

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 580 172**

51 Int. Cl.:

C12N 5/0775 (2010.01)

C12N 5/074 (2010.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61K 35/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2009 E 09744160 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2361303**

54 Título: **Una célula madre mesenquimal multipotente aislada de glomérulos humanos adultos (HGL-
MSC), un método para preparar la misma y usos de la misma en la medicina regenerativa del
riñón**

30 Prioridad:

04.11.2008 EP 08425708

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

19.08.2016

73 Titular/es:

**FRESENIUS MEDICAL CARE DEUTSCHLAND
GMBH (100.0%)**

**Else-Kröner-Strasse 1
61352 Bad Homburg , DE**

72 Inventor/es:

**CAMUSSI, GIOVANNI;
BRUNO, STEFANIA y
BUSSOLATI, BENEDETTA**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 580 172 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Una célula madre mesenquimal multipotente aislada de glomérulos humanos adultos (HGL-MS), un método para preparar la misma y usos de la misma en la medicina regenerativa del riñón.

Campo técnico

5 La presente invención se relaciona con una célula madre mesenquimal humana multipotente que es derivada de glomérulos desencapsulados de riñón humano adulto y muestra la capacidad de diferenciarse en una variedad de tipos de células, particularmente en tipos de células glomerulares, y las cuales al mismo tiempo se caracterizan por capacidades notables de autorrenovación y clonogénicas. Adicionalmente, la invención se relaciona con un método para preparar la célula madre mesenquimal humana multipotente de la invención y el uso de tal célula madre en
10 medicina regenerativa, particularmente en el tratamiento terapéutico de lesión y enfermedad renal.

Técnica anterior

El trasplante de células madre es conocido por poseer el potencial de reparar y regenerar tejidos y órganos dañados o lesionados. Consecuentemente, se han llevado a cabo estudios intensos en los años recientes, con el fin de intensificar y aislar nuevas células madres multipotentes tanto de origen humano como animal, así como para
15 investigar la efectividad de tales células madre en aplicaciones clínicas, especialmente medicina regenerativa.

Por ejemplo, Oliver et al., [3] identificaron células madre cíclicas en la papila de riñones de roedores adultos, con base en la retención BrdU. Utilizando la misma metodología, Maeshima et al., [4] identificaron células marcadas con BrdU en los túbulos renales de ratas adultas y demostraron el potencial de tales células madre para generar túbulos proximales y células de ductos de recolección o fibroblastos cuando se trasplantaron en el riñón metanéfrico.
20 Kitamura et al., establecieron y caracterizaron una población distinguible de células progenitoras renales del segmento S3 del nefrón en el riñón adulto de rata [37]. Estas células demostraron poseer capacidades de autorrenovación y de expresar marcadores embrionarios renales tales como Pax2, Wtn4 y Wtn1. Con base en la capacidad de extrudir el colorante Hoechst se identificó una llamada "población lateral" con potencial multipotente en riñones embrionarios y adultos [38]. Recientemente Gupta et al., demostraron la presencia en el riñón de rata adulta de una población residente renal de células progenitoras renales multipotentes que expresan marcadores de células madre embrionarios tales como Oct-4 y Pax-2 [5]. Sin embargo, en la lista de su origen animal, estas células madre renales multipotentes no pueden ser utilizadas en aplicaciones químicas relacionadas con la regeneración de tejidos u órganos humanos.

La identificación en una población de células madre multipotentes CD113⁺CD24⁺ a partir de riñones humanos embrionarios han sido divulgada en [39]. Sin embargo, estas células madre embrionarias no representan una solución óptima para el problema de proveer células madre humanas para uso en medicina regenerativa, particularmente a la vista de las preocupaciones éticas asociadas con las líneas de células madre embrionarias y su preparación a partir de embriones humanos.
30

En el riñón adulto humano los presente inventores divulgaron previamente una población residente de células progenitoras/madre CD113⁺ [1]. Las células CD133⁺ fueron encontradas en células raras en el intersticio en la proximidad de los túbulos y glomérulos proximales o dentro de los túbulos, y demostraron experimentar diferenciación epitelial y endotelial renal tanto *in vitro* como *in vivo*. Recientemente, Sagrinati et al., aislaron y caracterizaron una población de células CD133⁺CD24⁺ multipotentes a partir de la cápsula de Bowman de riñones adultos [2]. Sin embargo, las células progenitoras/madre CD133⁺ identificadas en el riñón humano están
40 caracterizadas por pobres capacidades de autorrenovación. Adicionalmente, tales células no han demostrado poseer la capacidad de diferenciarse en los diferentes tipos de células encontrados en el glomérulo renal, es decir podocitos, células endoteliales y mesangiales.

Schwab et al., Human Reproduction (Oxford), vol. 22, no. 11. November 2007, pages 2903-2911, divulgan células madre mesenquimales CD146⁺ PDGF-R β ⁺ CD34⁺ que muestran las capacidades de diferenciación clásicas de las MSCs, esto es la diferenciación en linajes adipogénico, osteogénico, condrogénico y miogénico. Este artículo guarda silencio en cuanto a las capacidades de diferenciación adicionales. Sin embargo, el origen endométrico de estas células apunta fuertemente contra su posibilidad de tener la capacidad de dar lugar a tipos celulares glomerulares tales como podocitos, células mesangiales y endoteliales.
45

La WO 2008/045498 divulga una población de células derivadas de riñón CD34⁺ CD133⁻ CD105⁻ que es capaz de diferenciarse en adipocitos y osteoblastos. Sin embargo, no se divulga diferenciación en tipos de células glomerulares.
50

Las células madre mesenquimales (MSCs) son caracterizadas por su capacidad de diferenciarse en diferentes líneas celulares de origen mesenquimal [7]. La principal reserva de células madre mesenquimales es la médula ósea

(BM) [8]. Sin embargo, los datos recientes obtenidos en un modelo murínico han demostrado que el compartimiento MSC está distribuido más ampliamente. En efecto las MSCs han sido detectadas virtualmente en todo el tejido adulto murínico (bazo, músculo, riñón, pulmón, hígado, cerebro, timo) en asociación con las paredes vasculares [6]. En humanos, las MSCs han sido aisladas a partir de sangre circulante y de varios tejidos tales como sinovio, tejido adiposo, hueso trabecular, pulpa dental, dermis y pulmón [9-16]. Sin embargo, la presencia de MSCs en glomérulos humanos no ha sido investigada hasta ahora.

Resumen de la invención

A la luz de lo antecedente, hay necesidad de células madre mesenquimales derivadas de riñón adulto humano capaces de diferenciarse en los diversos tipos de células encontrados en el glomérulo renal y capaces de autorrenovación, de tal manera que sean exitosamente aplicables en la medicina regenerativa del riñón, particularmente como medicamento para el tratamiento terapéutico de lesiones y/o enfermedades que afectan el riñón humano, más particularmente lesiones y/o enfermedades que afectan los glomérulos renales.

Estos y otros objetivos son alcanzados mediante las células madre mesenquimales humanas multipotentes identificadas y aisladas por los presente inventores en los glomérulos desencapsulados de riñones adultos humanos.

Así, un primer aspecto de la presente invención es una célula madre mesenquimal glomerular multipotente aislada derivable de glomérulos de riñón humano adultos (hGL-MS), en donde dichas células están caracterizadas por que son CD133 (negativas), CD146 (positivas), CD34 (negativas), CD105 (positivas), CD24 (positivas) y Pax-2 (positivas) y caracterizadas adicionalmente por la capacidad de diferenciarse en al menos los siguientes tipos de células: podocitos, células endoteliales y células mesangiales.

En una realización adicional preferida de la invención, las hGL-MS se caracterizan adicionalmente porque son α -SMA (negativas) y Oct-4 (negativas).

Otro aspecto de la invención es un método para preparar las hGL-MS de la invención, que comprende las siguientes etapas:

- cultivar glomérulos desencapsulados de riñón adulto humano en un medio de cultivo de expansión que comprende un medio de cultivo regulado de células animales que contienen suero a pH fisiológico y en la ausencia de factores de crecimiento específicos, obteniéndose de esta manera una población mixta de células que crecen a partir de los glomérulos desencapsulados cultivados, conteniendo dicha población mixta de células CD133 (negativas) en forma de huso, células CD146 (positivas) y CD133 (positivas) y células CD146 (positivas); y

- aislar las células en forma de huso CD133 (negativas), CD146 (positivas) de la población mixta, representando dichas células en forma de huso CD133 (negativas) y CD146 (positivas) la hGL-MSs de la invención.

De acuerdo con una realización preferida, el medio de cultivo de expansión está regulado a un pH comprendido dentro del rango de 6.8 a 7.4, más preferiblemente dentro del rango de 7.2 a 7.4. Puede utilizarse cualquier agente regulador capaz de mantener el pH dentro del rango fisiológico, tal como por ejemplo Hepes, PBS o similares.

En otra realización preferida, las células en forma de huso CD133 (negativas), CD146 (positivas), que representa las hGL-MSs de la invención, se aíslan de al menos la 3ª replicación del cultivo celular o de una replicación subsecuente del cultivo celular, tal como por ejemplo desde la 4ª replicación, la 5ª replicación, la 6ª replicación, etc. Esta realización se basa en el hecho de que las células en forma de huso CD133 (negativas), CD146 (positivas) son el único tipo de células en la población mixta que se encontró superviviente después de la 3ª replicación de cultivo celular bajo las condiciones de cultivo antes mencionadas.

En una realización de la invención, las células en forma de huso CD133 (negativas), CD146 (positivas) son aisladas a partir de la población mixta mediante un método de selección celular tal como FACS. Alternativamente, pueden ser aisladas con base en su morfología en forma de huso.

Las hGL-MSs de la invención están caracterizadas ventajosamente por capacidades notables de autorrenovación y clonogénica y por la capacidad de diferenciarse en un número de tipos de células glomerulares, incluyendo pero no limitándose a células endoteliales, células mesangiales y podocitos. Estas características hacen que las hGL-MSs de la invención sean particularmente adecuadas para el uso en la regeneración del riñón.

Así, un aspecto adicional de la invención es la célula madre mesenquimal glomerular humana aislada de la invención (hGL-MS) para uso como un medicamento en el tratamiento terapéutico de lesiones o enfermedades del riñón, particularmente lesiones o enfermedades que afectan el glomérulo renal.

Un aspecto adicional de la invención es una composición farmacéutica que comprende la célula madre mesenquimal

glomerular humana aislada de la invención (hGL-MSC) y un portador, diluyente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica que comprende la célula madre mesenquimal glomerular humana de la invención (hGL-MSC) es particularmente adecuada para el tratamiento de lesiones o enfermedades del riñón, particularmente lesiones o enfermedades que afectan el glomérulo renal.

5 Descripción de los dibujos

Ventajas y características adicionales de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada con referencia a los dibujos anexos, en donde:

10 La figura 1 muestra la morfología y tasa de crecimiento de células que crecen desde los glomérulos. Las micrografías representativas de glomérulos adultos humanos, carentes de la cápsula de Bowman por tratamiento con colagenasa I después de 24 horas (A), 7 días (B), 2 semanas (C) y 3 semanas (D) en cultivo (magnificación x 200). E) Se muestran las curvas de crecimiento de 5 preparaciones diferentes (designadas como R136, R140, R141, R147 y R148).

15 La figura 2 se relaciona con la caracterización de las hGL-MSCs de la invención. A) Análisis de FACS representativos muestran que las hGL-MSCs son positivas para marcadores de superficie característicos de MSCs (CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166), negativas para CD33 y para marcadores hematopoyéticos específicos (CD45 y CD34) y negativas para marcadores endoteliales (CD31). Las líneas punteadas son los controles isotípicos. B) Micrografías de inmunofluorescencia representativas de hGL-MSCs teñidas con anticuerpos contra vimentina, nestina, Nanog y Musashi (magnificación x 600). Todas las líneas de hGL-MSC desarrolladas exhibieron el mismo fenotipo.

20 La figura 3 muestra las propiedades inmunomoduladoras de hGL-MSCs y su eficiencia en clonación. A) Análisis de FACS representativos muestran que las hGL-MSCs son negativas para antígenos clase II y la molécula de adhesión CD154 así como las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40 (línea oscura). Las líneas punteadas son los controles isotípicos. B) La adición de células madre mesenquimales de médula ósea (BM-MSCs) o de células madre mesenquimales glomerulares humanas (hGL-MSCs) de la invención inhiben la proliferación de PBMC inducida por PHA. Se cultivaron PBMCs (5×10^4 /ml) durante 48 horas en la presencia de PHA 2.5 μ g/ml con o sin BM-MSCs o hGL-MSCs 5×10^3 /ml. Los datos expresan como la media \pm SD de 4 experimentos separados en triplicado. * $p < 0.05$ (prueba t de Student). C) La eficiencia clonogénica se expresa como el porcentaje (%) de clones obtenidos en cada replicación del cultivo.

30 La figura 4 es una micrografía confocal representativa que muestra: A) coexpresión de CD146 y CD24 en un glomérulo (flechas); B) expresión de CD133 con las células parietales de la cápsula de Bowman (flecha) y en las células epiteliales de un túbulo proximal (*); y (C) ausencia de la expresión de CD133 en células glomerulares CD146 (positivas) y CD24 (positivas) (flechas). Original con magnificación 630X.

Descripción detallada de la invención

35 El estudio llevado a cabo por los presentes inventores busca investigar si las células madre mesenquimales están presentes en glomérulos renales desencapsulados adultos humanos y si tales células madre representan una población residente. Además, los inventores evaluaron el potencial de diferenciación de las MSCs derivadas de glomérulos, con interés particular en tipos de células glomerulares tales como podocitos, células endoteliales y mesangiales.

40 Tal como se divulga en más detalle en la sección experimental de la especificación, las células madre mesenquimales de la invención (hGL-MSCs) fueron obtenidas a partir de la porción normal del córtex de riñones humanos retirados quirúrgicamente. Después de la disección del córtex y paso a través de una serie graduada en mallas, la suspensión glomerular fue recolectada, lavada y despojada de la cápsula de Bowman por tratamiento mecánico y enzimático. Los glomérulos desencapsulados (figura 1A) fueron cultivados en un medio de expansión regulado que contiene suero bajo condiciones de no diferenciación, es decir en la ausencia de factores de crecimiento específicos capaces de dirigir la diferenciación de las células madre.

45 Al cabo de 7 días, se observó un crecimiento glomerular de células adherentes (figura 1B). Se alcanzó la confluencia en el día 12-14 cuando se desprendió la monocapa celular mediante tratamiento con tripsina-EDTA. Los remanentes glomerulares fueron retirados por centrifugación a baja velocidad y las células fueron expandidas en el mismo medio de expansión. Durante el período de cultivo inicial hubo una heterogeneidad morfológica en el cultivo celular (figura 1C) pero, después de aproximadamente 3 semanas, (esto es, alrededor de la 4ª replicación), el cultivo se hizo monomórfico con células en forma de huso (figura 1D). La figura 1E muestra las curvas de crecimiento de 5 preparaciones celulares diferentes. La rata de crecimiento fue lenta durante las primeras cinco replications, pero se incrementó con el subcultivo en serie hasta la 20ª replicación (aproximadamente 100 días de cultivo) cuando las células no fueron capaces de más proliferación. El intervalo entre las replications varió entre aproximadamente 3 a

7 días hasta la 4ª replicación, después de la cual se fijó en aproximadamente 7 días.

Las células en forma de huso que crecieron a partir de los glomérulos desencapsulados son las células madre mesenquimales glomerulares humanas (hGL-MSCs) de la invención. Estas células madre pueden ser aisladas entonces a partir del cultivo celular con base en sus características morfológicas, preferiblemente a partir de la 3ª replicación de cultivo celular o desde una replicación subsecuente, tal como por ejemplo la 4ª replicación, la 5ª replicación, la 6ª replicación de cultivo celular.

Los inventores observaron adicionalmente que las células que crecían a partir de glomérulos desencapsulados eran una población mixta que, en las replications celulares tempranas (1-3) que contienen células 31±11% CD133 (positivas) y 74±26% CD133 (negativas) (n=15 preparaciones), tal como se detectó por citometría de flujo. Ambas poblaciones celulares expresan CD146.

Así, como alternativa al método morfológico, las células madre mesenquimales glomerulares humanas (hGL-MSCs) de la invención pueden ser aisladas mediante un método de selección celular tal como Selección Celular Activada por Fluorescencia (FACS). Preferiblemente, las células CD133 (positivas), CD146 (positivas) y las células CD133 (negativas), CD146 (positivas) son seleccionadas por FACS a partir de la 2ª, 3ª o 4ª replicación; sin embargo, también pueden ser aisladas a partir de cualquier replicación, incluso antes de la subreplicación.

Las poblaciones seleccionadas por FACS fueron caracterizadas y clonadas.

Se encontró que las células CD133⁺CD146⁺ coexpresaban los marcadores CD31 y vWF, indicando un fenotipo endotelial. Esta población CD133⁺ no coexpresó nestina (datos no mostrados) ni marcadores MSC tales como vimentina, CD73, CD29 o CD166 (datos no mostrados). El mismo fenotipo fue observado cuando la población celular CD133⁺ fue seleccionada inmunomagnéticamente a partir de la suspensión celular de los glomérulos desencapsulados digeridos (datos no mostrados). Cuando las células que crecían a partir de glomérulos renales fueron caracterizadas después de la 4ª replicación en la presencia del medio de expansión, las células CD133⁺ no fueron detectables posteriormente.

Las células seleccionadas CD133⁺CD146⁺ fueron positivas para marcadores de superficie característicos de MSCs [25], incluyendo CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 y CD166 y fueron negativas para CD133 y marcadores hematopoyéticos específicos (CD45 y CD34) así como para marcadores endoteliales (CD31) (figura 2A). Por inmunofluorescencia, estas células expresaron el marcador específico de MSC vimentina y el marcador de células madre residentes neuronales y de hígado nestina [26, 27, 28], mostrando un patrón filamentososo citoplásmico (figura 2B). Esta población celular no expresó los marcadores epiteliales citoqueratina y E-cadherina. Tampoco expresaron otros marcadores que son expresados usualmente por células glomerulares especializadas tales como α-SMA (la cual en contraste es expresada por células mesangiales) o nefrina (la cual en contraste es expresada por podocitos) (datos no mostrados). Estas características indican la ausencia de células glomerulares contaminantes.

También se evaluó la expresión de los marcadores Nanog, Oct-4 y Musashi. Estas moléculas son factores de transcripción conocidos por estar involucrados en la autorrenovación y pluripotencia de células madres embrionarias y adultas [29-33]. La población de células madre de la invención mostró la expresión en núcleo-citoplasma de tanto Nanog como Musashi (figura 2B), mientras que no expresó Oct-4 (no mostrado).

Las hGL-MSCs también mostraron expresar constitutivamente antígenos de MHC clase I (figura 2A) pero fueron negativas para antígenos clase II y para la molécula de adhesión CD154 y para las moléculas coestimuladoras CD80, CD86 y CD40 (figura 3A), como se describe para BM-MSC [34]. Además, de manera similar a BM-MSCs que son conocidas por inhibir la proliferación de PBMC inducida por PHA, las hGL-MSCs indujeron la reducción significativa de la proliferación de PBMC inducida por PHA (figura 3B). Sin embargo, contrario a BM-MSCs, las hGL-MSCs fueron CD24 (positivas) y Pax-2 (positivas). Adicionalmente, se encontró que las hGL-MSCs de la invención, contrario a las células madre renales aisladas a partir de riñón de ratón, fueron negativas tanto para α-SMA como para Oct-4.

Con el fin de demostrar la capacidad de autorrenovación de las poblaciones de hGL-MSC obtenidas a partir de glomérulos, los inventores llevaron a cabo ensayos de clonogenicidad sobre las células seleccionadas CD133⁺CD146⁺ y CD133⁻CD146⁺. Las suspensiones de células individuales fueron sembradas en placas de 96 pozos y se seleccionaron las que surgieron de los glomérulos en la 3ª replicación del cultivo en el medio de expansión. La eficiencia clonogénica de las células CD133⁺CD146⁺ fue de 25.3±5.1%, mientras que las células CD133⁻CD146⁺ no fueron clonogénicas (figura 3C). La siembra de suspensiones de células individuales que fueron generadas a partir de clones primarios de células CD133⁺CD146⁺ proveyeron clones secundarios, y la siembra de células individuales que fueron generadas a partir de clones secundarios llevó a la generación de clones terciarios (figura 3C). Estos datos indican que las células glomerulares CD133⁺CD146⁺ fueron clonogénicas y exhibieron capacidades de autorrenovación *in vitro*, mientras que las células CD133⁻CD146⁺ fueron incapaces de generar clones bajo estas condiciones. Los clones CD133⁺CD146⁺ fueron analizados por citometría de flujo e

5 inmunohistoquímica y mostraron el mismo fenotipo mesenquimal que las hGL-MSCs derivadas de población no clonada (datos no mostrados). Cuando las células no seleccionadas que crecen a partir de glomérulos fueron caracterizadas después de la 4ª replicación en la presencia del medio de expansión, mostraron todas un fenotipo mesenquimal, indicando que las condiciones de cultivo empleadas eran selectivas para la expansión de las hGL-MSCc.

10 Los inventores también llevaron a cabo experimentos dirigidos a investigar si las GL-MSCs de la invención eran una población renal residente más que una población de MSC derivada de BM localizada dentro de los glomérulos. Para este propósito, se probó primero la presencia de marcadores expresados diferencialmente por células madre residentes y derivadas de BM. Las hGL-MSCs expresaron CD24, lo cual en contraste es negativo con las MSCs derivadas de BM, y se consideraron como un marcador de células madre residentes renales [2, 35]. El origen renal de las hGL-MSCs también es sugerido por la expresión de la proteína y gen de Pax-2 embrionaria específica de órgano. La Pax-2 no fue expresada por BM-MSCs. La Pax-2 es un factor de transcripción que es expresado por las células madre del mesenquimal metanefrítico [36] y por las células madre aisladas de riñón de rata y humano adultos [1, 5]. Además, los inventores aislaron hGL-MSCs a partir de glomérulos de un riñón explantado de un donante masculino trasplantado en un receptor femenino. Las hGL-MSCs derivadas del riñón trasplantado exhibieron el mismo fenotipo que las hGL-MSCs derivadas de riñón normal (datos no mostrados). Con el fin de establecer si las hGL-MSCs derivaban de la médula ósea del receptor o del riñón trasplantado, la presencia del cromosoma Y en las hGL-MSCs fue analizada en la 2ª y 6ª replications. Se analizaron en total 914 núcleos y 48 metafases en la 2ª replicación (478 núcleos; 23 metafases) más la 6ª replicación (436 núcleos; 25 metafases). El análisis por FISH del patrón de hibridación de las sondas centrométricas de color dual X (verde)/Y (rojo) mostró que el 90% de los núcleos tenían un patrón rojo/verde masculino y 10% de los núcleos tenían solamente una mancha verde. Los núcleos con una mancha verde probablemente derivan de núcleos masculinos que han perdido el cromosoma Y, un evento que frecuentemente ocurre en cultivo. No se observaron núcleos femeninos (dos manchas verdes). El cariotipo detectado en todas las 48 metafases de las hGL-MSCs fue masculino. Los cromosomas de la metafase, observados con DAPI para contraincinción por FISH, aparecieron normales. Estos datos sugieren que las hGL-MSCs no se originaron a partir de la médula ósea del receptor. Por el contrario, representan una población residente en los glomérulos del riñón donante.

30 Puesto que una de las características más prominentes de las células madre mesenquimales es su capacidad para diferenciarse en múltiples linajes mesenquimales, los inventores establecieron la capacidad de las hGL-MSCs de la invención para diferenciarse en células de tejido conectivo específico. La población CD133⁺CD146⁺ seleccionada en la 2ª o 3ª replicación demostró ser capaz de diferenciarse en linajes adipogénico, osteogénico y condrogénico bajo condiciones de cultivo definidas (datos no mostrados). En contraste, tanto las líneas de hGL-MSC originales CD133⁻CD146⁺ obtenidas de 15 pacientes (en las replications 4-10) y los 4 clones obtenidos subsecuentemente demostraron poseer capacidades de diferenciación multilínea.

35 Las hGL-MSCs experimentaron eficientemente la diferenciación osteogénica después de 14 días en medio osteogénico como lo demuestra la tinción con rojo de Alizarina de los depósitos de calcio.

Cuando se cultivaron durante 21 días en medio para adipocitos, las hGL-MSCs generaron células que contenían cuerpos lipídicos. En los controles no diferenciados no se observó evidencia de mineralización o cuerpos lipídicos.

40 La diferenciación de las hGL-MSC en condrocitos se observó utilizando medio selectivo para condrocitos [7]. Las pellas diferenciadas se recolectaron a los 28 días de tratamiento teñidas con Safranina O y azul Alcian, lo cual es típico de la diferenciación condrocítica [7].

45 Tomados como un todo, estos resultados demuestran las capacidades de diferenciación multilínea de las hGL-MSCs de la invención. También vale la pena notar que se obtuvieron resultados muy similares con las 15 líneas de hGL-MSCs aisladas originalmente con los 4 clones obtenidos subsecuentemente a partir de las líneas celulares originales.

50 La capacidad de la hGL-MSCs para diferenciarse, bajo condiciones de cultivo apropiadas, en poblaciones celulares glomerulares específicas, tales como células endoteliales, podocitos y células mesangiales, también fue evaluada. Con el fin de obtener la diferenciación endotelial, las hGL-MSCs fueron cultivadas durante 3 semanas en EBM en la presencia de VEGF. El análisis citométrico de flujo mostró la expresión de marcadores endoteliales específicos, tales como CD105, KDR, CD34 y CD31. Además, cuando se cultivaron en Matrigel, células endoteliales de hGL-MSCs diferenciadas y no diferenciadas formaron la organización característica tipo capilar (datos no mostrados). En la presencia de PDGFbb y TGFβ1, las hGL-MSCs adquirieron un fenotipo similar al mesangial. Específicamente, adquirieron la expresión de α-SMA y del receptor 1 de angiotensina 2 (AT1). Cuando se cultivaron durante 3 semanas en la presencia de 20 μM/L de ATRA, las hGL-MSCs adquirieron la expresión de marcadores epiteliales específicos expresados por podocitos tales como citoqueratina, podocina, nefrina y sinaptopodina. La expresión de nefrina fue confirmada por PCR en tiempo real, demostrando que el transcripto de nefrina estaba presente en las hGL-MSCs después de la diferenciación en podocitos pero no en hGL-MSCs mantenidas en el medio de expansión que evita la diferenciación. Se probaron tres líneas celulares clonadas con resultados similares.

En todas las condiciones experimentales las células diferenciadas perdieron los marcadores relacionados con dureza, tales como Nanog, Musashi, vimentina, nestina, CD90, CD146, CD73, con la excepción de las células diferenciadas mesangiales y endoteliales, que mantuvieron el CD90 y el CD146 (datos no mostrados), los cuales son expresados típicamente por células maduras. Todas las líneas celulares y clones de hGL-MSc mostraban las mismas capacidades de diferenciación. Las MSCs derivadas de BM bajo las mismas condiciones de cultivo fueron capaces de diferenciarse en células endoteliales y células similares a las musculares pero no en células similares a podocitos (datos no mostrados).

En conclusión, los inventores investigaron la presencia de células madre dentro de glomérulos humanos que fueron previamente desencapsulados con el fin de evitar la presencia de células madre asociadas a la cápsula de Bowman. Las células que crecían a partir de los glomérulos desencapsulados en las replicaciones tempranas mostraron consistir de dos poblaciones diferentes: una población CD133⁺CD146⁺ y una población CD133⁻CD146⁺. Las células CD133⁺ lo más probablemente representan una población celular comprometida endotelial, puesto que coexpresan marcadores endoteliales. Además, las células CD133⁺CD146⁺ no sobrevivieron después de la 3^a replicación. Además, cuando la población CD133⁺CD146⁺ fue seleccionada, no fue capaz de autorrenovarse y fue no clonogénica.

En contraste, la población CD133⁻CD146⁺ que fue aislada y clonada a partir de glomérulos humanos desencapsulados se encontró como una población multipotente de células madre mesenquimales capaz de generar cultivos a largo plazo. De manera interesante, fueron las únicas células que crecieron a partir de glomérulos capaces de sobrevivir después de la 4^a replicación del cultivo celular. Estas células fueron designadas como hGL-MSCs. Las hGL-MSCs compartieron con las MSCs derivadas de BM y con MSCs derivadas de otros tejidos adultos [9-16, 26-28] las siguientes características: expresión de CD29, CD44, CD166, CD73, CD90, CD105, CD146, vimentina y nestina; carencia de CD34 y CD45; la capacidad de experimentar diferenciación mesodérmica (osteocitos, condrocitos y adipocitos). Además, las hGL-MSCs expresaron los marcadores embrionarios Nanog y Musashi involucrados en el mantenimiento celular. Al igual que las MSCs derivadas de BM, las hGL-MSCs fueron capaces de inhibir la proliferación de PBMCs inducida por PHA. Se demostró un efecto inmunomodulador similar para las células madre/progenitoras multipotentes Sca-1⁺lin⁻ tubulares de ratones adultos [40] y para MSCs de humanas derivadas de corazón, bazo y grasa perirrenal [41].

El origen de las MSCs dentro de órganos adultos ha sido debatido. En el presente estudio, los inventores encontraron que las hGL-MSCs aisladas poseen las características fenotípicas de células madre renales residentes. En efecto las hGL-MSCs, en contrario a las BM-MSCs, expresaron CD24 el cual se considera un marcador de los progenitores residentes renales [2, 35], así como del factor de transcripción específico de órganos embrionarios Pax-2 [1, 5, 36]. La expresión de Pax-2 ha demostrado previamente ser un marcador de poblaciones de células madre residentes renales [1, 5, 36]. Además, la presencia de hGL-MSCs de identidad sexual del donante en un aloinjerto renal proveyó evidencia en cuanto a la presencia de una población de MSC que reside localmente dentro de los glomérulos humanos adultos. Este resultado está en concordancia con la evidencia previa con respecto a MSCs residentes en tejidos previstos en pulmones humanos a partir de estudios de trasplante de pulmón [16].

El compromiso renal de las hGL-MSCs es demostrado por su capacidad de diferenciarse en células endoteliales y en linajes glomerulares específicos tales como células tipo podocitos y mesangiales bajo condiciones de cultivo apropiadas. En efecto, las hGL-MSCs, cuando se cultivan en la presencia de ATRA y de colágeno tipo IV, fueron capaces de diferenciarse en células epiteliales que expresaban marcadores específicos para el diafragma de ranura de los podocitos tales como nefrina, sinaptopodina y podocina. Esto está en contraste con las BM-MSCs.

La diferenciación de las hGL-MSCs en células mesangiales glomerulares se obtuvo cultivando las células en la presencia de una combinación de TGF beta 1 y PDGFbb, de las cuales se ha reportado que inducen diferenciación celular en músculos lisos en células progenitoras adultas multipotentes derivadas de BM [20]. Además, las hGL-MSCs mostraron propiedades inmunomoduladoras puesto que inhibieron la proliferación de PBMCs estimuladas por PHA, de la misma manera que BM-MSCs [23-25]. La actividad inmunomoduladora de las hGL-MSCs es relevante para las enfermedades glomerulares inflamatorias.

En conclusión, los resultados del presente estudio demuestran la presencia en glomérulos desencapsulados humanos adultos de una población de células madre multipotentes residentes que expresan un fenotipo mesenquimal con el potencial de contribuir al rendimiento de los diferentes tipos celulares específicos glomerulares.

El aislamiento de las células madre mesenquimales glomerulares humanas de la invención a partir de glomérulos reales humanos adultos y sus características de caracterización se describen en más detalle en la sección experimental a continuación, la cual se provee a manera de ilustración solamente y no pretende limitar el alcance de la invención como se define en las reivindicaciones anexas.

Sección experimental

Materiales y métodos

Aislamiento y cultivo de células madre mesenquimales derivadas a partir de glomérulos y médula ósea humanos

5 Las células madre mesenquimales humanas a partir de glomérulos (hGL-MSCs) fueron obtenidas a partir de la porción normal del córtex de riñones retirados quirúrgicamente (15 preparaciones diferentes). Después de la disección del córtex y la replicación a través de una serie graduada de mallas (mallas 60 y 120), la suspensión glomerular fue recolectada, lavada con Solución Salina Balanceada de Hans (GIBCO, Grand Island, NY) y privadas mecánicamente de la cápsula de Bowman, en varias rondas de aspiración/expulsión utilizando una pipeta de 10 ml, y enzimáticamente, por digestión durante 2 minutos con colagenasa I (Sigma, St. Louis, MO). Los glomérulos decapsulados fueron transferidos a matraces T25 recubiertos con fibronectina (Falcon, BD Bioscience, Two Oak
10 Park, Bedford, MA).

Se compararon varios medios de cultivo. RPMI (Sigma) con FCS al 10% (Euroclone, Wetherby, Reino Unido), en la presencia de 1X ITS (Sigma) y Hepes (libre de ácido, 10mM) (Sigma) (medio de expansión) que permitió la amplificación de hG1-MSCs y por lo tanto se utilizó en experimentos subsecuentes.

Las MSC humanas fueron aisladas a partir de BM y cultivadas como se describió previamente [7].

15 Cinética de crecimiento

Las curvas de crecimiento que describen cinéticas de cultivo fueron generadas como se describió previamente [6]. El área de crecimiento ocupada por un cultivo de hG1-MSC, correspondiente a 25 cm², se asumió como 1 buscando simplificación. Cuando tuvo lugar la segunda replicación, la relación de división en la replicación 1 (1:3) fue multiplicada por ese valor, significando que al final de la replicación 1 el área de crecimiento acumulativa fue 3 (esto es, tres veces el crecimiento son ocupadas por un cultivo primario). Al final de la segunda replicación, la relación de división en la replicación 2 (1:3) fue multiplicada por el área de crecimiento acumulativo en la replicación 1 (3x3=9). Este procedimiento fue repetido para cada replicación, proveyendo una curva de crecimiento teórica que es directamente proporcional al número de células. El crecimiento fue evaluado en 5 preparaciones glomerulares diferentes.

25 Caracterización de células madre mesenquimales derivadas de glomérulos

Se llevó a cabo análisis citofluorimétrico como se describe en [1] y se utilizaron los siguientes anticuerpos, todos conjugados con ficoeritrina (PE) o isotiocianato de fluoresceína (FITC): anticuerpos monoclonales anti-CD105, -CD29, -CD31, -CD146, -CD44, -CD24, -CD90 (Dakocytomation, Copenhagen, Dinamarca); -CD73, -CD34, -CD45, -CD80, -CD86, -CD166, HLA-I (Becton Dickinson Biosciences Pharmingen, San José, CA); -CD133 (Miltenyi Biotec, Auburn); KDR (R&D Systems, Abington, Reino Unido); -HLA-II (Chemicon International Temecula, CA), -CD40 (Immunotech, Beckman Coulter), -CD154 (Serotec, Raleigh, NC Estados Unidos). Los controles isotípicos IgG de ratón fueron de Dakocytomation. Todas las incubaciones fueron llevadas a cabo en 100 µl de solución salina regulada con fosfato (PBS) que contenía 0.1% de albúmina de suero bovino y 0.1% de azida de sodio, a 4°C. Para cada muestra, se analizaron 10,000 células sobre un citómetro FACS Calibur (BD Biosciences Pharmingen). Las puertas fueron construidas con base en controles negativos y se incluyeron controles de compensación en todos los análisis llevados a cabo. Los porcentajes y números de población fueron generados para poblaciones en las puertas a partir de cada experimento utilizando el software Cell Quest (BD Biosciences Pharmingen).

Se llevó a cabo la inmunofluorescencia indirecta sobre las hGL-MSCs, no diferenciadas o diferenciadas, cultivadas sobre portaobjetos en cámara (Nalgen Nunc International, Rochester, NY, Estados Unidos), fijadas en paraformaldehído al 4% que contenía 2% de sacarosa y cuando era necesario, permeabilizadas con regulador Hepes-Triton X 100 (Sigma). Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: anti-vimentina (Sigma), anti-citoqueratina (Biomed, Foster City CA), anti-E-Cadherina (Dakocytomation), alfa-actina de músculos lisos (αSMA) (Dakocytomation), anti-sinaptopodina (Progen Biotechnik, Heidelberg). Se usaron anticuerpos policlonales de conejo y policlonales de cerdo antinefrina (Progen Biotechnik) factor Anti-von Willebrand (vWF) (Dakocytomation), anti-Nestina (Chemicon International), anti-Pax-2 (Covance, Princeton, NJ), anti-Nanog, anti-Oct-4, anti-Musashi (AbCam, Cambridge, Science Park Cambridge Reino Unido), anti-podocina, Receptor 1 (AT1) anti-Angiotensina II (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). La omisión de los anticuerpos primarios o sustitución con IgG de conejo, rata o ratón no inmune se utilizó como control cuando fue apropiado. Se utilizaron IgG anticonejo o anticerdo Alexa Fluor 488 e IgG antirratón Texas Red (Molecular Probes, Leiden, Países Bajos) como Abs secundarios. Se llevó a cabo análisis por microscopía confocal utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM Modelo 5 Pascal (Carl Zeiss International, Alemania). Se agregó colorante Hoechst 33258 (Sigma) para tinción nuclear.

Resumen del perfil de expresión de marcadores

La Tabla 1 presenta un resumen del perfil de expresión de marcadores de las células madre mesenquimales

glomerulares humanas (hGL-MSC) de la invención.

Tabla 1

Marcador	hGL-MSC
CD133	Negativo
CD146	100%
CD90	100%
CD44	100%
CD29	100%
CD73	100%
CD105	100%
CD106	-
CD166	100%
CD45	Negativo
CD34	Negativo
CD31	Negativo
CD24	100%
SCA-1	-
Alfa-SMA	Negativo
Vimentina	100%
Citoqueratina	Negativo
Nestina	100%
Nanog	100%
Musashi	100%
Oct-4	Negativo
Pax-2	100%
MHC-1	100%
MHC-2	Negativo
CD80	Negativo
CD86	Negativo
CD40	Negativo

Estudios FISH

5 Se aislaron las hGL-MSCs de glomérulos de un riñón explantado de un donante masculino trasplantado en un receptor femenino. El paciente, una mujer de 45 años, recibió el trasplante de un injerto masculino. El injerto fue explantado después de nueve meses debido a la recurrencia de síndrome nefrítico severo resistente a terapia con diagnóstico por biopsia de glomeruloesclerosis focal.

10 Los cultivos en subconfluencia (70%) experimentaron un período de incubación durante la noche (16-18 horas) con Velbe, a una concentración final de 0.01 µg/ml. Las células fueron convertidas en pellas y la pella fue resuspendida en solución hipotónica (0.2 g de KCl+0.2 g de citrato de Na/100 ml). Después de una incubación a 37°C durante 20 minutos, las células fueron fijadas en metanol-ácido acético 3:1 y almacenadas durante 18 horas a -20°C. El cromosoma en metafase fue preparado dejando bordear aproximadamente 50 µl de suspensión en láminas de vidrio limpias y dejando secar al aire antes de la visualización utilizando microscopía de contraste.

15 Los estudios FISH fueron llevados a cabo utilizando sondas centroméricas comerciales de cromosomas X (verde) y Y (roja) y la sonda heterocromática satélite III clásica Y (Aquarius Cytocell, Cambridge, Reino Unido). Las sondas fueron preparadas y desnaturalizadas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las sondas preparadas fueron aplicadas sobre portaobjetos que contenían metafases y núcleos desnaturalizados (1.45 minutos en formamida al 70% /2x SSC a 70°C) bajo un cubreobjetos. La hibridación fue llevada a cabo durante la noche a 37°C. Luego los portaobjetos fueron lavados una vez en 0.4x SSC a 72°C durante 2 minutos seguido por un segundo lavado de 4x SSC+Tween 20 (Sigma) a temperatura ambiente durante 5-10 minutos. Los cromosomas y núcleos fueron contrateñidos con DAPI y montados en una solución antiturbidez. Las muestras fueron analizadas en cuanto a la identificación de núcleos y metafases masculinos (XY)/femeninos (XX) con una visualización microscópica directa (microscopio de epifluorescencia Nikon). Las imágenes fueron obtenidas utilizando el sistema de análisis de imágenes Cytovisión Cytogenetics.

Separación inmunomagnética, selección celular y clonación celular

25 Las células fueron separadas inmunomagnéticamente a partir de glomérulos desencapsulados frescos o de cultivos celulares en la segunda o tercera replicación. Después de la disección y replicación a través de una serie graduada de mallas, se dirigió la suspensión de glomérulos desencapsulados durante 8 minutos con colagenasa I (Sigma) y se aislaron las células CD133⁺ mediante selección celular magnética, utilizando el sistema MACS (Miltenyi Biotech).

30 Las células CD133⁺CD146⁺ y CD133⁺CD146⁻ a partir de la población que creció desde los glomérulos en la segunda y tercera replications de cultivo en el medio de expansión, fueron separadas por selección celular (MoFlo™, Dakocytomation) y ambas poblaciones fueron caracterizadas, cultivadas y clonadas mediante la siembra de una suspensión de células individuales en placas de 96 pozos por selección celular. Se analizaron el número, morfología y cinética de los clones resultantes, y algunos de ellos fueron seleccionados para ensayos de subclonación y diferenciación.

35 Diferenciación in vitro

Las capacidades de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica de las hGL-MSCs fueron determinadas como se describió plenamente [7].

40 En resumen, se cultivaron las hGL-MSCs con medio adipogénico (Lonza, Basilea Suiza) durante 3 semanas. Para evaluar la diferenciación, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente y se tiñeron con Oil Red O al 0.5% (Sigma) en metanol (Sigma) durante 20 minutos a temperatura ambiente.

45 La diferenciación osteogénica fue establecida cultivando las hGL-MSCs en medio osteogénico (Lonza). El medio fue cambiado dos veces a la semana durante 3 semanas. Para evaluar la diferenciación, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos y teñidas con rojo de Alizarina, pH 4.1 (Lonza) durante 20 minutos a temperatura ambiente.

50 Para la diferenciación condrogénica, se centrifugaron 2.5×10^5 de hGL-MSCs en un tubo de polipropileno cónico de 15 ml (Falcon BD Bioscience) a 150 g durante 5 minutos y se lavaron dos veces con DMEM. Las pellas fueron cultivadas en medio condrogénico (Lonza) suplementado con 10 ng/ml de Factor de Crecimiento Transformante β3 (Lonza). El medio fue cambiado cada 3 días durante 28 días. Las pellas fueron fijadas en paraformaldehído al 4% durante la noche, y las secciones embebidas en parafina fueron teñidas para glicosaminoglicanos utilizando safranina O al 0.1% (Sigma) y para proteoglicanos surfactados con azul alcian al 1%.

Se obtuvo la diferenciación celular endotelial cultivando las hGL-MSCs en la presencia de Medio Basal Endotelial (EBM) (Lonza) con factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, 10 ng/ml, Sigma) durante 3 semanas, como se describió previamente [17].

5 La diferenciación de podocitos obtenida cultivando las hGL-MSCs durante 3 semanas, en el medio de expansión más ácido todo transretinoico (ATRA, Sigma, 20 $\mu\text{mol/L}$) [18]. Las diferenciaciones fueron llevadas a cabo en los portaobjetos en cámara recubiertos con el colágeno tipo IV [19] (Sigma).

La diferenciación mesangial fue obtenida cultivando las hGL-MSCs durante 6 días, en DMEM con alta glucosa, en la presencia de FCS al 10%, TGF-beta 1 (2.5 ng/ml, Sigma) [20] y PDGFbb (5 ng/ml Sigma) [21]. Las diferenciaciones fueron llevadas a cabo en los portaobjetos de cámara recubiertos con fibronectina.

10 PCR en tiempo real

El PCR de transcripción reversa cuantitativo fue llevado a cabo como se describió previamente [22]. Se produjo ADNc de primera cadena a partir de ARN total utilizando el kit de transcripción reversa ADNc de Alta Capacidad (Applied Biosystems, Foster City, CA 94404, Estados Unidos). En resumen, se utilizaron 1 o 2 μg de ARNm, 2 μl de regulador RT, 0.8 μl de mezcla de dNTP, 2 μl de cebadores aleatorios RT, 1 μl de transcriptasa reversa MultiScribe y 15 4.2 μl de agua libre de nucleasa para cada síntesis de ADNc. Después de la transcripción reversa, se almacenó el ADNc a -20°C . La cuantificación relativa mediante PCR en tiempo real fue llevada a cabo utilizando la detección de verde SYBR de los productos de PCR en tiempo real utilizando un StepOne™ Real Time System (Applied Biosystems) de 48 pozos. Con el fin de llevar a cabo el PCR en tiempo real, se utilizaron los siguientes cebadores de oligonucleótidos específicos de la secuencia, todos adquiridos de MWG-Biotech AG, Ebersberg, Alemania: (i) los 20 cebadores de avance y reverso de nefrina humana divulgados en [22]; (ii) los cebadores de avance y reverso de PAX-2 humano divulgados en [1]; y (iii) los cebadores de avance y reverso de β -actina humana divulgados en [1]. Se adquirió la Power SYBR® Green PCR Master Mix de Applied Biosystems. Las condiciones de ciclización térmica fueron como sigue: Activación de AmpliTaq Gold® DNA Polymerase LD a 95°C durante 10 minutos, seguida por 45 ciclos de amplificación a 95°C durante 15 segundos y 60°C (para nefrina, pax2 y para β -actina) durante 1 minuto. 25 Para detectar la fase logarítmica de la amplificación, el nivel de fluorescencia (cuantificación del producto) fue determinado en cada ciclo. En el ciclo en el cual la fluorescencia alcanzó el umbral fue registrado, promediado entre triplicados, y normalizado al ciclo promedio del valor de umbral para la β -actina. El factor de cambio en la expresión con respecto al control fue calculado para todas las muestras.

Cocultivos de células MSC mononucleares de sangre periférica alogénicas

30 En cultivos de células mixtas modificados, se fraccionaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de voluntarios saludables sobre Histopaque-1077 (Sigma) y se utilizaron como células de respuesta y se utilizaron MSC alogénicas como células estimuladoras, como se describe [23, 24]. En resumen, se sembraron hGL-MSCs en triplicado sobre placas de 96 pozos a 5×10^3 células/ml en 100 μl de medio completo y se dejaron adherir al plástico durante 1 a 2 horas. Las PBMC fueron resuspendidas a 5×10^4 células/ml y fueron agregadas a pozos (100 μl de 35 volumen) que contenían o no GI-MSC, en la presencia del mitógeno fitohemaglutinina (PHA, Sigma) a la concentración final de 2.5 $\mu\text{g/ml}$. La relación de GI-MSC a PBMC fue de 1:10. Se usaron MSC humanas de BM como control. El cultivo fue mantenido durante 16-48 horas, después de este período se evaluó la proliferación de linfocitos en el cultivo.

40 La proliferación de células fue estudiada por síntesis de ADN, que fue detectado como la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) en el ADN celular utilizando un kit de ensayo inmunosorbente enlazado por enzima (Chemicon International) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los datos se presentan como valores de índice de estimulación (SI) calculados como se describe [23]. Los experimentos se llevaron a cabo 3 veces al menos para cada punto descrito.

Análisis estadístico

45 Los datos fueron presentados como la media \pm la desviación estándar a partir de 3 o más experimentos. El significado estadístico fue establecido por la prueba t de Student de 2 colas.

Estudios de localización *in vivo*

Los inventores también llevaron a cabo experimentos para definir la localización *in vivo*, en riñones humanos, de la 50 población de células madre de la invención. Los resultados se muestran en la figura 4. La presencia de células CD146 (positivas) y CD133 (negativas), coexpresando CD24 (positivas) en glomérulos, fue investigada por inmunofluorescencia. Como se muestra en la figura 4, las células CD146 (positivas) que se coexpresan en CD24 (positivas) fueron detectables en glomérulos (media $2.22 \pm 0.2/\text{glomérulo}$ $n=60$) y estas células fueron CD133 negativas. Además, la CD146 fueron expresadas dentro del penacho glomerular por células endoteliales; las células

CD133 (positivas) fueron observadas principalmente en la cápsula de Bowman.

Referencias

1. Bussolati B, Bruno S, Grange C, Buttiglieri S, Deregibus MC, Cantino D, Camussi G. Isolation of renal progenitor cells from adult human kidney. *Am J Pathol.* 2005; 166: 545-5.
- 5 2. Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, Lazzeri E, Liotta F, Frosali F, Ronconi E, Meini C, Gacci M, Squecco R, Carini M, Gesualdo L, Francini F, Maggi E, Annunziato F, Lasagni L, Serio M, Romagnani S, Romagnani P. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17: 2443-56.
- 10 3. Oliver JA, Maarouf O, Cheema FH, Martens TP, Al-Awqati Q. The renal papilla is a niche for adult kidney stem cells. *J Clin Invest.* 2004; 114: 795-804.
4. Maeshima A, Yamashita S, Nojima Y. Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2003; 14: 3138-46.
- 15 5. Gupta S, Verfaillie C, Chmielewski D, Kren S, Eidman K, Connaire J, Heremans Y, Lund T, Blackstad M, Jiang Y, Luttun A, Rosenberg ME. Isolation and characterization of kidney-derived stem cells. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17 :3028-40.
6. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all postnatal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006; 119 :2204-13.
7. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-7.
- 20 8. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science.* 1997; 276: 71-4.
9. Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, Maini RN. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res.* 2000; 2: 477-88.
10. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* 2001; 44: 1928-42.
- 25 11. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001; 7: 211-28.
12. Nöth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J. Orthop. Res.* 2002; 20: 1060-9.
- 30 13. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 13625-30.
14. Young HE, Steele TA, Bray RA, Hudson J, Floyd JA, Hawkins K, Thomas K, Austin T, Edwards C, Cuzzocort J, Duenzl M, Lucas PA, Black AC Jr. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat Rec.* 2001; 264: 51-62.
- 35 15. Sabatini F, Petecchia L, Taviani M, Jodon de Villeroché V, Rossi GA, Brouty-Boyé D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest.* 2005; 85: 962-71.
- 40 16. Lama VN, Smith L, Badri L, Flint A, Andrei AC, Murray S, Wang Z, Liao H, Toews GB, Krebsbach PH, Peters-Golden M, Pinsky DJ, Martinez FJ, Thannickal VJ. Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts. *J Clin Invest.* 2007; 117: 989-96. Rafii S, Lyden D, Benezra R. Vascular and haematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 826-35.
17. Vaughan MR, Pippin JW, Griffin SV, Krofft R, Fleet M, Haseley L, Shankland SJ. ATRA induces podocyte differentiation and alters nephrin and podocin expression in vitro and in vivo. *Kidney Int.* 2005; 68: 133-44.
18. Perry J, Tam S, Zheng K, Sado Y, Dobson H, Jefferson B, Jacobs R, Thorner PS. Type IV collagen induces

- podocytic features in bone marrow stromal stem cells in vitro. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17: 66-76.
19. Ross JJ, Hong Z, Willenbring B, Zeng L, Isenberg B, Lee EH, Reyes M, Keirstead SA, Weir EK, Tranquillo RT, Verfaillie CM. Cytokine-induced differentiation of multipotent adult progenitor cells into functional smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 2006; 16: 3139-49.
- 5 20. Suzuki A, Iwatani H, Ito T, Imai E, Okabe M, Nakamura H, Isaka Y, Yamato M, Hori M. Platelet-derived growth factor plays a critical role to convert bone marrow cells into glomerular mesangial-like cells. *Kidney Int.* 2004; 65: 15-24.
21. Collino F, Bussolati B, Gerbaudo E, Marozio L, Pelissetto S, Benedetto C, Camussi G. Pre-eclamptic sera induce nephrin shedding from podocytes through endothelin-1 release by endothelial glomerular cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008 Feb 20; [Epub ahead of print]
- 10 22. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002; 99: 3838-43.
23. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell response. *Blood* 2005; 105: 1815-22.
- 15 24. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells.* 2007; 25: 2739-49.
25. El-Helou V, Dupuis J, Proulx C, Drapeau J, Clement R, Gosselin H, Villeneuve L, Manganas L, Calderone A. Resident nestin+ neural-like cells and fibers are detected in normal and damaged rat myocardium. *Hypertension.* 2005; 46: 1219-25.
- 20 26. Mayer EJ, Carter DA, Ren Y, Hughes EH, Rice CM, Halfpenny CA, Scolding NJ, Dick AD. Neural progenitor cells from postmortem adult human retina. *Br J Ophthalmol.* 2005; 89: 102-6.
27. Herrera MB, Bruno S, Buttiglieri S, Tetta C, Gatti S, Deregibus MC, Bussolati B, Camussi G. Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. *Stem Cells.* 2006; 24:2840-50.
- 25 28. Hatano SY, Tada M, Kimura H, Yamaguchi S, Kono T, Nakano T, Suemori H, Nakatsuji N, Tada T. Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. *Mech Dev.* 2005;122:67-79.
29. Cavaleri F, Scholer HR. Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra. *Cell* 2003; 113: 551-2.
30. Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2005; 26: 495-502.
- 30 31. Potten CS, Booth C, Tudor GL, Booth D, Brady G, Hurley P, Ashton G, Clarke R, Sakakibara S, Okano H. Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker;musashi-1. *Differentiation.* 2003; 71 :28-41.
32. Sugiyama-Nakagiri Y, Akiyama M, Shibata S, Okano H, Shimizu H. Expression of RNA-binding protein Musashi in hair follicle development and hair cycle progression. *Am J Pathol.* 2006; 68: 80-92.
- 35 33. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol.* 2003; 31: 890-96.
34. Challen GA, Martinez G, Davis MJ, Taylor DF, Crowe M, Teasdale RD, Grimmond SM, Little MH. Identifying the molecular phenotype of renal progenitor cells. *J Am Soc Nephrol.* 2004; 15: 2344-57.
- 35 35. Oliver JA, Barasch J, Yang J, Herzlinger D, Al-Awqati Q. Metanephric mesenchyme contains embryonic renal stem cells. *Am J Physiol.* 2002; 283: F799-F809.
- 40 36. Kitamura S, Yamasaki Y, Kinomura M, Sugaya T, Sugiyama H, Maeshima Y, Makino H. Establishment and characterization of renal progenitor like cells from S3 segment of nephron in rat adult kidney. *FASEB J.* 2005; 19: 1789-97. 37. Challen GA, Bertonecello I, Deane JA, Ricardo SD, Little MH. Kidney side population reveals multilineage potential and renal functional capacity but also cellular heterogeneity. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17: 1896-1912.

38. Lazzeri E, Crescioli C, Ronconi E, Mazzinghi B, Sagrinati C, Netti GS, Angelotti ML, Parente E, Ballerini L, Cosmi L, Maggi L, Gesualdo L, Rotondi M, Annunziato F, Maggi E, Lasagni L, Serio M, Romagnani S, Vannelli GB, Romagnani P. Regenerative potential of embryonic renal multipotent progenitors in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18: 3128-3138.
- 5 39. Dekel B, Zangi L, Shezen E, Reich-Zeliger S, Eventov-Friedman S, Katchman H, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Rechavi G, Margalit R, Reisner Y. Isolation and characterization of nontubular sca-1+lin multipotent stem/progenitor cells from adult mouse kidney. *J Am Soc Nephrol.* 2006; 17: 3300-3314.
- 10 40. Hoogduijn MJ, Crop MJ, Peeters AM, Van Osch GJ, Balk AH, Ijzermans JN, Weimar W, Baan CC. Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. *Stem Cells Dev.* 2007; 16: 597-604.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una célula madre mesenquimal glomerular multipotente aislada de glomérulos de riñón humano adulto (hGL-MS), en donde dicha célula está caracterizada por los marcadores CD133 (negativas), CD146 (positivas), CD34 (negativas), CD105 (positivas), CD24 (positivas) y Pax-2 (positivas) y caracterizada adicionalmente por la capacidad de diferenciarse en al menos los siguientes tipos de células: podocitos, células endoteliales y células mesangiales.
2. La célula madre mesenquimal glomerular multipotente derivable de glomérulos de riñón humano adulto (hGL-MS) de acuerdo con la reivindicación 1, que es capaz adicionalmente de experimentar diferenciación osteogénica, adipogénica y condrogénica.
- 10 3. La célula madre mesenquimal glomerular multipotente derivable de glomérulos de riñón humano adulto (hGL-MS) de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, la cual es negativa para los marcadores α -SMA y Oct-4.
4. La célula madre mesenquimal glomerular multipotente derivable de glomérulos de riñón humano adulto (hGL-MS) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, la cual es negativa para el marcador CD45.
5. La célula madre mesenquimal glomerular multipotente derivable de glomérulos de riñón humano adulto (hGL-MS) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, la cual es negativa para el marcador CD31.
- 15 6. La célula madre mesenquimal glomerular multipotente derivable de glomérulos de riñón humano adulto (hGL-MS) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, la cual es positiva para un marcador de superficie característico de células madre mesenquimales seleccionado del grupo consistente de CD29, CD44, CD73, CD90, CD166 o cualquier combinación de los mismos.
- 20 7. Un método para preparar las células madre mesenquimales glomerulares multipotentes aisladas derivables de glomérulos de riñón humano adulto (hGL-MS) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende las siguientes etapas:
- 25 - cultivar glomérulos desencapsulados de riñón adulto humano en un medio de cultivo de expansión que comprende un medio de cultivo de células animales que contiene suero regulado a un pH fisiológico y en la ausencia de factores de crecimiento específicos, obteniendo de esta manera una población mixta de células que crecen a partir de los glomérulos desencapsulados cultivados, conteniendo dicha población mixta de células en forma de huso CD133 (negativas), células CD146 (positivas) y células CD133 (positivas), CD146 (positivas); y
- aislar las células en forma de huso CD133 (negativas), CD146 (positivas) de la población mixta, representando dichas células en forma de huso CD133 (negativas), CD146 (positivas) las células madre mesenquimales glomerulares multipotentes humanas deseadas derivables de glomérulos de riñón humano adulto (hGL-MS).
- 30 8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde las células en forma de huso CD133 (negativas), CD146 (positivas) son aisladas de al menos la 3ª replicación del cultivo de células.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 7 u 8, en donde las células CD133 (negativas), CD146 (positivas) son aisladas con base en su morfología en forma de huso.
- 35 10. El método de acuerdo con la reivindicaciones 7 u 8, en donde las células CD133 (negativas), CD146 (positivas) son aisladas por un método de selección celular.
11. La célula madre mesenquimal glomerular multipotente aislada derivable de glomérulos de riñón humano adulto (hGL-MS) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para uso como medicamento.
12. La célula madre mesenquimal glomerular multipotente aislada derivable de glomérulos de riñón humano adulto (hGL-MS) de acuerdo con la reivindicación 11, para uso en medicina regenerativa.
- 40 13. La célula madre mesenquimal glomerular multipotente aislada derivable de glomérulos de riñón humano adulto (hGL-MS) de acuerdo con la reivindicación 12, para uso en el tratamiento terapéutico de lesiones o enfermedades de riñón.
- 45 14. La célula madre mesenquimal glomerular multipotente aislada derivable de glomérulos de riñón humano adulto (hGL-MS) de acuerdo con la reivindicación 13, para uso en el tratamiento terapéutico de lesiones o enfermedades de glomérulos renales.
15. Una composición farmacéutica que comprende la célula madre mesenquimal glomerular humana aislada (hGL-

MSC) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un portador, diluyente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable.

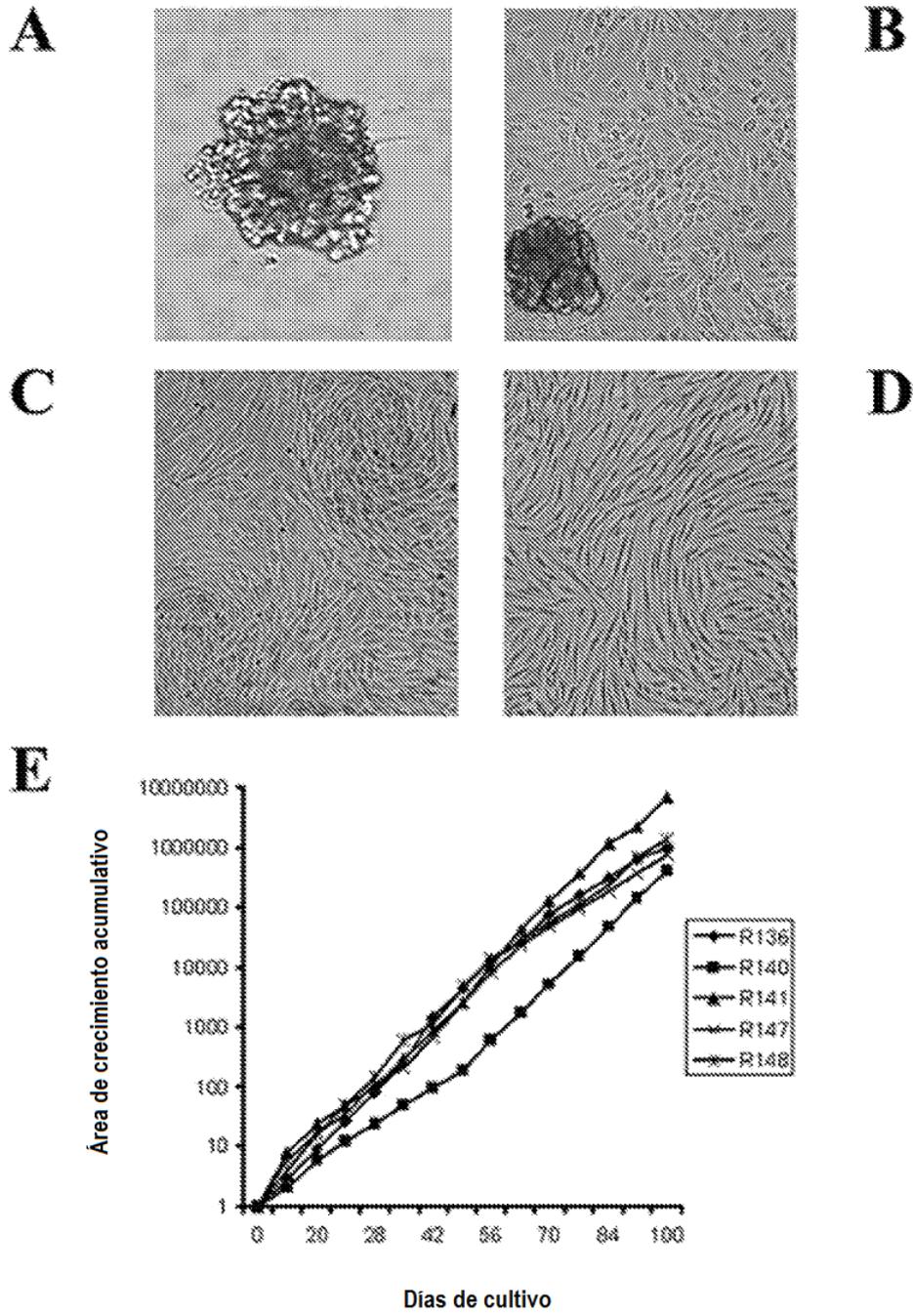
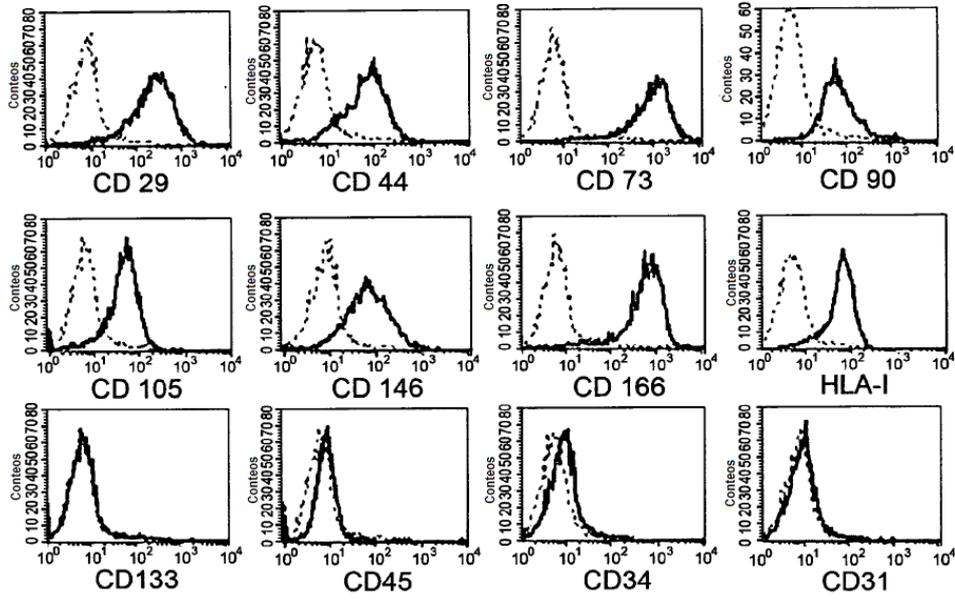


Fig. 1

A



B

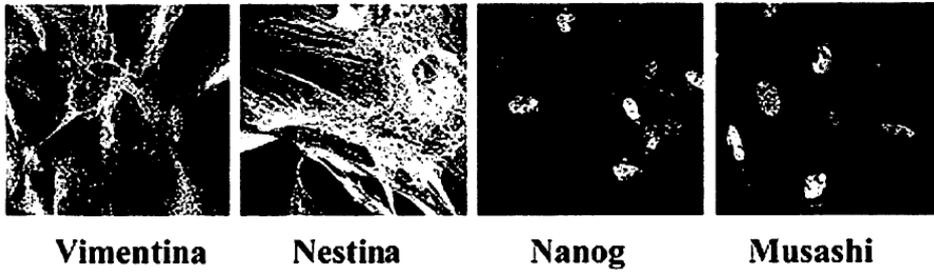


FIG.2

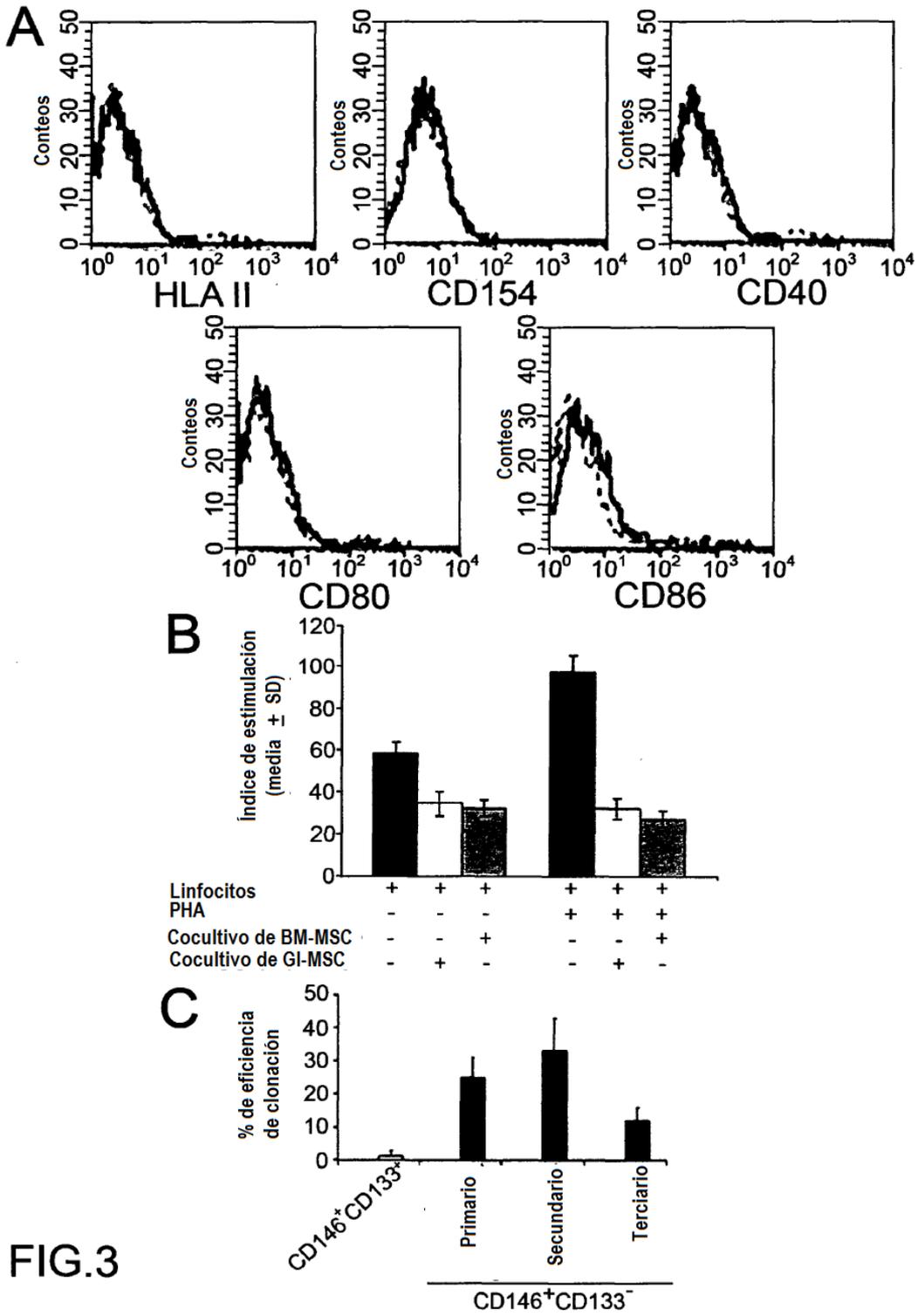


FIG.3

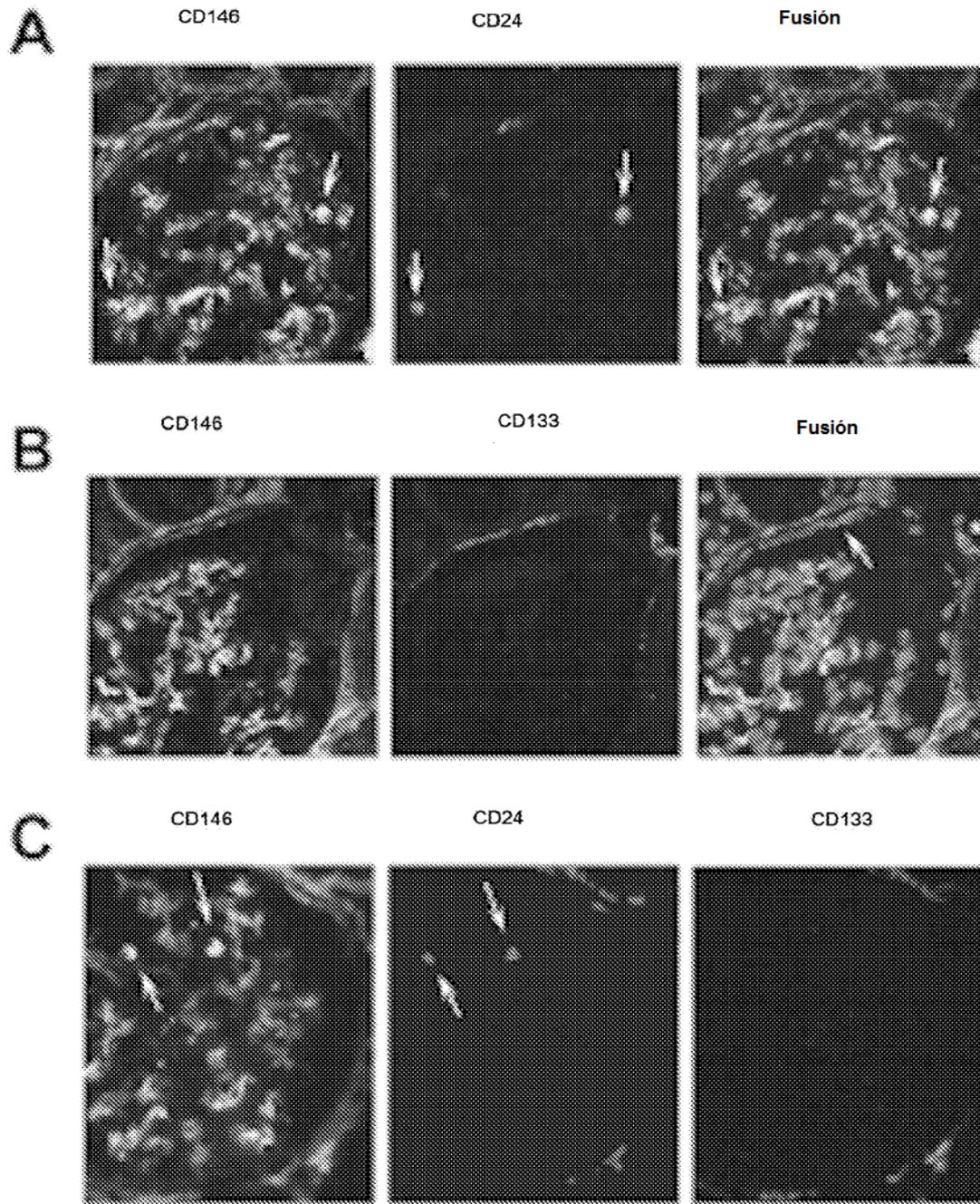


FIG.4