eprodisato y triptolida.

Opcionalmente, las células derivadas de riñón humano pueden administrarse en secuencia con o co-administrarse con las otras células o agentes. Por ejemplo, agentes biológicos generados a partir de las células, tales como lisados, fracciones de células solubles, fracciones de células enriquecidas en membrana, medios de cultivo celular (por ejemplo, medios acondicionados), o matriz extracelular de células derivadas de riñón humano, también pueden administrarse a pacientes según convenga, que incluyen co-administrarse con las propias células derivadas de riñón humano, y células o agentes adicionales. Pueden co-administrarse células terapéuticas con lisados celulares, o con otras células alogénicas, singénicas o autólogas. En algunos aspectos, es útil volver a crear en cultivo el microentorno celular encontrado *in vivo*, de forma que pueda variar el grado al que las células se cultivan antes de la implantación *in vivo* o se usan *in vitro*. Las células pueden sembrarse sobre el andamiaje antes o después de formar la forma deseada para implantación, por ejemplo, cuerdas, tubos, filamentos, mallas y similares. Tras la siembra de las células sobre el andamiaje, el andamiaje se incuba preferentemente en un medio de crecimiento apropiado. Durante el periodo de incubación, las células crecerán y envolverán el andamiaje y pueden, por ejemplo, extender puentes, o parcialmente extender cualquier espacio intersticial en él. Es preferible, pero no se requiere, que las células crezcan a un grado apropiado que refleje la densidad celular *in vivo* del tejido de riñón que se repara o regenera. En otras realizaciones, la presencia de las células, incluso en bajos números sobre el andamiaje, estimula el crecimiento infiltrante de células sanas endógenas para facilitar la curación, por ejemplo, del tejido dañado o lesionado.

Opcionalmente, las superficies externas del andamiaje pueden modificarse para mejorar la unión o crecimiento de células y diferenciación de tejido, tal como recubriendo por plasma el andamiaje o adición de una o más proteínas (por ejemplo, colágenos, fibras elásticas, fibras reticulares), glicoproteínas, glicosaminoglicanos (por ejemplo, sulfato de heparina, 4-sulfato de condroitina, 6-sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de queratina), una matriz celular, y/u otros materiales tales como, pero no se limitan a, gelatina, alginatos, agar, agarosa y gomas de planta, entre otros.

El andamiaje puede estar comprendido de o tratarse con materiales que lo convierten en no trombogénico. Estos tratamientos y materiales también pueden promover y sostener el crecimiento endotelial, migración y deposición de matriz extracelular. Ejemplos de estos materiales y tratamientos incluyen, pero no se limitan a, materiales naturales tales como proteínas de la membrana basal tales como laminina y colágeno de tipo IV, materiales sintéticos tales como ePTFE, y siliconas de poliuretano-urea segmentadas. Estos materiales pueden tratarse adicionalmente para convertir el andamiaje en no trombogénico. Tales tratamientos incluyen agentes antitrombóticos tales como heparina, y tratamientos que alteran la carga superficial del material tal como recubrimiento con plasma.

Los métodos descritos en el presente documento tienen utilidad para tratar enfermedad renal crónica, que incluye nefropatía diabética, que produce morbilidad o esperanza de vida reducida. El tratamiento con células derivadas de riñón humano ralentiza la progresión de la nefropatía diabética y, por tanto, retrasará la aparición de enfermedad renal terminal.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir la invención en mayor detalle. Pretenden ilustrar, no limitar, la invención.

EJEMPLO DE REFERENCIA 1

Se evaluó la eficacia renoprotectora de un andamiaje de espuma de colágeno cargado con hKDC localmente administrado en un modelo transgénico de nefropatía diabética. El andamiaje de espuma de colágeno se vende bajo el nombre comercial GELFOAM (Farmacia y Upjohn Co., Kalamazoo, MI).

Modelo animal

Se obtuvieron ratones C57BL/6-Ins2^{Akita} (Akita) macho de dieciocho semanas de edad y de control C57BL/6 de The Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Ins2^{Akita} es un modelo de diabetes de tipo 1. La mutación espontánea de Akita es una mutación dominante autosómica en el gen de insulina II (Ins2). Esta mutación de aminoácido produce una sustitución de aminoácidos (cisteína 96 a tirosina), que se corresponde con la séptima posición de aminoácido de la cadena A de insulina II. Los ratones se mantuvieron en un ciclo de 12 h de luz/oscuridad y se alimentaron con pienso para ratones estándar.

Preparación de células

Se obtuvo un riñón humano sano del Intercambio de Investigación Nacional de la Enfermedad (NDRI, Philadelphia, PA). Se diseccionó tejido de la región de la corteza externa del riñón. A continuación, los tejidos se disociaron mecánicamente en placas de cultivo de tejido. El tejido se transfirió entonces a un tubo cónico de 50 mililitros. El tejido se digirió entonces con una mezcla de enzimas que contenía 0,25 unidades de actividad de PZ/ml de colagenasa (NB6, N0002779; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemania), 2,5 unidades/ml de dispasa (Dispase II 165 859, Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, IN), 1 unidad/ml de hialuronidasa (Vitrase, ISTA Pharmaceuticals, Irvine, Ca). La mezcla de enzimas se combinó con medio de crecimiento epitelial renal (REGM) (Lonza, Walkersville, MA). Los tubos cónicos que contenían el tejido, medio y enzimas de digestión se incubaron a 37 °C en un agitador orbital a 225 rpm durante 1-2 horas.

El material digerido se filtró a través de un filtro de células BD FALCON de nailon de 40 micrómetros (BD Biosciences, San Jose, CA). El filtrado se resuspendió en REGM (volumen total 50 mililitros) y se centrifugó a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron en 50 mililitros de REGM. Este proceso se repitió dos veces.

Después de la centrifugación final, el sobrenadante se aspiró y el sedimento de células se resuspendió en 10 mililitros de REGM. Entonces, las células se sembraron a una densidad de siembra de 10.000 células/cm² sobre matraces de cultivo de tejido recubiertos con gelatina y se cultivaron a 37 °C bajo condiciones atmosféricas normales. Se criopreservaron células de pase siete y posteriormente se usaron en este estudio.

Tabla 1. Diseño experimental. Se usaron ratones diabéticos C57BL/6-Ins2^{Akita} (Akita) sin tratar como control de referencia. No se implantaron andamiajes (grupo 1), andamiaje de GELFOAM solo, sin células (grupo 2), andamiaje de GELFOAM sembrado con hKDC (grupo 3). Se recogió orina usando jaulas metabólicas durante una duración de doce horas en el día 6 y 27 después del trasplante.

Grupo de tratamiento	Descripción	Nº de animales	Acumulación de orina/ Necropsia (día)
1	Sham	2	6 y 27/27
2	Solo GELFOAM	3	6 y 27/27
3	GELFOAM + hKDC	5	6 y 27/27

Preparación del implante

Se cortó GELFOAM en trozos pequeños usando una biopsia de 2 mm y a continuación se dispusieron en 100 % de etanol durante aproximadamente 30 minutos. Entonces se lavaron sacabocados de GELFOAM dos veces con 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (Gibco). Se descongelaron hKDC a 37 °C y se resuspendieron a 4e⁶ hKDC por 10 ml de medio REGM. Cada suspensión de células se depositó entonces en un recipiente de bioreactor giratorio (Sythecon, Inc, Houston, TX) con ocho sacabocados de GELFOAM por bioreactor. A continuación, los implantes se cultivaron durante seis días con intercambio de medio cada 1-3 días. Se cultivaron implantes de control negativo (grupo 2) del mismo modo que los implantes cargados de células. El día antes del trasplante, la célula sembrada y los implantes de control negativo se transfirieron entonces a crioviales de 1,5 ml que contenían 1 ml de medio de crecimiento respectivo. Entonces, los implantes se transportaron a la instalación de prueba. Después de la llegada, los implantes se dispusieron en una estufa de incubación a 37 °C, hasta el momento del trasplante. Para confirmar la viabilidad y dosificación de células de los implantes, se evaluaron cuatro implantes por grupo de tratamiento, y dos GELFOAM solo, implantes de control negativo para la integridad morfológica por microscopía óptica. Además, se digirieron implantes con tripsina y se determinaron tanto el número de células como la viabilidad usando un instrumento de Guava (Guava technologies, Hayward CA).

Trasplante

5 En el momento del trasplante, se decantó el medio de crecimiento de los tubos que contenían los implantes y los implantes se lavaron dos veces en HBSS (solución salina equilibrada con Hank sin $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$) y se reconstituyeron en 1 ml de HBSS. Con el ratón bajo una ligera anestesia, el riñón izquierdo se expuso a través de una incisión del costado. Se realizó una capsulotomía en el polo del riñón inferior usando una aguja de 23 de calibre, y se implantaron suavemente tanto GELFOAM solo como GELFOAM cargado con células. Entonces se cauterizó la capsulotomía con un dispositivo de cauterio a baja temperatura desechable. El músculo se cerró con suturas y la piel se grapó. Se dejó que los ratones se recuperaran bajo una lámpara caliente y a continuación se devolvieron a su alojamiento normal (Surgicare, Dayville, CT).

Recogida y análisis de orina

15 Se pesaron los ratones y se determinó la glucosa en sangre. Todos los animales tuvieron glucosa en sangre de más de 600 mg/dl (One Touch Ultra II, Lifescan). Cada animal se puso en una jaula metabólica separada (Lab products Inc) durante 24 h. El sistema de jaula contiene hasta 8 ratones. Todos los animales tuvieron acceso ilimitado a alimento y agua. Después de 24 h, los animales se devolvieron a su alojamiento normal. La orina se centrifugó ligeramente para eliminar cualquier residuo, se recogió con una pipeta para determinar el volumen y a continuación se congeló. La orina se recogió en el día 6 y 27 después del trasplante. La orina se analizó entonces para concentraciones de creatinina y de proteína. La eliminación de creatinina se midió usando ADVIA 1650 System (Bayer Corporation, Tarrytown, NY). La eliminación de proteína total se midió usando un Bayer Clinitek Atlas Urine Chemistry Analyser (Bayer Corporation, Elkhart, IN).

Autopsia e histología

El día 27 después del trasplante y después de la recogida de orina, los animales se anestesiaron con ketamina y xilazina. Los ratones se abrieron y se expuso el riñón izquierdo. Una vez se identificó el andamiaje, el riñón se escindió y se cortó para tener el andamiaje orientado hacia arriba en el casete de histología. A continuación, los riñones se fijaron durante 4 horas en 4 % de paraformaldehído fresco. Después de fijar los riñones, se almacenaron en PBS a 4 °C hasta que se incorporaron. Los riñones se incorporaron en parafina y se hicieron secciones a 4-5 μm . Una sección de cada riñón se tiñó con H&E y una para Vimentin (1:100 durante la noche a 4 °C, clon V9, DAKO).

Resultados*Caracterización del implante*

La Figura 1 demuestra que implantes de GELFOAM cargados con hKDC están intactos con integridad arquitectónica robusta. Además, los implantes tienen una longitud y anchura coherente y uniforme. Los implantes cargados con células mostraron algún encogimiento en comparación con los implantes negativos de control.

Para determinar la dosificación y viabilidad de células de los implantes antes de la implantación, se digirieron 4 implantes con tripsina y las células recogidas se evaluaron usando un instrumento de Guava (Tabla 2). Los resultados mostraron que los implantes cargados con hKDC tienen un número promedio de células viables de 106,553 +/- 19,261 con una viabilidad promedio de 89% +/- 2%.

Química de la orina

50 En el día 6 y día 27 después del trasplante, se recogió orina durante doce horas de todos los animales y se analizó para tanto la eliminación de creatinina como de proteína. La Tabla 3 y la Figura 2 demuestran que tanto la eliminación de creatinina como de proteína disminuyeron durante la duración del estudio de veintisiete días. Sin embargo, no hubo diferencia estadística en la eliminación de creatinina o entre animales tratados con GELFOAM solo y con GELFOAM cargado de células.

Histología

En día 27 después del trasplante, todos los riñones izquierdos se evaluaron para la presencia del implante. No se identificaron implantes de GELFOAM en ninguno de los riñones.

Conclusión

65 Los datos demuestran que el trasplante local de células derivadas de riñón humano puede lograrse usando andamiaje de GELFOAM. GELFOAM puede sembrarse con hKDC usando un sistema de cultivo en bioreactor giratorio y el implante cargado con células resultante tiene una morfología robusta y uniforme. Además, la unión de células al andamiaje es coherente y la viabilidad celular es alta. Por tanto, GELFOAM sembrado con células es un concepto terapéutico posiblemente valioso para administrar células a un tejido u órgano lesionado.

A pesar de la construcción satisfactoria del implante de GELFOAM, su capacidad para mejorar la función renal en un modelo de roedor de nefropatía diabética no se demostró en este ejemplo. Además, parece que GELFOAM se degradó completamente después de veintisiete días bajo la cápsula renal. Esto podría explicar la ausencia resultante de eficacia renoprotectora. En futuros estudios, puede ser importante evaluar la función renal en momentos de tiempo más tempranos, ya que el efecto podría ser transitorio en este modelo animal. Además, hKDC de un pase más temprano podrían ser más eficaces. También puede ser importante evaluar otros parámetros de la función renal (es decir, tasa de eliminación de proteína total) de manera que la lesión renal pueda caracterizarse completamente. El mantenimiento de la integridad de GELFOAM podría ser un factor importante para mantener una alta dosis de células terapéuticas dentro del entorno del riñón lesionado y, por tanto, es necesario observar la integridad de GELFOAM y la persistencia de células humanas en momentos de tiempo más tempranos.

Tabla 2. Dosificación de implante y análisis de viabilidad. Los implantes se digirieron con tripsina y se evaluó el número de células y la viabilidad usando un instrumento de Guava.

Nº de implante	Células viables	Viabilidad (%)
Media	106,533	89
Std	19261	2

Tabla 3: Análisis de orina: Se recogió orina durante una duración de doce horas y a continuación se analizó para la eliminación de creatinina y de proteína. Véase la Tabla 1 para la descripción del grupo de tratamiento.

Día	Grupo	Media	Std	Media	Std
6	1	2.03	0.63	16.41	16.04
6	2	2.74	0.34	26.35	3.20
6	3	2.55	0.17	24.48	3.41
27	1	0.85	0.25	7.35	4.71
27	2	0.92	0.27	9.74	4.08
27	3	0.90	0.07	10.30	2.14

EJEMPLO 2

En este estudio se repitieron los métodos del Ejemplo 1, excepto que los presentes inventores aumentaron la dosificación de células sobre el implante de andamiaje de GELFOAM cargado con hKDC. Además, se evaluó la tasa de eliminación de proteína en orina durante el transcurso de catorce días, en el modelo de ratón transgénico Akita de nefropatía diabética.

Métodos

Modelo animal

Se obtuvieron ratones C57BL/6-Ins2^{Akita} macho de dieciocho semanas de edad y de control C57BL/6 de The Jackson Laboratories. Ins2^{Akita} es un modelo de diabetes de tipo 1. La mutación espontánea de Akita es una mutación dominante autosómica en el gen de insulina II (Ins2). Los ratones se mantuvieron en un ciclo de 12 h de luz/oscuridad y se alimentaron con pienso para ratones estándar.

Preparación de células

Se obtuvo un riñón humano sano del Intercambio de Investigación Nacional de la Enfermedad. Se diseccionó tejido de la región de la corteza externa de riñón. A continuación, los tejidos se disociaron mecánicamente en placas de cultivo de tejido hasta que se picaron a una pulpa fina. El tejido se transfirió entonces a un tubo cónico de 50 mililitros. El tejido se digirió entonces con una mezcla de enzimas que contenía 0,25 unidades de actividad de PZ/ml de colagenasa (NB6, N0002779; Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemania), 2,5 unidades/ml de dispasa (Dispase II 165 859, Roche Diagnostics Corporation, Indianápolis, IN), 1 unidad/ml de hialuronidasa (Vitraxe, ISTA Pharmaceuticals, Irvine, Ca). La mezcla de enzimas se combinó con REGM. Los tubos cónicos que contenían el tejido, medio y enzimas de digestión se incubaron a 37 °C en un agitador orbital a 225 rpm durante 1-2 horas.

El material digerido se filtró a través de un filtro de células BD FALCON de nailon de 40 micrómetros (BD Biosciences). El filtrado se resuspendió en REGM (volumen total 50 mililitros) y se centrifugó a 150 x g durante 5 minutos. El sobrenadante se aspiró y las células se resuspendieron en 50 mililitros de REGM. Este proceso se repitió

dos veces.

Después de la centrifugación final, el sobrenadante se aspiró y el sedimento de células se resuspendió en 10 mililitros de REGM. Entonces, las células se sembraron a una densidad de siembra de 10.000 células/cm² sobre matraces de cultivo de tejido recubiertos con gelatina y se cultivaron a 37 °C bajo condiciones atmosféricas normales. Se criopreservaron células del pase tres y posteriormente se usaron en este estudio. El diseño experimental se describe en la Tabla 1.

Tabla 4. Diseño experimental. Ratones C57BL/6 normales sin tratar (grupo 1). Se trataron ratones diabéticos C57BL/6-*Ins2^{Akita}* con GELFOAM solo, sin células (grupo 2). GELFOAM sembrado con hKDC (grupo 3). Se recogió orina usando jaulas metabólicas durante una duración de doce horas en el día 0 y día 14 después del trasplante.

Grupo de tratamiento	Animal Nº	Descripción	Nº de animales	Acumulación de orina/ Necropsia (día)
1	21-24	Ratones normales C57/BL6	4	0 y 14/14
2	13-20	Solo GELFOAM	8	0 y 14/14
3	1-12	GELFOAM + hKDC	12	0 y 14/14

Preparación del implante

Se cortó GELFOAM en trozos pequeños usando una biopsia de 4 mm y a continuación se dispusieron en 100 % de etanol durante aproximadamente 30 minutos. Entonces se lavaron sacabocados de GELFOAM dos veces con 1 ml de solución salina tamponada con fosfato (Gibco). Se descongelaron hKDC (pase 3) a 37 °C y se resuspendieron a 4,9e⁶ hKDC por 10 ml de REGM. La suspensión de células se depositó entonces en un recipiente de bioreactor giratorio (Sythecon Inc, Houston, TX) con ocho sacabocados de GELFOAM por bioreactor. Los implantes se cultivaron a 37 °C durante la noche, con rotación a 20 rpm, y a continuación se intercambió el medio. A continuación, los implantes se cultivaron durante seis días adicionales. Los implantes de control negativo (grupo 2) se cultivaron del mismo modo que los implantes cargados de células. El día antes del trasplante, la célula sembrada y los implantes de control negativo se transfirieron entonces a crioviales de 1,5 ml que contenían 1 ml de REGM. Entonces, los implantes se transportaron al sitio del estudio por servicio de mensajería del mismo día. Después de la llegada, los implantes se dispusieron en una estufa de incubación a 37 °C, hasta el momento del trasplante. Para confirmar la viabilidad y dosificación de células de los implantes, se evaluaron cuatro implantes para integridad morfológica por microscopía óptica. Además, se digirieron implantes con tripsina y se determinaron tanto el número de células como la viabilidad usando un instrumento de Guava (Guava technologies) (Tabla 5).

Trasplante

En el momento del trasplante, se decantó el medio de crecimiento de los tubos que contenían los implantes y los implantes se lavaron dos veces en HBSS y se reconstituyeron en 1 ml de HBSS. Con el ratón bajo una ligera anestesia, el riñón izquierdo se expuso a través de una incisión del costado. Se realizó una capsulotomía en el polo del riñón inferior usando una aguja de 23 de calibre, y se implantaron suavemente tanto GELFOAM solo o GELFOAM cargado con células. Entonces se cauterizó la capsulotomía con un dispositivo de cauterio a baja temperatura desechable. El músculo se cerró con suturas y la piel se grapó. Se dejó que los ratones se recuperaran bajo una lámpara caliente y a continuación se devolvieron a su alojamiento normal (Surgicare).

Recogida y análisis de orina

Se pesaron los ratones y se determinó la glucosa en sangre. Todos los animales tuvieron glucosa en sangre de más de 600 mg/dl (One Touch Ultra II, Lifescan). Cada animal se puso en una jaula metabólica separada durante veinticuatro horas. El sistema de jaula contiene hasta 8 ratones. Todos los animales tuvieron acceso ilimitado a alimento y agua. Después de doce horas, los animales se devolvieron a su alojamiento normal. La orina se centrifugó ligeramente para eliminar cualquier residuo, se recogió con una pipeta para determinar el volumen y a continuación se congeló. La orina se recogió en el día 0 y 14 después del trasplante y se analizó.

Resultados

Caracterización del implante

Para determinar la dosificación y viabilidad de células de los implantes, se digirieron 4 implantes con tripsina y las células recogidas se evaluaron usando un instrumento de Guava (Tabla 5). Los resultados mostraron que los implantes cargados con hKDC tienen un número promedio de células viables de 176,850 +/- 65,578 con una viabilidad del 96 % +/- 2.

Química de la orina

En el día 0 y día 14 después del trasplante, se recogió orina durante doce horas de todos los animales y se analizó. La Tabla 6 demuestra que el tratamiento con hKDC tuvo poco efecto sobre la eliminación de creatinina, creatinina en orina total, glucosa en orina total, eliminación de glucosa en orina y concentración de proteína en orina total. Sin embargo, el tratamiento con hKDC tuvo un efecto sobre la tasa de eliminación de proteína en orina. La Figura 2 demuestra que en el día 0, la tasa de eliminación de proteína fue equivalente entre animales tratados con hKDC y de control. Sin embargo, en el día catorce, la tasa de eliminación de proteína fue significativamente menor (37 %) en el grupo de tratamiento con hKDC en comparación con animales tratados de control. Tanto los animales de control como los animales tratados con hKDC mostraron una elevada tasa de eliminación de proteína en comparación con animales no diabéticos normales.

Conclusión

En el presente estudio, los presentes inventores redujeron la duración del estudio de 27 días a 14 días, además de aumentar la dosificación de células para mejorar los métodos descritos en el Ejemplo 1. Los presentes inventores mostraron que los implantes cargados con hKDC que tenían una dosificación de células de aproximadamente 176.000 hKDC por implante pueden reducir la eliminación de proteína total aproximadamente el 37 % después de 14 días después de la implantación. Además, se utilizaron hKDC de un pase anterior. En el Ejemplo 1, se probaron hKDC del pase 7 mientras que los presentes inventores usaron células del pase 3 aquí en el Ejemplo 2. Estos datos sugieren que las hKDC tienen un beneficio terapéutico y reducen el grado de lesión renal en el animal diabético. Futuros estudios deben centrarse en los efectos de hKDC dentro de otro modelo de nefropatía diabética.

Tabla 5: Dosificación de implante y análisis de viabilidad. Los implantes se digirieron con tripsina y se evaluó el número de células y la viabilidad usando un instrumento de Guava.

Nº de implante	Células viables	Viabilidad (%)
Media	176850	96
Std	65578	2

Tabla 6: Química de la orina. Se obtuvieron muestras de orina de todos los animales y se realizó análisis químico de la orina. Se refiere a la Tabla 4 para la descripción del grupo de tratamiento.

Número de grupo de tratamiento	Animal Número	Implante Número	Día	Volumen de orina		UCREAT (mg/hr)	UCREAT (mg/dL)	UGLU (mg/dL)	UGLU_CR (mg/mg)	UGLU_Excr (mg/hr)	UPROT (mg/dL)	UPROT_CR (mg/mg)	UPROT_Excr (mg/hr)
				(mL)	24h								
3	1	1	0	23.3	8627	1.89	8.11	8627	1063.75	2010.09	94.5	11.65	22.02
3	2	2	0	219.3	10046	19.23	8.77	10046	1145.50	22030.88	93.3	10.64	204.61
3	3	3	0	9.4	8074	0.83	8.84	8074	913.35	758.96	71.9	8.13	6.76
3	4	4	0	5.2	8369	0.56	10.68	8369	783.61	435.19	97.5	9.13	5.07
3	5	8	0	12.0	7013	0.75	6.25	7013	1122.08	841.56	41.2	6.59	4.94
3	6	7	0	19.0	9760	1.61	8.48	9760	1150.94	1854.40	94.2	11.11	17.90
3	7	9	0	16.3	12702	2.05	12.58	12702	1009.70	2070.43	112.6	8.95	18.35
3	8	10	0	15.8	12361	2.07	13.09	12361	944.31	1953.04	115.9	8.85	18.31
2	9	17	0	16.2	12549	1.90	11.73	12549	1069.82	2032.94	102.4	8.73	16.59
2	10	18	0	22.1	9846	2.11	9.55	9846	1030.99	2175.97	101.6	10.64	22.45
2	11	23	0	25.0	9747	1.91	7.62	9747	1279.13	2436.75	86.4	11.34	21.60
2	12	24	0	13.1	11460	1.60	12.25	11460	935.51	1501.26	115.7	9.44	15.16
1	21	NA	0	1.2	5368	0.19	15.82	5368	339.32	64.42	109.7	6.93	1.32
1	22	NA	0	0.7	4976	0.12	17.22	4976	288.97	34.83	110.5	6.42	0.77
1	23	NA	0	0.1	4096	0.02	23.05	4096	177.70	4.10	113.0	4.90	0.11
1	24	NA	0	1.1	187	0.65	58.73	187	3.18	2.06	124.2	2.11	1.37

Tabla 6: Química de la orina. Se obtuvieron muestras de orina de todos los animales y se realizó análisis químico de la orina. Se refiere a la Tabla 4 para la descripción del grupo de tratamiento. (cont)

Grupo tratamiento	Volumen orina		UPROT_Execr	UGLU	UGLU_CR	UGLU_excr	UPROT	UPROT_R	UPROT_Execr
	Animal Número	Día							
3	1	14	3.08	8671	1187.81	3659.16	70.1	9.60	29.58
3	2	14	2.55	8624	1253.49	3190.88	54.6	7.94	20.20
3	3	14	1.49	8408	1044.47	1555.48	78.2	9.71	14.47
3	4	14	2.67	8224	1131.22	3018.21	80.4	11.06	29.51
3	5	14	1.93	7467	1066.71	2053.43	61.6	8.80	16.94
3	6	14	2.39	8811	1320.99	3154.34	59.2	8.88	21.19
3	7	14	2.28	10072	1172.53	2669.08	92.5	10.77	24.51
3	8	14	3.05	9831	961.94	2929.64	98.9	9.68	29.47
2	9	14	3.85	11291	1162.82	4471.24	99.8	10.28	39.52
2	10	14	3.27	8900	1060.79	3471.00	96.0	11.44	37.44
2	11	14	2.88	8735	1128.55	3249.42	88.0	11.37	32.74
2	12	14	2.04	9803	926.56	1891.98	106.9	10.10	20.63
1	21	14	0.84	56	0.94	0.78	127.2	2.13	1.78
1	22	14	0.54	72	1.08	0.58	127.8	1.91	1.02
1	23	14	1.18	84	1.28	1.51	125.9	1.92	2.27
1	24	14	1.04	146	2.11	2.19	120.9	1.75	1.81

EJEMPLO 3

El fin de este estudio era evaluar los efectos renoprotectores de hKDC (sin un andamiaje) administradas localmente bajo la cápsula renal de un modelo de ratón SCID de estreptozotocina (STZ) de diabetes.

Diseño del estudio**Tabla 7:** Diseño experimental.

Grupo de tratamiento	Nº de animales	Tratamiento
1	8	No diabético-no tratamiento
2	8	STZ + vehículo
3	8	STZ + 1e ⁶ hKDC

Modelo animal

Ratones ICR SCID a las 6-8 semanas de edad se administrarán con una dosis única (180 mg/kg i.p.) de estreptozotocina (Sigma) para inducir diabetes. Glucosas en sangre superiores a 350 mg/dl se considerarán diabéticas. Dos semanas después de la inyección de STZ, las células se administrarán en la corteza del riñón de animales diabéticos.

Preparación de dosis

En el momento del trasplante, se inyectaron hKDC bajo la cápsula renal de ratones. Los ratones se anestesiaron con ketamina y xilazina. Se expuso el riñón izquierdo y se hizo una pequeña incisión (0,3 cm) en el polo inferior de la cápsula renal usando una aguja de 23 G. Se inyectaron hKDC (1,0e⁶ células) mediante un tubo siliconizado de PE 50 (VWR) unido a una punta de 200 ul sobre una jeringa roscada de Hamilton (Hamilton). La incisión se cauterizó, el músculo se suturó y se grapó la piel. Se dejó que los ratones se recuperaran bajo una lámpara caliente y a continuación se devolvieron a su alojamiento normal.

Procedimientos terminales**Análisis del suero**

En el día 0 y 28 después de la administración de células, se obtendrán el peso corporal y muestras de sangre de todos los ratones y se medirá la concentración de glucosa en sangre. Todas las glucosas en sangre se comprobarán por la mañana para un valor de glucosa alimentado aleatorio. Si los animales alcanzan glucosas en sangre normales, en el día 28 se realizará una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (IPGTT). A animales que ayunaron doce h se les administrará una inyección i.p. de 2 g/kg de glucosa y se tomarán los azúcares en sangre en los tiempos 0, 15, 30, 60 y 90 minutos.

Análisis de orina

En el día 0 y 28 después del trasplante, cada animal se pesará y se dispondrá en jaulas metabólicas (Lab products Inc) durante 24 h. Después de la recogida, los animales se devolverán a su alojamiento normal. La orina se centrifugará ligeramente para eliminar cualquier residuo, se recogerá con una pipeta para determinar el volumen y entonces se congelará. Se medirá la eliminación de proteína, creatinina y glucosa en orina.

Resultados**Análisis del suero**

En el día 1, 9, 16, 23 y 28 después del trasplante, se obtuvieron muestras de sangre de todos los ratones y se midió la concentración de glucosa en sangre. La Tabla 8 y la Figura 3 muestran que los valores de glucosa en sangre fueron elevados en todos los animales, excepto animales no diabéticos. Los valores permanecieron a un valor constante durante toda la duración del estudio. En el día 28 después del trasplante de células, los animales no diabéticos (grupo 1) mostraron glucosa en sangre media de 161 mg/dl +/- 9 mg/dl. Los animales tratados con vehículo (grupo 2) tuvieron una glucosa en sangre media de 545 mg/dl +/- 42 mg/dl. Los animales tratados con hKDC (grupo 3) tuvieron una glucosa en sangre media de 552 mg/dl +/- 57 mg/dl y los animales tratados con hUTC (grupo 4) tuvieron una glucosa en sangre media de 581 mg/dl +/- 123 mg/dl.

Análisis de orina

En el día 0 y día 28 después del trasplante, se recogió orina durante veinticuatro horas de todos los animales y se analizó. La tasa de eliminación de glucosa aumenta con el tiempo y fue similar entre todos los grupos de tratamiento (Tabla 9 y Figura 4). Sin embargo, en comparación con animales no diabéticos (grupo 1), los animales tratados con vehículo y tratados con células mostraron una elevada tasa de eliminación de proteína. En todos los animales, excepto los animales tratados con hKDC, la tasa de eliminación de proteína aumentó con el tiempo. En comparación con el tratamiento con vehículo (grupo 2), el tratamiento con hKDC produjo una reducción del 55 % en la tasa de eliminación de proteína total (Tabla 9, Figura 5). En el día 28, la tasa de eliminación de proteína total fue 10,29 mg/h +/- 6,44 mg/h para los animales del grupo 1, 46,29 mg/h +/- 7,16 mg/h para los animales del grupo 2, 20,63 mg/h +/- 2,65 mg/h para los animales del grupo 3 y 32,13 mg/h +/- 8,44 mg/h para los animales del grupo 4.

Conclusión

Previamente, los presentes inventores demostraron que hKDC, sembradas en un andamiaje de GELFOAM, es renoprotector en un modelo de ratón transgénico de nefropatía diabética. Aquí, los presentes inventores confirman sus resultados, además de demostrar que la administración local de hKDC, sin un andamiaje, protege el riñón de lesión diabética en un modelo STZ de diabetes. Los datos mostraron que la administración subcapsular local de 1,0x06 hKDC reduce la tasa de eliminación de proteína total el 55% en un modelo de SC/D STZ de diabetes mellitus.

Tabla 8: Glucosa en sangre.

Grupo		Día 1	Día 9	Día 16	Día 23	Día 28
		(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)
1		142	120	161	149	166
1		158	113	161	124	164
1		141	139	157	146	157
1		162	140	175	175	150
1		181	170	166	187	155
1		154	141	204	182	176
	Media	156	137	171	161	161
	STDEV	15	20	17	25	9
2		510	583	600	571	578
2		364	439	480	512	511
2		372	455	491	452	507
2		578	278	571	549	600
2		600	538	583	600	529
2		478	449	600	600	600
	Media	484	493	551	547	545
	STDEV	100	64	60	64	42
3		360	480	422	546	508
3		440	447	429	482	429
3		547	447	600	600	544
3		493	472	527	563	600
3		503	505	600	600	554
3		458	450	476	474	487

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Grupo		Día 1	Día 9	Día 16	Día 23	Día 28
		(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)	(mg/dL)
3		361	478	541	550	529
3		472	491	496	600	600
	Media	454	471	540	565	552
	STDEV	66	22	69	51	57
4		600	520	533	581	582
4		363	284	243	244	242
4		501	495	489	470	600
4		514	574	556	575	562
4		411	516	468	517	600
4		489	543	546	600	600
4		455	525	600	600	600
4		409	379	375	490	526
	Media	468	480	506	542	581
	STDEV	75	98	116	118	123

Tabla 9: Tasa de eliminación de glucosa en orina.

Día 0	Media (mg/hr)	SEM
Grupo 1	12.42	4.14
Grupo 2	1226.73	390.83
Grupo 3	1793.71	399.44
Grupo 4	1251.06	355.44
Día 28	Media (mg/hr)	SEM
Grupo 1	21.03	10.59
Grupo 2	1659.29	471.21
Grupo 3	2137.91	469.64
Grupo 4	1964.92	524.55

Tabla 10: Tasa de excreción total de proteína en orina.

Día 0	Media (mg/hr)	SEM
Grupo 1	4.00	1.99
Grupo 2	21.20	3.52
Grupo 3	16.71	2.52
Grupo 4	17.56	3.84

Día 28	Media (mg/hr)	SEM
Grupo 1	10.29	6.44
Grupo 2	46.29	7.16
Grupo 3	20.63	2.65
Grupo 4	32.13	8.44

EJEMPLO 4

El fin de este estudio era evaluar los efectos renoprotectores de hKDC o hMSC administradas localmente bajo la cápsula renal de un modelo de ratón SCID STZ de diabetes mellitus.

Diseño del estudio

Tabla 11: Diseño experimental.

Grupo Nº	Nº animales	Descripción
1	10	no tratamiento
2	14	STZ + vehículo
3	14	STZ + 1e6 hMSC, Lot# R012910, Pasaje 5
4	14	STZ + 1e6 hKDCs, Lot# K100108, Pasaje 5

Modelo animal

Se usaron un total de 52 animales (NOD macho de Jackson Laboratory (NOD.CB17-Prkdc^{scid}/J) SCID muscularis, aproximadamente 24 gramos cada uno) en este estudio para la inducción y tratamiento de la diabetes. La diabetes (definida como el nivel de glucosa en sangre de ≥ 300 mg/dl) se indujo por inyección i.p de STZ (disuelta en 0,109 moles/l o 3,2 % (peso/volumen) de citrato de sodio tamponado a 10 mg/ml de concentración). Se administraron inyecciones de STZ a dosis de 50 mg/kg durante cinco días consecutivos (grupo 2-3).

Preparación de dosis

En el día del tratamiento con células, animales del grupo 1 (grupo de control) se abrieron quirúrgicamente y se cerraron sin tratamiento con células. Los animales del grupo 2 se abrieron quirúrgicamente y sus riñones izquierdos

se inyectaron con solución salina. Los animales de los grupos 3 y 4 se abrieron quirúrgicamente y sus riñones izquierdos se implantaron con células ($1e^6$ hMSC para el grupo 3 y $1e^6$ hKDC para el grupo 4) (véase la Tabla 11 para las asignaciones de grupos de tratamiento).

5 **Procedimientos terminales**

En el día 7 después del tratamiento con células, se midieron los niveles de glucosa en sangre mediante la vena de la cola usando un glucómetro (OneTouch Ultra, Lifescan).

10 **Resultados**

En el día 7 después del tratamiento con células, todos los animales fueron hipoglucémicos con un valor de glucosa en sangre de >300 mg/dl. Los valores de glucosa en sangre siguieron siendo elevados durante toda la duración del estudio. En el día 30 después del tratamiento con células, el 100 % de animales del grupo 1 sobrevivieron a la duración del estudio. A diferencia, solo el 29 % de los animales en el grupo 2, 36 % de los animales en el grupo 3 y 57 % de los animales en el grupo 4 sobrevivieron a la duración del estudio (Figura 6).

15 **Conclusión**

Previamente, los presentes inventores mostraron que la administración local de hKDC protege el riñón de la lesión diabética en un modelo STZ de diabetes. En este estudio, los presentes inventores mostraron que la administración subcapsular local de $1,0 \times 10^6$ hKDC promueve la supervivencia de animales diabéticos inducida por STZ.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 1. Una población de células derivadas de riñón humano para su uso en un método para tratar nefropatía diabética que comprende administrar una cantidad terapéutica de $0,18 \times 10^6$ a $1,00 \times 10^6$ de las células derivadas de riñón humano a un sujeto mamífero; en la que las células derivadas de riñón humano son capaces de auto-renovación y expansión en cultivo; en la que las células derivadas de riñón humano son positivas para la expresión del marcador de la superficie celular de HLA I y CD44, y para la expresión génica de Oct-4, Pax-2 y WT1; y en la que las células derivadas de riñón humano son negativas para la expresión del marcador de la superficie celular de CD133, y la expresión génica de Wnt-4.
- 10 2. La población de células derivadas de riñón humano para su uso en un método de la reivindicación 1, en la que las células derivadas de riñón humano son adicionalmente positivas para la expresión génica de BMP7, BMP2, GDF5, EpoR y Rex-1, y negativas para la expresión génica de Sox2, FGF4 y hTert.
- 15 3. La población de células derivadas de riñón humano para su uso en un método de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que las células derivadas de riñón humano son adicionalmente positivas para la expresión del marcador de la superficie celular de CD24, CD29, CD49c, CD73, CD166 y SSEA-4, y negativas para la expresión del marcador de la superficie celular de HLA II, CD31, CD34, CD45, CD56, CD80, CD86, CD104, CD105, CD117, CD133, CD138 y CD141.
- 20 4. La población de células derivadas de riñón humano para su uso en un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que las células derivadas de riñón humano se administran localmente a un riñón del mamífero por un método seleccionado del grupo que consiste en trasplante, implante, inyección e infusión.
- 25 5. La población de células derivadas de riñón humano para su uso en un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que las células derivadas de riñón humano se administran bajo una cápsula renal de dicho mamífero.
- 30 6. La población de células derivadas de riñón humano para su uso en un método de la reivindicación 5, en la que las células derivadas de riñón humano se administran bajo la cápsula renal mediante inyección.
- 35 7. La población de células derivadas de riñón humano para su uso en un método de la reivindicación 5, en la que las células se administran localmente a la cápsula renal implantando.
- 40 8. La población de células derivadas de riñón humano para su uso en un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que las células derivadas de riñón humano se administran a una corteza renal de dicho mamífero.
- 45 9. La población de células derivadas de riñón humano para su uso en un método de la reivindicación 8, en la que las células derivadas de riñón humano se administran a la corteza renal mediante inyección.
- 50 10. La población de células derivadas de riñón humano para su uso en un método de la reivindicación 8, en la que las células derivadas de riñón humano se administran a la corteza renal por implantación.
- 55 11. La población de células derivadas de riñón humano para su uso en un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que las células derivadas de riñón humano se implantan en el paciente con un andamiaje adecuado.
- 60 12. La población de células derivadas de riñón humano para su uso en un método de la reivindicación 11, en la que el andamiaje se prepara a partir de polímeros naturales, polímeros sintéticos o combinaciones de los mismos, y en la que los polímeros son biodegradables y biocompatibles.
- 65 13. La población de células derivadas de riñón humano para su uso en un método de la reivindicación 11 o la reivindicación 12, en la que el andamiaje es una espuma.
14. La población de células derivadas de riñón humano para su uso en un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que las células derivadas de riñón humano se administran en secuencia con o se co-administran con uno o más agentes biológicamente activos, tales como agentes antitrombogénicos, agentes antiapoptóticos, agentes antiinflamatorios, inmunosupresores, antioxidantes, o eprodisato o triptolida.

Figura 1/6

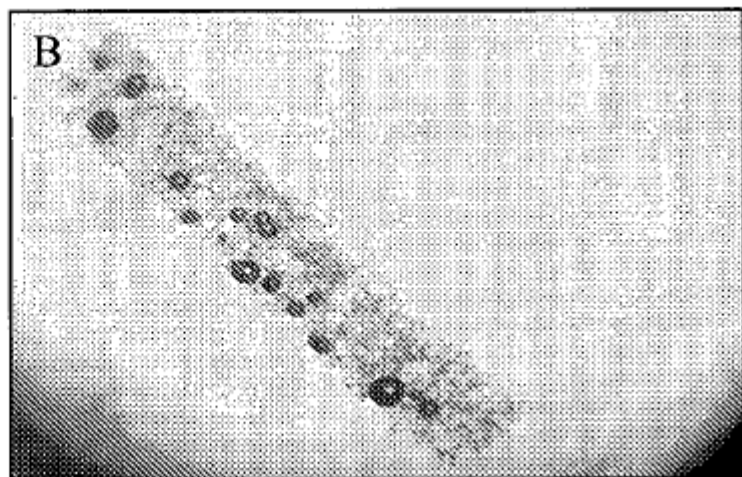
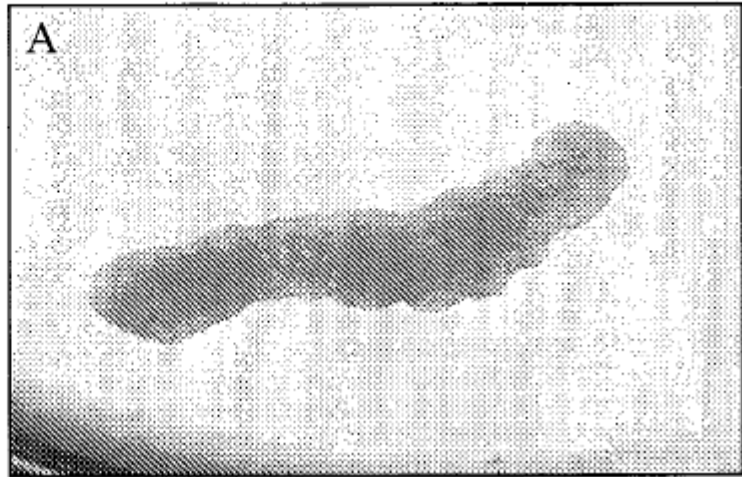


Figura 2/6

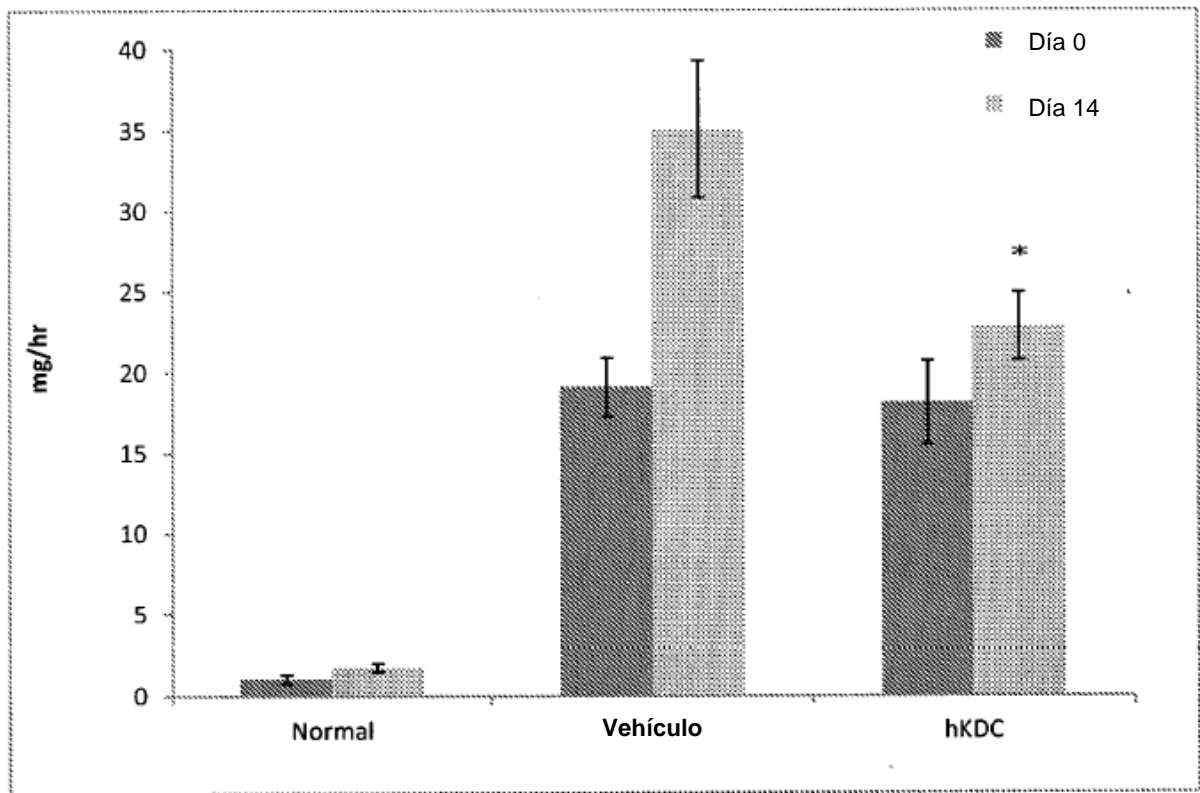


Figura 3/6

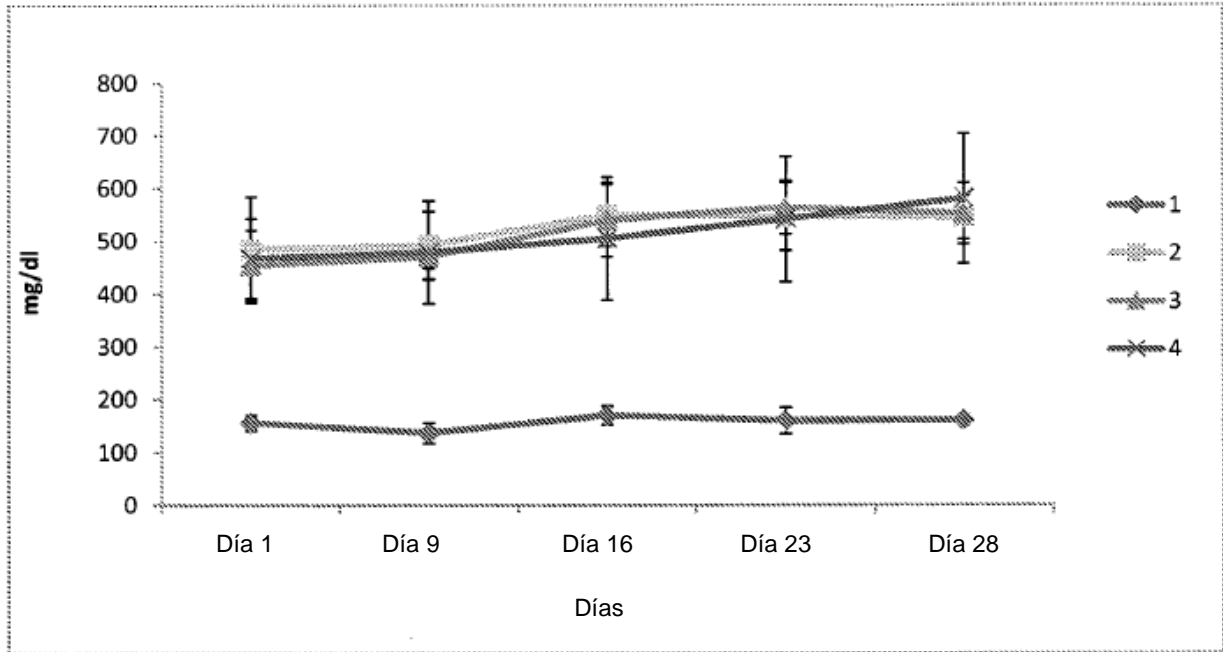


Figura 4/6

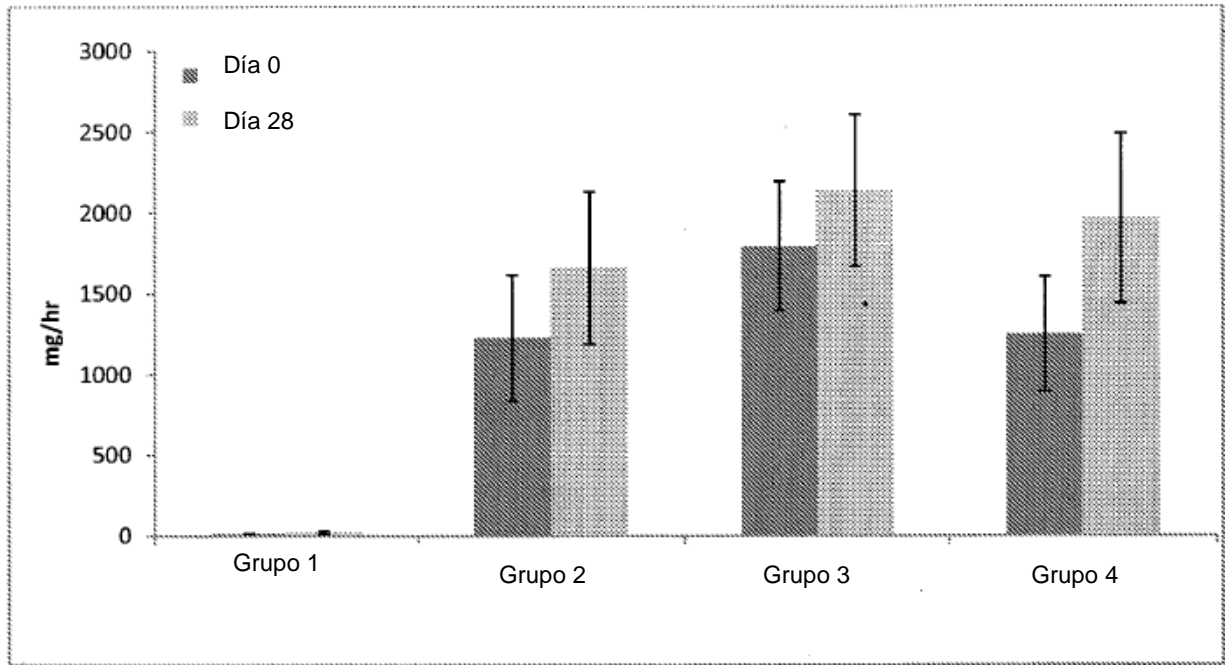


Figura 5/6

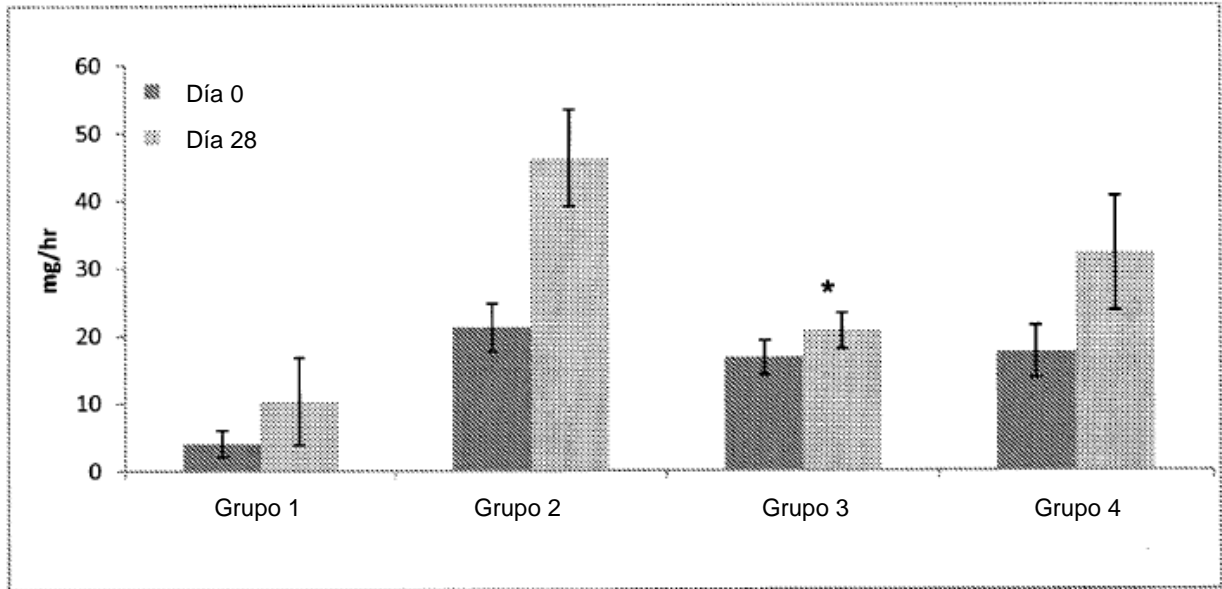


Figura 6/6

