

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 918**

51 Int. Cl.:

C12N 5/071 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.05.2011 PCT/IL2011/000376**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.11.2011 WO11141914**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2011 E 11728406 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.04.2018 EP 2569417**

54 Título: **Poblaciones aisladas de células renales adultas y métodos para aislar y usar las mismas**

30 Prioridad:

02.05.2011 US 457613 P
13.05.2010 US 334206 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.06.2018

73 Titular/es:

**TEL HASHOMER MEDICAL RESEARCH
INFRASTRUCTURE AND SERVICES LTD. (50.0%)
The Chaim Sheba Medical Center, Tel HaShomer,
1 Emek Ha-Ela St.
5262160 Ramat Gan, IL y
RAMOT AT TEL-AVIV UNIVERSITY LTD. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DEKEL, BENJAMIN;
HARARI-STEINBERG, ORIT y
BUZHOR, ELLA**

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 672 918 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

Poblaciones aisladas de células renales adultas y métodos para aislar y usar las mismas

- 5 La presente invención se refiere a un nefroesferoide aislado que comprende células renales adultas humanas de acuerdo con la reivindicación 1, una población aislada de nefroesferoides para su uso en el tratamiento del daño renal de acuerdo con la reivindicación 3 y un cultivo celular de acuerdo con la reivindicación 4.

10 El riñón es un órgano vital en los mamíferos, responsable de la homeostasis de los fluidos, la excreción de desechos y la producción de hormonas. Existe una diversidad de posibles lesiones y trastornos incluyendo cáncer, traumatismo, infección, inflamación y lesiones iatrogénicas o afecciones que pueden conducir a enfermedades crónicas o causar la reducción o la pérdida de la función de un riñón. La incidencia de la enfermedad renal crónica en Estados Unidos ha alcanzado proporciones epidémicas, y un número significativo de estos pacientes desarrollará enfermedad renal en etapa terminal (ESRD), con tasas de filtración glomerular demasiado bajas para mantener la vida. La diálisis es la principal modalidad de tratamiento para la ESRD, pero tiene limitaciones significativas en términos de morbilidad, mortalidad y coste. El trasplante alogénico de riñón proporciona beneficios significativos en términos de mortalidad y, en última instancia, es menos costoso, pero se ve obstaculizado por una grave escasez de órganos de donantes disponibles. La insuficiencia renal aguda (ARF) también es bastante común, con una tasa de mortalidad que varía del 20 al 70 %. Por una serie de razones, incluida la atención agresiva de una población de 15 20 pacientes mayores, la tasa de mortalidad por ARF no ha cambiado en los últimos 20 años a pesar de los avances en tecnología y terapias.

Aunque la enfermedad renal tiene una diversidad de tipos individuales, parecen converger en unas pocas vías de progresión de la enfermedad. La unidad funcional del riñón es la nefrona. Hay una disminución en el funcionamiento de las nefronas con la progresión de la enfermedad; las nefronas restantes se someten a más estrés para 25 compensar la pérdida funcional, aumentando de este modo la probabilidad de una mayor pérdida de nefronas y creando así un círculo vicioso. Además, a diferencia de los tejidos tales como los epitelios óseos o glandulares que retienen una capacidad significativa para la regeneración, generalmente se cree que las nuevas unidades de nefronas no se producen después del nacimiento, que la capacidad de los tejidos y estructuras altamente diferenciadas de los riñones tienen poderes reparativos limitados y, por lo tanto, que los mamíferos poseen varias 30 unidades de nefronas que solo pueden disminuir durante la vida postnatal. Existe un interés creciente en el desarrollo de nuevas terapias para la enfermedad renal, incluidos los órganos artificiales, la ingeniería genética y la terapia celular.

35 Se considera que muchos tejidos adultos albergan células que se renuevan espontáneamente y se diferencian para formar clones de células madre, progenitoras y maduras del órgano, que se ajustan a los criterios de las células madre multipotenciales específicas de tejido, incluida la piel, el sistema hematopoyético, y el intestino. A diferencia de estos órganos de ciclo rápido, el riñón tiene una baja tasa de renovación celular en condiciones de estado estable y su capacidad regenerativa es limitada. Las células madre específicas de tejido extrarrenal, incluidas las de la 40 médula ósea, no tienen potencial nefrogénico, lo que motiva la búsqueda de una célula madre de riñón adulta. Hasta la fecha, no hay pruebas definitivas de la existencia en el riñón adulto de una célula que se ajuste a esta definición, y sea capaz de autorrenovarse y diferenciarse en los tipos de células de la nefrona, por un lado, y por otro lado, de localizarse en sitios de lesión, contribuyendo de este modo a la reparación renal.

45 La población autorrenovadora de progenitores de nefronas que reside en el mesénquima metanéfrico (MM), y más específicamente en el mesénquima condensado (CM), se agota por completo con la finalización de la nefrogénesis (semana gestacional 34^a en seres humanos, 2 semanas postnatales en ratones) y por lo tanto, no existe una población progenitora con potencial nefrogénico similar al MM/CM en el riñón adulto (6, 7). Sin embargo, puede existir una población con un potencial más restringido que el CM (por ejemplo, un tipo de célula progenitora para 50 células tubulares proximales). Es probable que este tipo de célula surja del compartimento tubular epitelial, ya que Humphreys et al (8) demostraron mediante rastreo de linaje que las células responsables de la repoblación tubular después de la isquemia renal son de origen tubular, excluyendo de este modo una fuente extra-tubular.

Los estudios murinos han esclarecido marcadores tempranos que especifican la población de progenitores renales 55 epiteliales que incluyen una combinación única de factores de transcripción tales como parálogos *Hox11*, *Osr1*, *Pax2*, *Eya1*, *Wt1*, *Sall1*, *Six2*, y *Cited1* (9). Estos marcadores de progenitores renales tempranos han demostrado en su mayoría que disminuyen con el cese de la nefrogénesis tanto en riñones murinos (6) como humanos (7).

La Solicitud internacional PCT IL2010/000158 indica el aislamiento y la caracterización de células progenitoras

renales fetales.

Bussolati et al [American Journal of Pathology. 2005; 166: 545-555] indican el aislamiento y la caracterización de células CD133+ derivadas de riñón humano adulto normal y sugiere que esta población celular representa una población de células madre residentes adultas multipotentes que puede contribuir a la reparación de la lesión renal.

PODE-SHAKKED NAOMI ET AL, se refieren a "Developmental tumorigenesis: NCAM as a putative marker for the malignant renal stem/progenitor cell population", JOURNAL OF CELLULAR AND MOLECULAR MEDICINE, UNIVERSITY PRESS CAROL DAVILA, BUCHAREST, RO, vol. 13, n.º 8B, páginas 1792-1808, (20081216).

Zhong Y et al se refieren a "spheres derived from the human SK-RC-42 renal cell carcinoma cell line enriched in cancer cells", cancer letters, Nueva York, NY, US, vol. 299, n.º 2, 28.12.2010, páginas 150-160.

Markovic-Lipkovski Jasmina et al se refieren a "neural cell adhesion molecule expression on renal interstitial cells" nephrology dialysis transplantation, oxford university press, Gb, vol. 22, n.º 6, 1 de junio de 2007, páginas 1558-1566.

LUSIS M ET AL se refieren a "Isolation of clonogenic, long-term self renewing embryonic renal stem cells", STEM CELL RESEARCH, ELSEVIER, NL, vol. 5, n.º 1, páginas 23 - 39.

LIU X M ET AL, se refieren a "Suspended aggregates as an immobilization mode for high-density perfusion culture of HEK 293 cells in a stirred tank bioreactor", APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER, BERLÍN, DE, vol. 72, n.º 6, páginas 1144 - 1151.

25 RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un nefroesferoide aislado que comprende células renales adultas humanas, siendo dicho nefroesferoide capaz de generar túbulos distales proximales y conductos colectores cuando se permite diferenciar *in vivo* después del injerto a la membrana corioalantoidea (CAM) del embrión de pollo, en el que dicho nefroesferoide aislado se puede obtener cultivando células renales adultas humanas en medio libre de suero (SFM) y las condiciones de baja adhesión indican que dicho nefroesferoide se caracteriza por la expresión mejorada de al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en sal1, pax2, six2 y WT1 en comparación con dichas células de riñón adultas cultivadas en condiciones adherentes.

Preferiblemente, el nefroesferoide aislado se caracteriza por una expresión mejorada de cada uno de sal1, pax2, six2 y WT1 en comparación con dichas células de riñón adulto cultivadas en condiciones de adherencia.

La presente invención también se refiere a una población aislada de nefroesferoides para su uso en el tratamiento del daño renal, comprendiendo dichos nefroesferoides células renales adultas humanas.

La presente invención se refiere aún a un cultivo celular que comprende un medio de cultivo y una población aislada de nefroesferoides.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Algunos aspectos de la descripción se describen en el presente documento, a modo de ejemplo solamente, con referencia a los dibujos e imágenes que se adjuntan. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se destaca que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y para propósitos de análisis ilustrativo de aspectos de la descripción. A este respecto, la descripción tomada con los dibujos hace evidente para los expertos en la técnica cómo pueden ponerse en práctica los aspectos de la divulgación.

En los dibujos:

La Figura 1 es un diagrama del diseño experimental para determinar las condiciones de cultivo para el aislamiento de células progenitoras renales adultas. Se recogieron tejidos renales adultos de pacientes nefrectomizados debido a tumores renales localizados. Los tejidos se digirieron en una suspensión de células individuales. Las células se cultivaron utilizando medios que contenían suero (SCM) o medios sin suero (SFM). Tras recibir un cultivo adherente confluyente (después de aproximadamente 7 días), las células se recogieron y se sometieron a diluciones límite, extracción de ARN, formación de esferas y ensayos de

cultivo adherente continuo. FKCM: medios acondicionados de riñón fetal, DL - Dilución límite.

Las Figuras 2A-F son fotografías que ilustran el patrón de crecimiento de las células hAK en dos medios de crecimiento diferentes: SCM y SFM. Después de un día en cultivo, solo unas pocas células se adherieron, unos días después estas células comenzaron a expandirse, demostrando un patrón diferente de expansión; en la expansión de SFM fue concéntrica y definida, mientras que en el SCM, la expansión fue de una manera menos organizada.

Las Figuras 3A-J son fotografías que ilustran las características del cultivo de células renales adultas. En cultivos de bajo pase (pase 1) hay un predominio de células tubulares proximales, indicadas por tinción con LTA y una minoría de células del conducto colector, indicadas mediante tinción con DBA. Mientras las hKEpC tiñen positivamente los marcadores, se observa tinción negativa en fibroblastos de prepucio humano (HFF). Como era de esperar, las células epiteliales tubulares proximales renales (RPTEC) se tiñen exclusivamente LTA. Las células teñidas positivamente son verdes. Los núcleos se tiñen con DAPI (azul).

Las Figuras 4A-F son fotografías que ilustran las características del cultivo de células renales adultas en los pases P3-P5. Las células tiñen positivamente ambos marcadores a lo largo de los pases representados. Los núcleos se tiñen con DAPI (azul).

Las Figuras 5A-E son gráficos de barras que ilustran los resultados del análisis de qRT-PCR de genes troncales/progenitores renales (SAL1, SIX2, WT1 y PAX2) y el gen de pluripotencia Nanog en cultivos de hKEpC expandidos de SCM y SFM de los pases P0-P2. Los valores para el cultivo monocapa de SCM P1 se requieren para la normalización (por lo tanto, igual a 1) y todos los demás valores se calcularon con respecto a ellos. Los resultados se presentan como la media +/- DESV.EST. de 3 experimentos separados usando células de diferentes donantes.

Las Figuras 6A-D son gráficos y fotografías que ilustran la formación de esferoides de hKEpC. (Figuras 6A y B) Micrografías representativas de la morfología esferoide p2 y p6 (Sph P2 y Sph P6, respectivamente) obtenidas a partir del mismo origen de hKEpC. Mientras que los esferoides P2 están menos organizados, los esferoides P6 están más condensados, bien organizados y demuestran la verdadera morfología de la esfera. (Figuras 6C y D) Representación cuantitativa de la formación de esferoides P2 frente a P6 a partir de 2×10^4 células/2 ml. La Figura 6C representa el número de esferoides formado, que muestra una formación de esferoides significativamente más alta en P6. La Figura 6D representa el número de esferoides formados de acuerdo con el tamaño del esferoide, mostrando que los esferoides de tamaño pequeño (menos de $15 \mu\text{m}$), en lugar de los más grandes (más de $15 \mu\text{m}$), contribuyen predominantemente a la diferencia numérica entre los esferoides P2 y P6 (representados en la Figura 6C). Los gráficos representan los valores medios de los triplicados de 3 donantes de tejidos diferentes.

La Figura 7 son fotografías que ilustran la caracterización del origen esferoide de hKEpC. Las células hKEpC cultivadas como una monocapa se infectaron por vectores basados en lentivirus, que llevan el gen para la proteína verde fluorescente (GFP, verde) o m-cherry (rojo). Las células fluorescentes se mezclaron en una relación exacta de 1:1 y se sometieron a condiciones de baja adhesión para permitir la formación de esferoides. Panel superior: Formación de esferoides después de 7 días en cultivo (X20). Panel inferior: Formación de esferoides después de 6 semanas en cultivo (X10). Las imágenes se tomaron por el microscopio Nikon Eclipse TS100, muestran una abundante expresión de m-cherry7 y parte de GFP, indicación de que al menos se había producido alguna agregación celular.

Las Figuras 8A-J son fotografías y gráficos que ilustran que las condiciones de baja adhesión inducen una mayor expresión de genes progenitores renales. Figuras 8A-B. Estructuras de tipo esferoide formadas en las condiciones de baja adhesión de las células hAK. Figura 8C. Cultura de hAK adherente; Figura 8D. El análisis por RT-PCR de cuantificación relativa muestra una mayor expresión de genes progenitores nanog y de riñón fetal en las condiciones de baja adhesión (originadas a partir del adherente cultivado en SCM) en comparación con el cultivo adherente de las células hAK p1 en SCM. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,05$ después de la transformación logarítmica; Figura 8E-H. El análisis por RT-PCR de cuantificación relativa muestra que los esferoides generados a partir del cultivo adherente cultivado en SFM tienen una mayor expresión de genes progenitores en relación con el cultivo adherente de células hAK tanto en SFM como en SCM. Media de 3 experimentos diferentes en 3 tejidos de hAK diferentes. Figura 8I. Los niveles de transcripción elevados de Gpc3, en células esferoides P1 (generadas después de la expansión como una monocapa en SCM) en comparación con el cultivo monocapa de P1 se expandieron en SCM. P es menor de 0,05 después de la transformación logarítmica. Figura 8J. Los genes elevados progenitores y de pluripotencia transcriben los niveles de células esferoides P6 (generadas después de la expansión como una monocapa en SCM) en comparación con el cultivo monocapa P6 expandido en SCM. SCM - Medio que contiene suero. SFM - Medio libre suero.

La Figura 9A es un gráfico de barras que ilustra la expresión del marcador de superficie y la actividad de ALDH en esferoides frente al cultivo adherente. Los esferoides han aumentado la actividad de ALDH en comparación con el cultivo adherente de las células hAK. Los marcadores epiteliales (EpCAM, CD24), de

células mesenquimales (CD44) y CD133 no se diferencian en ambas condiciones de cultivo.

La Figura 9B son fotografías de microscopía de lapso de tiempo de la formación de esferoides. La suspensión de hKEpC se sembró en las placas prerrecubiertas con PolyHEMA. Las micrográficas se tomaron por el microscopio CSN 410 Zeiss (x10) con intervalos de 3 minutos. Los planos superior e inferior muestran dos eventos representativos de colisiones celulares y agregación celular en el proceso de formación de esferoides.

La Figura 9C son gráficos de puntos representativos que muestran una actividad de ALDH1 potenciada en los esferoides en comparación con el cultivo monocapa. La actividad enzimática de ALDH1 se detectó usando el ensayo ALDEFLUOR. Se usó DEAB para inhibir la reacción de ALDH con el reactivo ALDEFLUOR, proporcionando un control negativo.

Las Figuras 10A-C ilustran los resultados del análisis de micromatrices de esferoides de hKEpC frente a células monocapa procedentes de 3 donantes adultos de riñón (AK). (A) La agrupación jerárquica no supervisada separó las muestras en dos grupos diferentes: esferoides y equivalentes monocapa; (B) Agrupación jerárquica de genes expresados diferencialmente. Genes que estaban resultados positivamente (477 genes) o regulados negativamente (348 genes) en esferoides (Sph AK1-3) al menos dos veces en comparación con sus equivalentes de cultivo monocapa (Mono AK1-3); (C) Diagrama de bosque de los grupos de genes de procesos celulares que representan el porcentaje de genes regulados positivamente (rojo) y negativamente (verde).

Las Figuras 11A-B ilustran la caracterización y proliferación de esferoides de hKEpC. La Figura 11A es una fotografía que ilustra la tinción con hematoxilina y eosina de esferoides incluidos en parafina. La Figura 11B es una fotografía que ilustra el análisis de inmunofluorescencia de NCAM y Ki67 de los esferoides. Los esferoides incluidos en parafina se tiñeron con NCAM (verde), Ki67 (rojo) y Hecht (azul). Se observó una baja proliferación como se evidencia a partir de la baja tinción de Ki67. Además, se observó una baja tinción de NCAM de acuerdo con el análisis FACS.

Las Figuras 12A-C son gráficos que ilustran la dilución limitante de células cultivadas hAK primarias en diferentes condiciones de medio. Los gráficos representan 3 experimentos diferentes en 3 tejidos de hAK diferentes. Las hAK sembradas en una densidad de 5 y 1 célula por pocillo tienen mayor capacidad clonogénica en SCM en comparación con SFM. El mayor potencial clonogénico se observó con FKCM. (SCM = medio que contiene suero, FKCM = medio acondicionado de riñón fetal (que contiene suero), SFM = medio libre de suero, SFM de SCM = clones originados en SFM después de que se expandió el cultivo en SCM).

Las Figuras 13A-D son fotomicrográficas que ilustran la morfología del clon. SCM y FKCM - clones originados a partir de 1 célula/pocillo, SFM - clones originados a partir de 5 células/pocillo. Los clones de FKCM fueron más viables y confluyentes en comparación con SCM.

Las Figuras 14A-C son gráficos que ilustran la clasificación FACS de células hAK que expresan NCAM1.

Las Figuras 15A-E son gráficos de barras que comparan la expresión génica entre fracciones de células NCAM1+ y NCAM1 mediante análisis de RT-PCR cuantitativa. Las células hAK cultivadas clasificadas de acuerdo con NCAM1 sobreexpresan los genes "troncales" renales: (a) genes progenitores del epitelio renal, wt1, pax2, six2 (también se encontró que Osr1 estaba significativamente regulado positivamente, datos no mostrados); (b) Marcadores de la ruta Wnt y de superficie de progenitor renal, CTNNB1, FZD7, NCAM1 y ACTR2b; (c) grupo polycomb, EZH2. Además, el análisis de genes de pluripotencia (d) mostró niveles más altos de Oct4, mientras que el análisis de genes de maduración renal (e) mostró alto contenido de vimentina y aminopeptidasa A (ENPEP) y bajo contenido de E-cadherina y co-transportador de Na-Cl (NCCT), revelando un origen tubular proximal. Los valores representan promedio \pm DE de al menos 3 experimentos diferentes en 3 hAK diferentes. *, p <0,05; **, p <0,005. Aqp1 y 3 estaban cerca de la significancia estadística.

Las Figuras 16A-C son gráficos de barras que ilustran el potencial clonogénico de las células hAK NCAM+. Las células de la fracción tanto positiva como negativa se pusieron en placas a 1 y 5 células por dilución de pocillo. Las células NCAM+ muestran un alto potencial clonogénico en todas las concentraciones. Los gráficos representan tres experimentos que se originan a partir de tres tejidos hAK diferentes.

La Figura 16D es un gráfico que ilustra los resultados de un ensayo de proliferación de MTS realizado en células hAK clasificadas de acuerdo con NCAM1. Las fracciones de células tanto positivas como negativas se analizaron 4, 5 y 7 días después de la clasificación. Las células NCAM+ mostraron una menor capacidad de proliferación. Gráfico representativo de tres experimentos, los datos representan la media de triplicados. *, p <0,05.

Las Figuras 16E-J son fotomicrográficas que ilustran los resultados de un ensayo de formación de esferoides realizado en fracciones de NCAM+ y NCAM- clasificadas a partir de cultivos de pase bajo y expandidas *in vitro*. Las células NCAM+ muestran la capacidad de formar esferoides bien definidos, a diferencia de las células NCAM-, que carecen de esa capacidad, después de 7 días en condiciones de baja adhesión.

Las Figuras 17A-K son fotografías que ilustran los resultados de un análisis *in vivo* de hKEpC esferoides y monocapa en el embrión de pollo. Se injertaron $0,43 \times 10^6$ células derivadas de esferoides disociados y monocapa en la CAM. Figuras 9A-B. Injertos de CAM (cabezas de flecha) generados a partir de (A) esferoides y (B) células monocapa, 7 días después del injerto. Fotomicrografías representativas de la tinción H&E de injertos: injertos originados de cultivos P2 de esferoides (C), monocapa (D) y de cultivos P6 de esferoides (E) y células monocapa (F), (G) esferoides completos (P2) (x20) que demuestran la formación extensiva de túbulos exclusivamente por esferoides de hKEpC. Los injertos procedentes de (H) células madre mesenquimales (MSC) y (I) línea de células embrionarias de riñón humano (HEK293) usadas como controles, no generaron túbulos (x10). Los injertos de control de células de riñón fetal humano (FK) que se originaron a partir de $1,25 \times 10^6$ células (J) no formaron túbulos (x10), mientras que $2,5 \times 10^6$ células (K) generaron túbulos (marcados con flechas) (x20).

Las Figuras 18A-D son fotomicrografías que ilustran que los esferoides de hKEpC P2 generan túbulos específicos de segmento. Tinción de inmunoperoxidasa (marrón) de (x20 cabezas de flecha) para marcadores específicos de segmento (18A) LTA, (18B) glucoproteína anti-Tamm horsfall (THG) y (18C) DBA. Figura 18D: Núcleos de tinción de DBA inmunofluorescente (rojo) contrateñidos con Hoechst (azul). Aumento original x20.

Las Figuras 19A-C son fotomicrografías de tinción de inmunoperoxidasa (marrón) de (x20 cabezas de flecha) para marcadores específicos de segmento (19A) LTA, (19B) THG y (C) DBA. Aumento original x20.

Las Figuras 20A-F son fotografías que ilustran los resultados de un ensayo de tubulogénesis *in vivo*. A. Imagen de un explante de células hAK 7 días después del injerto. El injerto se realizó en matrigel B. Fluorescencia del explante (las células se marcaron con CFSE antes del injerto permitiendo la detección de una señal fluorescente). El análisis histológico de injertos de 7 días (H&E) reveló regeneración tubular en bajos números de células ($0,43 \times 10^6$ células/huevo) solo cuando se injertaron esferoides de hAK disociados (C) o células hAK NCAM+ (D). Las estructuras tubulares se destacan en recuadros. Un número de células similar de células hAK cultivadas adherentes no generó estructuras tubulares (E). Las HEK 293 de control (F) o las células madre mesenquimales (no mostradas) no generaron estructuras tubulares y permanecieron como masas indiferenciadas.

DESCRIPCIÓN DE ASPECTOS ESPECÍFICOS DE LA INVENCION

La presente descripción, en algunos aspectos de la misma, se refiere a poblaciones aisladas de células renales adultas y a métodos de aislamiento y uso de las mismas.

Antes de explicar al menos un aspecto de la descripción en detalle, debe entenderse que la descripción no está necesariamente limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ilustrados por los Ejemplos. La descripción es capaz de otros aspectos o de ponerse en práctica o realizarse de diversas maneras.

La insuficiencia renal, ya sea que surja de una disminución aguda o crónica de la función renal, es una afección grave que puede dar como resultado un fallo sustancial o completo de las funciones de filtración, reabsorción, endocrinas y homeostáticas del riñón. Por lo tanto, es deseable obtener células madre o progenitoras capaces de desarrollar células renales que podrían sustituir algunas o todas las funciones del riñón.

Las células madre/progenitoras de riñón adulto humano (hAK) son candidatas ideales para el trasplante celular y la ingeniería tisular. Sin embargo, su identidad sigue siendo esquiva.

Esto no elimina la posibilidad de usar poblaciones expandidas de células renales adultas como terapias a base de células para ingeniería de tejidos y medicina regenerativa destinadas a mejorar y restaurar la función renal. El enfoque autólogo requiere el aislamiento de las células renales de una pequeña muestra de tejido humano, la expansión *in vitro* y la reintroducción de las células de nuevo en el huésped para la regeneración del tejido renal. Sin embargo, los epitelios renales primarios pierden su polaridad apical-basal, que se caracteriza por una morfología aplanada y alargada y falta de uniones estrechas, comienzan a proliferar y desdiferenciarse a través de mecanismos tales como la transición epitelial-mesenquimal (EMT) después de un número limitado de pasajes en monocapa. A medida que aumenta el número de células, las células asumen la apariencia de fibroblastos. Por lo tanto, la formación de estructuras renales puede no alcanzarse de manera adecuada mediante el uso de células renales individuales y la manipulación apropiada de las células renales en cultivo puede mejorar sus capacidades funcionales.

Las estructuras esféricas son globos multicelulares que se desarrollan a partir de células que sobreviven a condiciones independientes de anclaje *in vitro*, tales como el crecimiento en placas de adhesión ultra baja. A

diferencia de los cultivos a base de monocapas, estas estructuras tienen la ventaja de reflejar el contexto celular tridimensional. Además, se ha demostrado que los ensayos de formación de esferas son un medio útil para el mantenimiento y la expansión de supuestas poblaciones de células madre/progenitoras.

5 Por lo tanto, el presente inventor trató de investigar por primera vez las células de riñón humano primario cultivadas en cultivo en suspensión sobre superficies de plástico no adherentes en oposición a las células expandidas en monocapa. Para lograr este objetivo, el presente inventor aisló células renales humanas primarias de muestras de riñón quirúrgicas, estableció cultivos heterogéneos de células epiteliales de riñón humano (hKEpC) y demostró su capacidad para generar de manera eficiente agregados o esferoides tridimensionales.

10 Se descubrió que el uso de medio libre de suero (SFM) y las posteriores condiciones de baja adhesión conducen a la formación de "nefroesferoides". Las células epiteliales presentes en los nefroesferoides expresaron niveles mejorados de genes progenitores y "troncales" incluyendo *Pax2*, *Sall1*, *Six2*, *Wt1* y también el gen de pluripotencia, *Nanog*, en comparación con el cultivo adherente (Figuras 8E-H).

15 Además, los presentes inventores han identificado un marcador de progenitor de la superficie celular (NCAM) en un riñón adulto humano cultivado que proporciona una firma para el aislamiento de células madre/progenitoras renales. La identificación de este marcador fue muy sorprendente considerando que no se expresa *in vivo* en el riñón adulto.

20 El presente inventor demostró que las células renales adultas enriquecidas con NCAM⁺ sobreexpresaron marcadores de progenitores epiteliales renales tempranos (*Six2*, *Osr1*, *Sall1*, *Pax2* y *Wt1*) y antígenos de superficie tempranos (*FZD7*, *AVR2b*) (11), el grupo polycomb (*Bmi-1*, *Ezh2*), la ruta Wnt (*Beta-catenina*, *FZD7*), así como el marcador de pluripotencia, *Oct4* (Figuras 9A-E), que indica la presencia de células madre/progenitoras. La subpoblación NCAM⁺ era altamente clonogénica (Figuras 16A-C) y además comprendía capacidades generadoras de esferas (Figuras 16E-J), lo que indicaba además la presencia de células madre/progenitoras.

Mientras se reduce aún más la presente descripción a la práctica, el presente inventor demostró que tanto las células formadoras de esferoides como las NCAM⁺ regeneraban eficazmente las estructuras tubulares al injertarse en el embrión de pollo (Figuras 17A-C).

30 Estos resultados proporcionan un enfoque factible para la clasificación celular experimental de progenitores renales humanos adultos, así como un marco para desarrollar estrategias de selección celular para terapias a base de células renales.

35 Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente descripción, se proporciona una población celular aislada de células de riñón adultas humanas, que comprende al menos el 50 %, 60 %, 70 % 80 % o el 90 % de tallo renal adulto que tiene una firma NCAM⁺.

40 Como se usa en el presente documento, el término "aislado" significa que una población celular se elimina de su entorno natural. Como se usa en el presente documento, el término "purificado" significa que una población celular está esencialmente libre de cualquier otro tipo de célula (por ejemplo, fibroblastos de alimentación).

45 Como se usa en el presente documento, la frase "célula madre renal" se refiere a una célula que no se diferencia terminalmente como una célula renal pero que tiene la capacidad de diferenciarse en una célula especializada que tiene uno o más aspectos estructurales y/o funcionales de un riñón fisiológico. De acuerdo con aspectos específicos, las células madre renales no son células madre embrionarias.

De acuerdo con un aspecto ejemplar, al menos el 50 %, 60 %, 70 % 80 % o el 90 % de las células madre renales tienen una forma NCAM⁺ CD 133+.

50 De acuerdo con otro aspecto, al menos el 50 %, 60 %, 70 % 80 % o el 90 % de las células madre renales tienen una firma NCAM⁺ CD 133-.

De acuerdo con otro aspecto, al menos el 50 %, 60 %, 70 % 80 % o el 90 % de las células madre renales tienen una firma NCAM⁺ CD24+.

55 De acuerdo con otro aspecto, al menos el 50 %, 60 %, 70 % 80 % o el 90 % de las células madre renales tienen una firma NCAM⁺ CD24-.

De acuerdo con otro aspecto, al menos el 50 %, 60 %, 70 % 80 % o el 90 % de las células madre renales tienen una firma NCAM+ nestina+.

De acuerdo con otro aspecto, al menos el 50 %, 60 %, 70 % 80 % o el 90 % de las células madre renales tienen una firma NCAM+ nestina-.

Las poblaciones NCAM+ de la presente descripción comprenden adicionalmente un perfil de expresión génica como se proporciona en las Figuras 15A-E. El ensayo de la expresión de cualquiera de los genes del perfil de expresión proporcionado se puede usar para calificar las células de la firma NCAM+, como se describe adicionalmente a continuación en el presente documento.

La presente descripción proporciona además un método para aislar las células mencionadas anteriormente. Esto se realiza enriqueciendo una subpoblación de células renales de un tejido renal adulto humano, teniendo la subpoblación de células renales una firma NCAM+.

Por lo tanto, se proporciona un riñón adulto humano. El riñón puede comprender un riñón completo o fragmentos del mismo (por ejemplo, cápsula renal). Típicamente, las células del riñón adulto son de una población heterogénea.

Las células del riñón adulto se pueden dispersar antes de la selección. Los agentes ejemplares que pueden usarse para dispersar las células de riñón incluyen colagenasa, dispasa y tripsina.

De acuerdo con un aspecto, las células del riñón adulto se expanden antes de la clasificación. Típicamente, las células se cultivan durante menos de tres pases, más preferiblemente durante menos de dos pases.

A continuación hay una lista de algunos de los marcadores ejemplares de la presente descripción con sus números de acceso.

NCAM1 (3 variantes): NM_181351, NM_000615, NM_001076682; FZD7: NM_003507; CD24: NM_013230; CD133 (PROM1): NM_006017; NTRK2: AF410902; PSA-NCAM, NCAM1 polisialilado misma ID que NCAM1; ACVR1IB: NM_001106; ROR2 (2 variantes): M97639 NM_004560; oct4 (POU5F1): NM_203289 NM_002701; six2: NM_016932 (número de acceso:AF136939); sall1: NM_002968; cttnb1 NM_001098210 (NM_001098209 XM_001133660 XM_001133664 XM_001133673 XM_001133675 NP_001091679 XP_001133660 XP_001133664 XP_001133673 XP_001133675); vimentina: NM_003380 (número de acceso: M14144); Bmi1: NM_005180 (número de acceso BC011652); ezh2 (2 variantes): NM_152998 NM_004456; nanog: NM_024865 (número de acceso: AB093576 (completo); aqp1 - NM_000385 (número de acceso: M77829); aqp3: NM_004925; e-cadherina (CDH1): NM_004360 (número de acceso: L08599); nestina (NES) M_006617.1.

Los anticuerpos para los marcadores celulares mencionados anteriormente están disponibles comercialmente. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, NCAM1 (eBioscience), EPCAM (MiltenyiBiotec), FZD7 (R&D Systems), CD24 (eBioscience), CD133 (MiltenyiBiotec), NTRK2 (R&D Systems), PSA-NCAM (MiltenyiBiotec) ACVR1IB (R&D Systems), ROR2 (R&D Systems), nestina (Abcam).

Como se usa en el presente documento, el término "enriquecer" se refiere a un procedimiento que permite que la subpoblación específica de células renales comprenda al menos aproximadamente el 50 %, preferiblemente al menos aproximadamente el 70 %, más preferiblemente al menos aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente el 99 % o más de las células madre renales que tienen la firma deseada (por ejemplo, NCAM+).

El enriquecimiento se puede realizar usando procedimientos conocidos de clasificación celular, tal como mediante el uso de un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS).

Como se usa en el presente documento, el término "citometría de flujo" se refiere a un ensayo en el que la proporción de un material (por ejemplo, células renales que comprenden un marcador particular) en una muestra se determina marcando el material (por ejemplo, uniendo un anticuerpo marcado al material), haciendo que una corriente de fluido que contiene el material pase a través de un haz de luz, separando la luz emitida de la muestra en las longitudes de onda del constituyente por una serie de filtros y espejos, y detectando la luz.

Una multitud de citómetros de flujo están disponibles en el mercado incluyendo, por ejemplo, Becton Dickinson FACScan y FACScalibur (BD Biosciences, Mountain View, CA). Los anticuerpos que se pueden usar para el análisis

FACS se enseñan en Schlossman S, Boumell L, et al, [Leucocyte Typing V. Nueva York: Oxford University Press; 1995] y están ampliamente disponibles comercialmente.

Otro método de clasificación celular es la clasificación celular magnética como se describe adicionalmente en la sección de Ejemplos a continuación.

Se apreciará que el enriquecimiento también puede realizarse mediante el agotamiento de subpoblaciones no relevantes tales como células estromales renales o células del intersticio (intersticiales).

10 Una vez aisladas, las células de la presente descripción se pueden cultivar y sus propiedades "troncales" se pueden analizar adicionalmente como se describe a continuación.

Dado que la clonogenicidad es una función de las células madre, las células pueden analizarse para determinar su potencial clonogénico. Los presentes inventores han demostrado que las células renales adultas aisladas que tienen una firma NCAM+ son altamente clonogénicas.

Un método ejemplar para determinar el potencial clonogénico se describe en la sección de Ejemplos a continuación.

El presente inventor ha descubierto que cultivar células a baja dilución en medio que comprende suero, preferiblemente en presencia de medio acondicionado de células de riñón fetal humano, es una forma óptima de determinar el potencial clonogénico. Contando el número de clones formados después de un tiempo predeterminado (por ejemplo, un mes), se puede determinar el potencial clonogénico de una población de células renales.

(b) contar una serie de clones formados a partir de las células renales adultas de la población, determinando de este modo el potencial clonogénico de una población de células renales adultas.

Un método ejemplar para obtener medio acondicionado a partir de células de riñón fetal humano es combinando (por ejemplo, en una relación 1:1) SCM y SCM de cultivos FK de los pases 1 a 3.

30 La capacidad de formar esferas también es una función de las células madre. Por consiguiente, las células se pueden analizar para determinar su potencial de formación de esferas. Los presentes inventores han demostrado que las células renales adultas aisladas que tienen una firma NCAM+ tienen un alto potencial de formación de esferas.

35 Un método ejemplar para determinar el potencial de formación de esferas se describe en la sección de Ejemplos a continuación.

Otra forma de confirmar la presencia de células madre renales es mediante la prueba de la expresión de genes específicos de células madre. Una regulación positiva de dichos genes infiere la presencia de células madre renales.

40 Dichos genes incluyen, pero sin limitación, Six2 (NM_016932-número de acceso: AF136939), osr1 (NM_145260.2), Pax2 (NM_003987.3, NM_000278.3, NM_003988.3, NM_003989.3, NM_003990.3), Sall1 (NM_002968) y Cited 1 (NM_001144885.1, NM_001144886.1, NM_001144887.1, NM_004143.3). Los métodos para analizar la expresión de genes específicos de células madre incluyen RT-PCR, transferencia Northern, transferencia Western, citometría de flujo y similares.

45 Como se mencionó, el presente inventor ha encontrado condiciones óptimas para cultivar células de riñón adultas de manera que formen esferoides. El presente inventor descubrió que estos esferoides expresaban genes específicos de células madre en mayor medida que las células de riñón adultas que se cultivaron en condiciones de adherencia.

50 Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente descripción, se proporciona un método para generar un nefroesferoide, comprendiendo el método cultivar células de riñón adultas en condiciones no adherentes, generando de este modo el nefroesferoide.

Como se usa en el presente documento, el término "nefroesferoide" se refiere a un agregado tridimensional (esférico o parcialmente) de células de riñón. También se puede denominar organoide tubular. El nefroesferoide comprende al menos dos tipos de células y no se deriva de un solo tipo de célula (es decir, no es de origen clonal).

De acuerdo con un aspecto, el nefroesferoide es capaz de generar túbulos distales proximales y conductos colectores cuando se le permite diferenciar *in vivo* después del injerto a la membrana corioalantoidea (CAM) del

embrión de pollo.

De acuerdo con otro aspecto, el nefroesferoide no es capaz de generar túbulos distales proximales y conductos colectores cuando se le permite diferenciar *in vivo* después del injerto a la membrana corioalantoidea (CAM) del embrión de pollo.

La frase "condiciones no adherentes" se refiere a condiciones en las que las células no se unen a la superficie de un recipiente en el que se cultivan de modo que una porción sustancial de las células se puede eliminar de la superficie del recipiente mediante manipulaciones mecánicas que no causan daño significativo a las células. Se entiende que las células todavía se pueden retener en o sobre una matriz no adherente (por ejemplo, en esferas de hidrogel) y se pueden retirar de la superficie del recipiente. Dichas manipulaciones incluyen, por ejemplo, agitación suave, masaje o manipulación manual del recipiente, o aclarado del recipiente con medio de crecimiento. Como se usa en el presente documento, una porción sustancial de las células a eliminar es al menos el 70 %, preferiblemente al menos el 75 %, 80 % o el 85 %, más preferiblemente al menos el 90 % o el 95 %. Las manipulaciones que causan daño a las células se pueden identificar determinando la viabilidad de las células antes y después de la manipulación, por ejemplo mediante tinción con azul de tripano. Las manipulaciones mecánicas deberían causar daños a menos del 20 %, preferiblemente menos del 15 %, o el 10 %, más preferiblemente menos del 5 %, 2 % o el 1 % de las células. Se conocen numerosos métodos para cultivar células en condiciones no adherentes. Estos incluyen el crecimiento de células encapsuladas en matrices tales como hidrogel y Matrigel™, en medio de capas de agarosa, o en bolsas de Teflon™. Un ejemplo de hidrogel que se puede usar es PolyHEMA. Se apreciará que las células pueden crecer en contacto con las matrices no adherentes, pero no se adhieren a recipientes de cultivo de plástico.

Los medios de cultivo contemplados incluyen, pero sin limitación, IMDM (Invitrogen) o DMEM (Invitrogen).

De acuerdo con un aspecto, el medio de cultivo comprende suero.

De acuerdo con otro aspecto, el medio de cultivo está desprovisto de suero.

El medio puede comprender componentes adicionales que estimulan adicionalmente a las células a formar esferoides. Por lo tanto, por ejemplo, el medio puede comprender además factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Otros componentes contemplados incluyen insulina y progesterona.

Típicamente, antes de cultivar las células renales adultas, las células se dispersan como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

Opcionalmente, las células de riñón adultas se cultivan antes de formar los esferoides con el fin de expandir el número de células.

De acuerdo con un aspecto, las células renales adultas se expanden en medio que contiene suero durante aproximadamente 4, 5, 6, 7 o más pases en condiciones adherentes antes de la generación de los esferoides.

La frase "condiciones adherentes" se refiere a condiciones en las que las células se unen a la superficie de un recipiente en el que se cultivan de modo que una porción sustancial de las células no se puede eliminar de la superficie del recipiente mediante manipulaciones mecánicas que no causan daño significativo a las células.

Usando el método descrito anteriormente, el presente inventor generó nefroesferoides y procedió a caracterizar estas estructuras.

De acuerdo con un aspecto, un nefroesferoide aislado puede caracterizarse por una expresión mejorada de al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en sal1, pax2, six2 y WT1 o combinaciones de los mismos, en comparación con células de riñón adultas idénticas cultivadas en condiciones adherentes.

De acuerdo con un aspecto, un nefroesferoide aislado se puede caracterizar por una expresión mejorada de cada uno de sal1, pax2, six2 y WT1 en comparación con células de riñón adultas idénticas cultivadas en condiciones adherentes.

Como se usa en el presente documento, el término expresión potenciada se refiere a un aumento en la expresión de al menos 1,5 veces, más preferiblemente al menos 2 veces, e incluso más preferiblemente al menos 3 veces.

Una vez generadas, las poblaciones celulares de la presente descripción (incluyendo las poblaciones NCAM+ y las nefroesferas) típicamente se dejan proliferar en condiciones que conservan su fenotipo de células madre/progenitoras.

5

Las poblaciones celulares de la presente descripción pueden modificarse genéticamente para expresar un transgén. Esto puede usarse para aumentar la supervivencia de las células, hacerlas inmortalizadas o diferenciadas para un linaje deseado. Los ejemplos de dichos transgenes y métodos de introducción de los mismos se proporcionan a continuación.

10

Los genes candidatos para la terapia génica incluyen, por ejemplo, genes que codifican la cadena alfa 5 del colágeno tipo IV (COL4A5), policistina, alfa-galactosidasa A, cotransportador de cloruro de sodio sensible a la tiazida (NCCT), nefrina, actinina o acuaporina 2.

15

Además, los genes que codifican eritropoyetina o insulina pueden introducirse en una célula madre de riñón. Para el tratamiento de la anemia asociada con insuficiencia renal o diabetes, puede ser útil introducir en un paciente células madre modificadas para que expresen eritropoyetina o insulina. Las células madre renales pueden transfectarse estable o transitoriamente con ADN codificando cualquier polipéptido terapéuticamente útil.

20

Las poblaciones celulares de la descripción también se pueden proporcionar con un VEGF que codifica el transgén o algún otro factor que puede promover el crecimiento y/o la diferenciación de las células.

Estos genes pueden ser dirigidos por un promotor inducible de manera que puedan regularse los niveles del transgen. Estos sistemas promotores inducibles pueden incluir un dominio de unión a ligando mutado del receptor de estrógenos humano (ER) unido a la proteína a producir. Esto requerirá que el individuo ingiera tamoxifeno para permitir la expresión de la proteína. Las alternativas son los sistemas de tetraciclina activada o desactivada, RU486 y un sistema inducible por rapamicina. Un método adicional para obtener una expresión relativamente selectiva es usar promotores específicos de tejido. Por ejemplo, uno podría introducir un transgén impulsado por el promotor específico de KSP-cadherina, nefrina o uromodulina.

30

Las células aisladas o generadas por el método descrito en el presente documento pueden modificarse genéticamente introduciendo ADN o ARN en la célula mediante una diversidad de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Estos métodos generalmente se agrupan en cuatro categorías principales: (1) transferencia viral, incluido el uso de vectores virales de ADN o ARN, tales como retrovirus (incluyendo lentivirus), virus de simio 40 (SV40), adenovirus, virus Sindbis y virus del papiloma bovino, por ejemplo; (2) transferencia química, incluyendo transfección de fosfato de calcio y métodos de transfección de DEAE dextrano; (3) transferencia de fusión de membrana, usando vesículas de membrana cargadas con ADN tales como liposomas, fantasmas de glóbulos rojos y protoplastos, por ejemplo; y (4) técnicas de transferencia física, tales como microinyección, electroporación o transferencia directa de ADN "desnudo". Las células pueden alterarse genéticamente por inserción de ADN aislado 40 preseleccionado, por sustitución de un segmento del genoma celular con ADN aislado preseleccionado, o por delección o inactivación de al menos una porción del genoma celular de la célula. La eliminación o inactivación de al menos una porción del genoma celular puede lograrse por una diversidad de medios, incluyendo, pero sin limitación, recombinación genética, mediante tecnología antisentido (que puede incluir el uso de ácidos nucleicos peptídicos, o PNA), o mediante tecnología de ribozimas, por ejemplo. La inserción de una o más secuencias de ADN 45 preseleccionadas puede realizarse por recombinación homóloga o por integración viral en el genoma de la célula huésped. La secuencia del gen deseado también se puede incorporar en la célula, particularmente en su núcleo, usando un vector de expresión plasmídico y una secuencia de localización nuclear. Los métodos para dirigir polinucleótidos al núcleo se han descrito en la técnica. El material genético puede introducirse utilizando promotores que permitan inducir positiva o negativamente el gen de interés utilizando ciertos productos químicos/fármacos, que se elimine después de la administración de un fármaco/producto químico determinado, o pueden etiquetarse para 50 permitir la inducción por productos químicos (incluyendo, pero sin limitación, el receptor de estrógeno mutado sensible a tamoxifeno) para la expresión en compartimentos celulares específicos (incluyendo, pero sin limitación, la membrana celular).

55

La transfección con fosfato cálcico, que se basa en precipitados de ADN plasmídico/iones de calcio, puede usarse para introducir ADN plasmídico que contiene un gen o polinucleótido diana en células aisladas o cultivadas. Brevemente, el ADN plasmídico se mezcla en una solución de cloruro de calcio, luego se añade a una solución que se ha tamponado con fosfato. Una vez que se ha formado un precipitado, la solución se añade directamente a las células cultivadas. El tratamiento con DMSO o glicerol puede usarse para mejorar la eficacia de la transfección, y los

niveles de transfectantes estables se pueden mejorar usando etanosulfonato de bis-hidroxietilamino (BES). Los sistemas de transfección de fosfato de calcio están disponibles comercialmente (por ejemplo, ProFection de Promega Corp., Madison, WI).

La transfección con DEAE-dextrano, que también es conocida por los expertos en la técnica, puede preferirse a la transfección con fosfato cálcico cuando se desea la transfección transitoria, ya que a menudo es más eficaz.

Para poblaciones celulares aisladas, la microinyección puede ser particularmente eficaz para transferir material genético a las células.

10 El potencial de desarrollo de las poblaciones celulares obtenidas de este modo puede investigarse usando métodos que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, mediante inyección en otros órganos (hígado, músculo, corazón y médula ósea) para probar su multipotencia Clarke et al. describen los protocolos para investigar el potencial de desarrollo de las células madre (Clarke et al. 2000 Science 288:1660). Las poblaciones celulares también pueden injertarse en embriones de pollo para determinar su potencial de desarrollo como se describe en la sección de
15 Ejemplos a continuación.

Las poblaciones celulares de la descripción (o las células que se han diferenciado de las mismas) se pueden usar para complementar o sustituir las células renales que se han destruido o tienen una función reducida. Por lo tanto, pueden usarse para tratar pacientes que tienen una función renal deficiente o nula. Las poblaciones celulares de la descripción o las células derivadas de las mismas, pueden ser capaces de realizar la filtración y las funciones de reabsorción/secreción del riñón.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para tratar un daño renal en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al riñón dañado del sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de la población aislada de células descrita en el presente documento, tratando de este modo la enfermedad renal en el sujeto.

Las células de la presente descripción se pueden usar para tratar cualquier forma de enfermedad renal aguda o crónica, nefropatía diabética, enfermedad renal asociada con hipertensión, lesión tubular aguda hipertensiva (isquémica, tóxica), nefritis intersticial, anomalías congénitas (aplasia/displasia/uropatía obstructiva/nefropatía por reflujo); afecciones hereditarias (nefronofosis juvenil, ARPKD, Alport, cistinosis, hiperoxaluria primaria); glomerulonefritis (glomeruloesclerosis focal y segmentaria); enfermedades multisistémicas (SLE, HSP, HUS).

El presente inventor contempla la administración de suspensiones de células individuales de células esféricas disociadas, células esféricas parcialmente disociadas, o células esféricas no disociadas.

Las células se pueden administrar *per se* o como parte de una composición farmacéutica donde se mezclan con un vehículo o excipiente adecuado.

40 Como se usa en el presente documento, una "composición farmacéutica" se refiere a una preparación de uno o más de los principios activos descritos en el presente documento con otros componentes químicos tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados. El propósito de una composición farmacéutica es facilitar la administración de un compuesto a un organismo.

45 En el presente documento, el término "principio activo" se refiere a las células progenitoras renales (o células diferenciadas de las mismas) responsables del efecto biológico.

En lo sucesivo en el presente documento, las frases "vehículo fisiológicamente aceptable" y "vehículo farmacéuticamente aceptable" que se pueden utilizar indistintamente, se refieren a un vehículo o diluyente que no causa irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y las propiedades del compuesto administrado. Un adyuvante está incluido en estas frases.

En el presente documento, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición farmacéutica para facilitar adicionalmente la administración de un principio activo. Los ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato de calcio, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

Las poblaciones celulares o células derivadas (por ejemplo, diferenciadas de las mismas) se pueden administrar a un sujeto tal como quirúrgicamente o por infusión. Por ejemplo, las células renales se inyectan *in vivo* en un riñón

que se encuentra en la fase de recuperación post-isquémica. Esto puede ensayarse fácilmente en un modelo animal predictivo de daño renal isquémico, el pedículo renal de un ratón anestesiado se sujeta durante 30 minutos para inducir la isquemia renal. Las células madre renales se inyectan en la región yuxtamedular (aproximadamente 2000 células a una profundidad de 2-4 mm). Después de 2 semanas de recuperación, se usa el análisis
 5 inmunohistoquímico como se ha descrito anteriormente para buscar marcadores de superficie de células diferenciadas GP330, Tamm-Horfall, Dolichos Biflorous y similares. El estado de diferenciación posterior a la incorporación se puede comparar con el estado del marcador de preinyección.

Las células de la descripción, o las células derivadas de las mismas (por ejemplo, células epiteliales, células
 10 endoteliales, células mesangiales, células de músculo liso vascular y pericitos) pueden usarse para construir sistemas de riñón artificial. Tal sistema puede basarse en un sistema de filtración de fibra hueca.

En un ejemplo de un dispositivo de filtración, las células madre de la descripción o la progenie diferenciada de las mismas se cultivan en el interior de fibras huecas que tienen una conductividad hidráulica relativamente alta (es
 15 decir, coeficiente de ultrafiltración). La fibra hueca pasa a través de una cámara que está provista de un puerto de salida de filtrado. La sangre arterial que contiene desechos metabólicos y otro material no deseado se introduce en un extremo de la fibra hueca a través de un puerto de entrada. La sangre pasa a través de la fibra y sale por el otro extremo de la fibra a través de un puerto de salida donde pasa al flujo venoso vascular del paciente. A medida que la sangre pasa a través de la fibra, el filtrado pasa a través de las células que recubren el interior de la fibra y a través
 20 de la propia fibra hueca. Este filtrado luego sale de la cámara que contiene la fibra a través del puerto de salida del filtrado. El dispositivo incluye preferiblemente muchas de tales fibras huecas, cada una de las cuales puede estar en su propia cámara. Como alternativa, muchísimas fibras huecas (100-100.000 o incluso más) se pueden agrupar en una sola cámara.

Las células de la descripción se pueden usar para crear un dispositivo de procesamiento de túbulos. En tal dispositivo de este tipo, las células madre de la descripción o las células diferenciadas derivadas de las células madre de la descripción pueden crecer en una capa en el exterior de la fibra hueca semipermeable (es decir, un andamio). La fibra se coloca en una cámara que está dotada de un puerto de entrada y un puerto de salida. A medida que el ultrafiltrado de la sangre filtrada fluye a través de la cámara, el reabsorbente pasa a través de la capa
 30 celular y a través de la pared de la fibra hacia la luz de la fibra desde la cual puede dirigirse de nuevo a la circulación sistémica del paciente. El ultrafiltrado que no se reabsorbe pasa a través del puerto de salida de la cámara.

En los dispositivos descritos anteriormente, puede ser deseable revestir la superficie de la fibra que soportará la capa de la célula con componentes de la matriz extracelular. Por ejemplo, la fibra se puede recubrir con materiales
 35 tales como colágeno (por ejemplo, colágeno de Tipo I o colágeno de Tipo IV), proteoglicano, fibronectina y laminina, o combinaciones de los mismos. Puede ser deseable combinar diversos tipos de células en la superficie interna o externa de las fibras. Por ejemplo, puede ser deseable incluir células endoteliales y pericitos, células de músculo liso vasculares o células mesangiales o fibroblastos, o combinaciones de los mismos. También puede ser útil proporcionar una capa de células alimentadoras, por ejemplo, fibroblastos irradiados u otras células que puedan
 40 proporcionar factores solubles y soporte estructural a las células con las que están en contacto indirecto o directo.

El sistema de filtración descrito anteriormente y el sistema de procesamiento de túbulos descrito anteriormente se pueden combinar para crear un riñón artificial. Dichos sistemas se describen en la Pat. de Estados Unidos N.º
 45 6.150.164. Varios materiales adecuados para formar la fibra hueca se describen en la Pat. de Estados Unidos N.º 6.150.164.

La presente descripción proporciona un método para usar las poblaciones celulares de la presente descripción para caracterizar respuestas celulares a agentes biológicos o farmacológicos que implican aislar las células como se describe, expandir en cultivo las células para establecer una pluralidad de cultivos de MRPC, poner en contacto los
 50 cultivos de MRPC con uno o más agentes biológicos o farmacológicos, identificar una o más respuestas celulares a los uno o más agentes biológicos o farmacológicos, y comparar la una o más respuestas celulares de los cultivos. Las técnicas de cultivo tisular conocidas por los expertos en la técnica permiten el cultivo en masa de cientos de miles de muestras de células de diferentes individuos, proporcionando una oportunidad para realizar un cribado rápido de compuestos que se sospecha que son, por ejemplo, teratogénicos o mutagénicos.

55 Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a $\pm 10\%$.

Los términos "comprende", "que comprende", "incluye", "que incluye", "que tiene" y sus conjugados significan "incluyendo, pero sin limitación". Este término incluye los términos "que consiste en" y "que consiste esencialmente

en".

La frase "que consiste esencialmente en" significa que la composición o el método puede incluir ingredientes y/o etapas adicionales, pero solo si los ingredientes y/o etapas adicionales no alteran materialmente las características básicas y novedosas de la composición o método reivindicado.

Como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, el término "un compuesto" o "al menos un compuesto" puede incluir una pluralidad de compuestos, incluyendo mezclas de los mismos.

10

A lo largo de esta solicitud, diversos aspectos de esta descripción se pueden presentar en un formato de intervalo. Debe entenderse que la descripción en formato de intervalo es meramente por conveniencia y brevedad y no debe interpretarse como una limitación inflexible del alcance de la descripción. Por consiguiente, debe considerarse que la descripción de un intervalo ha descrito específicamente todos los posibles subintervalos, así como los valores numéricos individuales dentro de ese intervalo. Por ejemplo, se debe considerar que la descripción de un intervalo, tal como de 1 a 6 tiene subintervalos descritos específicamente, tal como de 1 a 3, de 1 a 4, de 1 a 5, de 2 a 4, de 2 a 6, de 3 a 6 etc., así como a los números individuales dentro de ese intervalo, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, y 6. Esto se aplica independientemente de la amplitud del intervalo.

15

20 Siempre que se indique en el presente documento un intervalo numérico, se pretende que incluya cualquier número citado (fraccional o integral) dentro del intervalo indicado. Las frases "que varía/varía entre" un primer número indicado y un segundo número indicado un número y "que varía/varía de" un primer número indicado "a" un segundo número indicado se usan indistintamente en el presente documento y pretenden incluir el primer y segundo números indicados y todos los números fraccionarios e integrales entre los mismos.

25

Como se usa en el presente documento, el término "método" se refiere a maneras, medios, técnicas y procedimientos para realizar una tarea determinada incluyendo, pero sin limitación, maneras, medios, técnicas y procedimientos conocidos o fácilmente desarrollados, a partir de maneras, medios, técnicas y procedimientos por parte de profesionales de las técnicas química, farmacológica, biológica, bioquímica y médica.

30

Como se usa en el presente documento, el término "tratar" incluye anular, inhibir sustancialmente, ralentizar o revertir la progresión de una afección, mejorar sustancialmente los síntomas clínicos o estéticos de una afección o prevenir sustancialmente la aparición de síntomas clínicos o estéticos de una afección.

35 Se aprecia que ciertas características de la descripción, que, por claridad, se describen en el contexto de aspectos separados, también pueden proporcionarse en combinación en un único aspecto. Por el contrario, diversas características de la descripción, que, por brevedad, se describen en el contexto de un único aspecto, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada o como adecuadas en cualquier otro aspecto descrito de la descripción. Ciertas características descritas en el contexto de diversos aspectos no deben considerarse características esenciales de estos aspectos, a menos que el aspecto sea inoperante sin estos elementos.

40

Diversos aspectos y aspectos de la presente descripción, como se han definido anteriormente y como se reivindica en la sección de reivindicaciones a continuación encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

45

EJEMPLOS

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores ilustran algunos aspectos de la descripción de una manera no limitativa.

50

Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente descripción incluyen técnicas de ADN molecular, bioquímico, microbiológico y recombinante. Dichas técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Nueva York, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); las metodologías como se exponen en la Pat. de Estados Unidos N.º 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook",

55

Volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique" by Freshney, Wiley-Liss, N. Y. (1994), Tercera Edición; "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); se describen extensamente inmunoensayos disponibles en la patente y la bibliografía científica, véanse, por ejemplo, la Pat. de Estados Unidos N.º 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); cada uno de los cuales se incorpora por referencia como si estuvieran completamente expuestos en el presente documento. Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos en el mismo se conocen bien en la técnica y se proporcionan para la comodidad del lector.

MATERIALES GENERALES Y MÉTODOS

20 **Cultivos celulares de riñón adulto humano (hAK):** Se recuperaron muestras de hAK normales de los bordes de tumores de RCC de pacientes de nefrectomía parcial y total. Este procedimiento se realizó después del consentimiento informado y ha sido aprobado por el comité de ética local. Las muestras se trocearon en HBSS, se empaparon en colagenasa durante 2 horas y luego se cultivaron en medio que contenía suero (SCM) o en medio libre de suero (SFM). SCM comprendía medio IMDM complementado con FBS al 10 %, L-Glutamina al 1 %, Pen-Strep al 1 % y factores de crecimiento: 50 ng/ml de bFGF, 50 ng/ml de EGF y 5 ng/ml de SCF (R&D systems). SFM comprendía 500 ml de DMEM:F12 (relación 1:1, Invitrogen), Pen-strep al 1 %, 2 ml de suplemento B27 (Gibco), 4 µg/ml de heparina, aminoácidos no esenciales al 1 % (Invitrogen), piruvato de sodio al 1 % (Invitrogen), L-glutamina al 1 %, 1 ml de mezcla de lípidos (Sigma), 5 ml de suplemento de N2 100X (Gibco), 5 ml de mezcla de factores de crecimiento (para 200 ml de mezcla de factores de crecimiento: 100 ml de DMEM:F12, 4 ml de glucosa al 30 %, 200 mg de transferina, 50 mg de insulina en 20 ml de agua, 19,33 mg de putrescina en 20 ml de ddw, 200 µl de selanita sódica (reserva 0,3 mM), 20 µl de progesterona (reserva 2 mM), FGF 10 ng/ml, EGF 20 ng/ml. Después del 90 % de confluencia, las células se dividieron. El medio se cambió cada 3 días. La formación de esferoides se ensayó sembrando las células en placas recubiertas con PolyHEMA, en el SFM. El medio acondicionado de riñón fetal (FKCM) se obtuvo por combinación en la relación 1:1 de SCM y SCM de cultivos FK de los países 1 a 3.

35 **Anticuerpos para análisis FACS:** Anticuerpos antihumanos conjugados con fluorocromo primarios contra: CD133/1:APC, CD133/1:PE, CD34:FITC, PSA-NCAM:PE (Miltenyi Biotec), NCAM:APC (Biolegend), NCAM:PE (eBioscience), CD90:FITC (Biosciences Pharmingen, BD), CD105:FITC (Serotec), CD24:PE (eBioscience), C-Kit :APC (eBioscience), CD45:FITC (R&D systems). Anticuerpos antihumanos no conjugados primarios contra: ACVR2B, 40 FZD7, NTRK2 (R&D systems). Para visualizar los anticuerpos no conjugados primarios, se usaron anticuerpos secundarios apropiados conjugados con Alexafluor-488 o Alexafluor-647 (Molecular Probes, INC.). Se usó 7-amino-actinomicina-D (7-AAD, BD Biosciences) para la exclusión de células muertas del análisis.

45 **Análisis FACS:** Se desprendieron células monocapa de placas de cultivo con tripsina al 0,25 % (Gibco), se recogieron esferoides y se disociaron mediante digestión en 5-10 minutos con Accutase (Sigma-Aldrich). El número de células viables se determinó usando tinción con azul de tripano (Invitrogen). Las células (1×10^5 en cada reacción) se suspendieron en 50 µl de tampón FACS [BSA al 0,5 % y azida sódica al 0,02 % en PBS (Sigma-Aldrich e Invitrogen, respectivamente)] y se bloquearon con Reactivo de bloqueo FcR (MiltenyiBiotec, Auburn, Estados Unidos) y suero humano (1:1) durante 15 minutos a 4 °C. Las células se incubaron después durante 45 min con un anticuerpo respectivo o un control de isotipo coincidente. La viabilidad celular se ensayó usando la solución de tinción de viabilidad 7AAD (eBioscience). El etiquetado de las células se detectó usando FACSCalibur (BD Pharmingen). Los resultados de la citometría de flujo se analizaron usando el software de análisis FlowJo. Las células viables se definieron por sus perfiles FSC/SSC y, además, su falta de 7AAD. La detección de células con alta actividad enzimática de ALDH1 se realizó utilizando el kit ALDEFUOR (StemCell Technologies, Durham, NC, 55 Estados Unidos) de acuerdo con el protocolo del kit.

Clasificación celular magnética: Se usaron microperlas CD56 (NCAM) (Miltenyi Biotec) para la separación de células marcadoras individuales. Las fracciones positivas y negativas se separaron usando columnas de células Mini o MidiMACS (Miltenyi Biotec) de acuerdo con los protocolos del fabricante. Brevemente, se obtuvo una suspensión

celular y, para la eliminación de los grumos, se pasó a través de una malla de nylon de 30 μm . Las células se marcaron añadiendo 20 μl de microperlas CD56 por 10^7 células totales durante 15 minutos en el refrigerador. Después, las células se lavaron, se suspendieron de nuevo y se separaron magnéticamente. Para una mayor pureza, las fracciones se pasaron una segunda vez a través de columnas frescas. Las células separadas se pusieron en placas para limitar la dilución, los ensayos de diferenciación y el análisis FACS. Una parte de las células se usó para la extracción de ARN.

El día siguiente, se verificó la pureza de las fracciones clasificadas por análisis FACS, después del etiquetado fluorescente.

10

Clasificación FACS: Las células se recolectaron como se ha descrito anteriormente, se filtraron a través de una malla de nylon de 30 μm antes de la centrifugación final, y luego se suspendieron de nuevo en tampón de citometría de flujo consistente en albúmina sérica bovina 2 mM (BSA; Sigma-Aldrich) y azida sódica al 10 % en PBS. Las células se marcaron con anti NCAM:PE (eBioscience) u otro anticuerpo necesario. El clasificador celular activado por fluorescencia FACS Aria y el software FACSDiva (BD Biosciences) se usaron para enriquecer las células que expresaban estos marcadores. Se seleccionaron células viables individuales sobre la base de la exclusión de células teñidas con 7-amino-actinomicina-D (7-AAD, BD Biosciences), y luego se clasificaron físicamente en tubos de recogida para limitar la puesta en placas de la dilución y la extracción de ARN. Los datos se analizaron y presentaron adicionalmente usando el software FlowJo (Tree Star). La pureza de las fracciones clasificadas se verificó visualmente y mediante reanálisis FACS.

15

Análisis de la expresión génica de las fracciones celulares separadas: Se realizaron reacciones de PCR de transcripción inversa en tiempo real cuantitativa (qPCR) para determinar el nivel de cambio en la expresión de los genes "troncales" renales seleccionados (57), así como de marcadores de diferenciación en las células hAK clasificadas.

25

Se analizaron los siguientes genes específicos de segmento de nefrona: Amino peptidasa-A (ENPEP), Acuaporina-1 (AQP1), Acuaporina-3 (AQP3), cotransportador Na/CL (NCCT), podocina; genes troncales/progenitores renales: PAX2, SALL1, SIX2, WT1 y el gen de pluripotencia: NANOG.

30

Los cebadores se obtuvieron a partir de Applied Biosystems. El ARN se extrajo usando los kits micro o miniRNeasy (Qiagen) de acuerdo con los protocolos del fabricante. La síntesis de ADNc se realizó usando el kit de cDNA RT de alta capacidad (Applied Biosystems). Cada reacción de análisis se realizó por triplicado. Se usaron GapDH o HPRT1 como controles endógenos en todos los análisis experimentales. El análisis de expresión génica se realizó usando ensayos de expresión génica TaqMan (Applied Biosystems). El análisis se realizó utilizando el método $-\Delta\Delta\text{Ct}$, que determina el nivel de cambio en la expresión génica con respecto a una muestra de comparación (la fracción positiva de cada hAK).

35

Clonogenicidad de células madre/progenitoras hAK: Se realizó un ensayo de dilución límite en fracciones celulares separadas NCAM1 positivo frente a NCAM1 negativo. Brevemente, las células clasificadas se colocaron en placas de microplacas de 96 pocillos (Greiner Bio-One) en 150 μl de medio de cultivo, a 0,3 o 1 células por dilución de pocillo. La baja concentración celular se logró mediante diluciones en serie que alcanzaron 1000 células por ml. El número de pocillos colonizados se registró después de un mes.

40

Tinción inmunohistoquímica de hAK: Se cortaron secciones de 4 μm de espesor de bloques enteros de hAK normal para inmunohistoquímica. Las secciones se procesaron dentro de 1 semana para evitar la oxidación de antígenos. Antes de la inmunotinción, las secciones se trataron con tampón de citrato 10 mM, pH 6,0 durante 10 minutos a 97 °C en un horno de microondas para la recuperación de antígeno, seguido de tratamiento con H_2O_2 al 3 % durante 10 minutos. Posteriormente, los portaobjetos se tiñeron mediante el método marcado - (estrept)avidina-biotina (LAB-SA) usando un kit histostain plus (Zymed). Se usaron anticuerpos anti-CD56 humano (LifeSpan Biosciences, Inc.) y anticuerpos anti-FZD7, a una dilución de 1:50. Los controles se prepararon omitiendo los anticuerpos primarios o sustituyendo los anticuerpos primarios con el isotipo IgG de cabra. La inmunorreacción se visualizó mediante un sistema de cromógeno/sustrato basado en HRP, (Zymed).

50

Tinción inmunofluorescente de nefroesferoides: Se recogieron esferoides, se fijaron en PFA al 4 %, se incluyeron en gel de agarosa y luego en parafina. La inmunocitoquímica para Ki67 (anticuerpo de conejo monoclonal específico de mamífero, clon SP6 de Lab Vision) se realizó en las secciones que contenían esferoides usando la recuperación de antígeno de microondas. La detección se realizó con anticuerpos anti-conejo Alexa-594 (Molecular Probes) y los portaobjetos se contrañeron con Hoechst.

55

Tinción específica del segmento de nefronas de células AK en cultivo: Los segmentos tubulares se identificaron mediante el uso de los siguientes marcadores: Túbulo proximal (PT) con lectina de *Lotus tetragonolobus* (LTL) marcada con fluoresceína, conducto colector (CD) con aglutinina de *Dolichos biflorus* marcada con fluoresceína (DBA) 1:200 durante 30 minutos (Vector Laboratories); túbulos distales y extremidad ascendente gruesa de Henle con anticuerpo anti glucoproteína de Tamly-Horsfall (anti-THG) (Millipore, Chemicon), anticuerpo secundario utilizado para esta tinción NorthernLights IgG anti-NL637 de oveja (R&D systems).

Injerto de células AK en la membrana corioalantoidea de embrión de pollo (CAM): Se obtuvieron huevos de gallina fértil de un proveedor comercial, y se incubaron a 37 °C al 60-70 % de humedad en una incubadora de tiro forzado. A los 3 días de incubación, se estableció un saco de aire artificial descendiendo la CAM. Se abrió una ventana en la cubierta, y la CAM se expuso el día 9 o 10 de incubación. Células AK se obtuvieron de cultivos de AK adherentes frente a esferoides o sup-poblaciones NCAM+/- . Las células AK se suspendieron en 50 µl de medio y Matrigel (1:1 en volumen) y se pipetearon en un anillo de plástico colocado sobre la membrana. Después, el huevo se selló con cinta adhesiva y se devolvió a la incubadora. Después de una semana, se retiró el injerto, se incluyó en parafina y se separó en serie a 6 µm para análisis histológicos e inmunocitoquímicos. Las secciones de muestra se tiñeron con hematoxilina y eosina a intervalos de 100-150 µm para encontrar las células injertadas en la gran masa de Matrigel (no se muestra). Se usaron LTA marcados con biotina (1:500), DBA (1:2000) (Vector Laboratories) y anti-THG de ratón (1:800) (Millipore, Chemicon) para distinguir partes de los túbulos renales. Antes de la inmunotinción, las secciones se hirvieron durante 10 minutos en tampón de citrato 10 mM, pH 6,0 en un horno de microondas para la recuperación de antígeno (solo para anti-THG). Los peroxidatos endógenos se bloquearon usando H₂O₂ al 3 % en metanol durante 10 minutos. Las lectinas y los anticuerpos primarios se tiñeron posteriormente por el método de avidina-biotina, usando avidina conjugada con peroxidasa (lectinas), seguido de biotina anti-ratón (anticuerpo) (Vector laboratories). Los controles se prepararon omitiendo la lectina o el anticuerpo primario. Se usó el kit de sustrato DAB (Zymogen) para la detección de la peroxidasa.

Se realizó una inmunocitoquímica doble para Ki67 (anticuerpo de conejo monoclonal específico de mamífero, clon SP6 de Lab Vision) y NCAM (monoclonal de ratón, Santa Cruz) en las secciones que contenían células AK usando recuperación de antígeno por microondas. La detección se realizó con anticuerpos Alexa-488 anti-ratón y Alexa-594 anti-conejo (Molecular Probes), y los portaobjetos se contrañeron con Hoechst, y se examinaron todas las secciones en serie. Las fotomicrografías se hicieron con cámaras digitales (CFW-1312M y CFW-1612C, Scion Corporation) en microscopios Olympus SZX12 y BX51. Todos los cambios en las imágenes (contraste, brillo, gamma, nitidez) se realizaron de manera uniforme en todo el campo, y no se eliminaron ni se añadieron características de forma digital.

Ensayo de formación de esferas: Para establecer hKEpC genéticamente marcadas, las células HEK293 se transformaron inicialmente. Las células HEK293 se mantuvieron en medio Eagle modificado de Dulbecco complementado con suero fetal de ternero al 10 %, L-glutamina, penicilina y estreptomina (Biological Industries, Israel), a 37 °C y CO₂ al 5 %. Las células se transfectaron usando fosfato de calcio con tres vectores lentivirales, pHR-CMV-GFP/m-Cherry (7,5 µg), ΔR8.2 (5 µg) y pMD2.G (2,5 µg). Después de 6 h, los sobrenadantes se reemplazaron con 5 ml de medio fresco. Los sobrenadantes de células transfectadas se complementaron con HEPES (pH 7,0; concentración final 50 mM), se filtraron a través de un filtro de tamaño de poro de 0,45 µm, y se pusieron 2 ml en las células diana durante 2 h con la adición de 8 µg/ml de Polybrene (bromuro de hexadimetrino; Sigma) y luego se añadieron 3 ml de medio fresco. Estas partículas virales se usaron para infectar células hKEpC (2 x 10⁵ células en placas de 60 mm de diámetro). La expresión de los genes indicadores se analizó dos días después de la infección. Las células hKEpC marcadas con GFP y m-Cherry se mezclaron en una relación 1:1 y se sembraron en placas de 6 pocillos recubiertas con PolyHEMA, 1-2 x 10⁴ células/pocillo.

Análisis de micromatrices: Se obtuvieron esferoides renales adultos y células monocapa de 3 donantes adultos diferentes. Todos los experimentos se realizaron utilizando matrices de oligonucleótidos Affymetrix HU GENE1.0st (url1). El ARN total de cada muestra se usó para preparar ADN diana biotinilado, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El ADNc diana generado a partir de cada muestra se procesó según las recomendaciones del fabricante usando un sistema de instrumentos Affymetrix GeneChip (url2). La calidad y cantidad de ARN de partida se confirmó usando un gel de agarosa o por bioanalizador (Agilent). Después del escaneo, las imágenes de matriz se evaluaron a simple vista para confirmar la alineación del escáner y la ausencia de burbujas o arañazos significativos en la superficie del chip. Las señales derivadas de la matriz se evaluarán utilizando diversas métricas de evaluación de calidad. Los detalles de las medidas de control de calidad se pueden encontrar en (url1). Se usó el algoritmo de diseño de RMA a nivel genético (Affymetrix Expression Console y Partek Genomics Suite 6.2) para la generación de datos brutos. Los genes significativamente modificados se filtraron como

cambiados al menos 2 veces (valor de P 0,05). Los genes se filtraron y se analizaron mediante análisis de conglomerados jerárquicos no supervisados y análisis de conglomerados jerárquicos supervisados (Partek Genomics Suite y Spotfire DecisionSite for Functional Genomics, Somerville, MA) para obtener una primera evaluación de los datos. El procesamiento adicional incluía el análisis funcional y los cálculos de sobre-representación basados en la Ontología génica y los datos de publicación: DAVID (www.apps1.niaid.nih.gov/David/upload.asp), Ingenuity, Database for Annotation (GO), Visualization, and Integrated Discovery. Los cálculos de sobrerrepresentación se realizan usando Ease (DAVID).

url1:www.worldwidewebdotaffymetrixdotcom/support/technical/datasheets/gene_1_0_s_t_datasheet.pdf

url2:www.worldwidewebdotaffymetrixdotcom/support/downloads/manuals/wt_sensetar_get_label_manualdotpdf

10

Microscopía de lapso de tiempo: Se sembraron hKEpC en la placa pre-recubierta de poly-HEMA. Las fotomicrografías se tomaron cada 3 minutos con un microscopio CLSN 410 Zeiss (x10) en modo DIC. Las imágenes se apilaron en el archivo de película mediante el software ImageJ 1.42q.

15 **Análisis estadístico:** Los resultados se expresan como los valores medios \pm DESV.EST. Las diferencias estadísticas de los datos de dos grupos se compararon mediante la prueba *t* de Student. Cuando se indicó, la prueba *t* se realizó después de la transformación logarítmica para lograr normalidad. Para todos los análisis estadísticos, el nivel de significancia se estableció como $P < 0,05$.

20 **EJEMPLO 1**

Cultivos celulares de hFK adherentes

Después de la recuperación de un pequeño espécimen de hAK de pacientes nefrectomizados, el tejido se disoció en una única suspensión celular y se cultivó en bajas densidades en matraces T75 para permitir el crecimiento clonal (véase el esquema en la Figura 1). Para lograr la expansión a un cultivo monocapa adherente confluentes (P0), se cultivaron inicialmente números bajos de células usando medios que contienen suero (SCM) o medios libres de suero (SFM) definidos. El crecimiento celular se inició a partir de focos de células pequeñas. Sin embargo, aunque ambos medios permitieron la expansión celular, el SFM promovió una expansión más concéntrica y bien definida y el SCM mostró una expansión rápida de una manera menos organizada (Figuras 2A-F). La tinción de cultivos para marcadores específicos de segmento [túbulos proximales de lotus tetragonolobus (LTA); túbulos distales de glucoproteína de Tamm-Horsfall (THG); túbulos colectores de DBA] reveló la presencia de tipos de células tubulares heterogéneas con predominio de túbulos proximales (70 %) y distales (20 %) y, en menor medida, conductos colectores (<10 %; Figuras 3A-D). La tinción de las células epiteliales tubulares proximales renales (RPTEC) y los fibroblastos de prepucio humanos (HFF) se usaron como controles positivos y negativos, respectivamente (Figuras 3E-J). Esta heterogeneidad se conservó a lo largo de pases de cultivo de hKEpC (P3-P5) - Figuras 4A-F.

Los análisis de la expresión génica específica del segmento epitelial renal (aminopeptidasa A (ENPEP), acuaporina-1 (AQP1), acuaporina-3 (AQP3), co-transportador de Na/Cl (NCCT) y podocina) en los cultivos primarios de riñón en comparación con los fibroblastos de prepucio humanos (HFF) indicó la naturaleza epitelial tubular de las células como se ilustra en la Tabla 1. Se muestran los valores de cuantificación relativa (RQ), normalizados con respecto a los valores de expresión de HFF (que, por lo tanto, es igual a 1). Se muestran dos cultivos distintos de P) hKEpC para expresar todos los genes específicos del segmento de la nefrona: túbulo proximal - aminopeptidasa-A (ENPEP) y conducto colector de Acuaporina-(AQP1) - Acuaporina-3 (AQP3), túbulo contorneado distal - co-transportador de Na/Cl (NCCT), podocito - Podocina.

Tabla 1 - Expresión génica en valores de RQ

	HFF	hKEpC#1	hKEpC#2
ENPEP	1	28,36	9,40
AQP1	1	281,14	70,19
AQP3	1	6,34	1,97
NCCT	1	3845,58	3387,39
Podocina	Indetectable	Detectable	Detectable

El análisis de la expresión génica de progenitores renales en los cultivos de SCM y SFM adherentes P0 heterogéneos mostró niveles de genes similares (Figuras 5A-E). Después, las células se recogieron, se propagaron y se expandieron como cultivos adherentes en SFM/SCM o se sometieron a la formación de esferas y diluciones limitantes para evaluar la clonogenicidad en diversas condiciones de cultivo (véase la Figura 1).

EJEMPLO 2**Las condiciones de baja adhesión en cultivos de hAK heterogéneos promueven la formación de "nefroesferoides".**

5 Los presentes inventores consideraron que las condiciones de cultivo que soportan la proliferación de células de riñón humano que forman esferoides pueden representar una estrategia para el aislamiento de células con potencial progenitor. Por consiguiente, los cultivos de SCM y SFM adherentes P0 heterogéneos que se originaron a partir de cinco muestras de hAK se sometieron a condiciones de baja adhesión, específicamente se sembraron en placas de
10 polyHEMA a una densidad de 20-40.000 células viables/ml.

Después de 7-10 días, se obtuvieron agregados celulares flotantes, denominados nefroesferoides o esferoides de hKEpC, de 100-130 micrómetros de diámetro, en 10 de los 10 casos (Figura 6A). Las esferas renales primarias, una vez desagregadas enzimáticamente en células individuales y puestas de nuevo en placas a una densidad de 20.000
15 células/ml en placas de adhesión ultra baja, podrían dar lugar a esferas secundarias en 5-7 días tras el cultivo. Habiendo determinado que los esferoides P2 podrían generarse reproduciblemente después de la siembra de 2×10^4 células/2 ml de hKEpC monocapa P1, los presentes inventores determinaron la formación de esferoides de hKEpC después del cultivo monocapa a largo plazo y observaron la generación reproducible de esferoides P6 después de la siembra de números de células similares de hKEpC monocapa P5 (Figura 6B). De forma interesante,
20 una comparación entre esferoides de hKEpC de bajo y alto pase mostró que estos últimos presentaban una morfología esférica bien organizada, más condensada y "verdadera". Además, se encontró que se generó un número significativamente mayor de esferoides en P6 en comparación con los cultivos P2 (Figura 6C). El examen minucioso de esta diferencia reveló que se atribuye principalmente a la formación de esferoides de pequeño tamaño (<15 μm), en lugar de a los de medio tamaño (15-130 μm) o los mayores (>130 μm) (Figura 6D).

25 **Origen de los esferoides de hKEpC:** Para analizar si los esferoides de hKEpC son de origen clonal, las células derivadas de riñón de dos donantes se cultivaron como una monocapa y se marcaron de forma estable con proteínas fluorescentes de color rojo o verde usando vectores a base de lentivirus, dirigiendo la expresión constitutiva de mCherry y GFP, respectivamente. Para la infección eficiente y la selección de antibióticos de hKEpC monocapa, las células se propagaron a P2-P3. Las hKEpC fluorescentes se desprendieron, se mezclaron en una
30 relación de 1:1 y se sometieron a condiciones de baja adhesión a bajas densidades de 10^4 células/pocillo para generar esferoides. El examen microscópico continuo de 7-10 días a seis semanas después de la siembra reveló que los esferoides contenían células rojas y verdes. Más del 75 % de las células en cada esferoide de riñón estaban compuestas por un color (Figura 7), lo que sugiere que se había producido la agregación en esferoides de hKEpC y que las células no se derivaban por completo del clon. Además del marcado genético, se utilizó una microscopía de
35 lapso de tiempo para seguir los eventos iniciales después de la siembra de hKEpC (2×10^4 células/pocillo) en condiciones no adherentes, ya que las células se filmaron cada 3 minutos durante 48 horas. Se observó que la colisión y la agregación celular se produjo dentro de las cinco horas posteriores a la siembra, lo que indica que es el proceso de iniciación para la formación de esferoides.

40 **Caracterización fenotípica de esferoides de hKEpC:** Los presentes inventores determinaron inicialmente si la generación de esferoides de hKEpC promovía la expresión de genes "troncales".

Se encontró una expresión elevada de *Pax2*, *Sall1*, *Six2*, *Wt*, así como el gen de pluripotencia, *Nanog*, en
45 comparación con el cultivo adherente (Figura 8D). Además, este perfil de expresión fue especialmente prominente cuando se generaron esferoides a partir de células hAK cultivadas en SFM y no SCM (incluyendo *Six2*), mientras que la expansión en cultivos adherentes de SFM no promovió significativamente los marcadores progenitores renales en comparación con cultivos adherentes de SCM (Figuras 8E-H).

50 De forma interesante, entre los genes característicos del linaje ureteral temprano, se encontró una fuerte elevación en esferoides renales del proteoglicano de sulfato de heparán *GPC3*, una molécula de matriz extracelular (ECM) que funciona en el nicho de la yema ureteral (Figura 8I), pero la expresión de los otros genes del linaje ureteral (*Wnt11* y *c-Ret*) fue indetectable (datos no mostrados). Finalmente, la generación de esferoides renales después de la expansión en monocapa a largo plazo (P6) también dio como resultado una reexpresión significativa de los genes
55 progenitores renales (Figura 8J). Por lo tanto, a diferencia de las células monocapa, los esferoides de hKEpC promovieron, al menos en parte, la expresión de marcadores de desarrollo renal y el perfil "troncal".

Se usó citometría de flujo (Figura 9A) para analizar el porcentaje de células que expresan los antígenos de células madre epiteliales, renales y mesenquimales EpCAM, CD24, CD133, CD44 (15) en esferoides y hKEpC monocapa.

- Se encontraron altos niveles de expresión de CD24 y CD44 (80-100 % de las células) tanto en los esferoides como en las células monocapa (Figura 9A y Figura 9B), mientras que los niveles de EpCAM y CD133 se encontraron elevados adicionalmente en los esferoides, lo que indica mayormente un fenotipo EpCAM⁺CD24⁺CD133⁺CD44⁺ de células esferoides. Además, el análisis de la actividad del aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1), una enzima que aumentó la actividad que se ha detectado en poblaciones de células madre/progenitoras, mostró niveles significativamente más altos en las células esferoides hKEpC en comparación con los equivalentes monocapa (Figura 9C). Se encontró que el 29,93 ± 11,78 % de las células esferoides presentaban altos niveles de actividad de ALDH1, en comparación con el 8,06 ± 4,53 % de las células monocapa.
- 10 Por lo tanto, los esferoides de hKEpC tienen un perfil antigénico distinto con actividad de ALDH1 potenciada. **Cambios globales de la transcripción asociados con la formación de esferoides renales:** Habiendo iluminado las características específicas de los esferoides de hKEpC, los presentes inventores querían evaluar a nivel global las alternancias transcripcionales que tienen lugar en relación con la formación de esferoides. Para este esferoide y hKEpC monocapa se generaron a partir de tres fuentes diferentes de riñón adulto humano y se comparó su perfil de expresión génica global utilizando micromatrices de oligonucleótidos. El agrupamiento no supervisado (Partek 6.5) del conjunto de datos completo de micromatrices humanas distinguió claramente entre las muestras que los separaban en dos grupos principales: esferoides de hKEpC y hKEpC cultivadas como monocapa e indicando una entidad biológica diferente y una diferencia fundamental en los patrones de expresión génica (Figura 10A). Los esferoides renales estaban más cerca entre sí en lugar de su equivalente monocapa del mismo origen renal adulto.
- 15 Se identificaron 825 genes expresados diferencialmente por hKEpC de esferoides y monocapa (nivel de cambio >2 veces, ANOVA, P <0,05). Estos incluyeron 477 genes regulados positivamente y 348 regulados negativamente en esferoides en comparación con células monocapa (Figura 10B). Los 20 genes más altamente expresados en esferoides de hKEpC y células monocapa se muestran respectivamente en la Tabla 2.

25

Tabla 2
Regulación ascendente

Categoría del gen	Nombre del gen	Símbolo	Nivel de cambio	Sec. de ref.	ID de Probeset
	Marco de lectura abierto 71 del cromosoma 9	C9orf71	43,20	NM_153237	8161610
	proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad 2	LRP2	18,30	NM_004525	8056611
Proteína ECM	espondina 2	SPON2	15,33	NM_012445	8098870
transporte de iones de sodio	familia de portadores de soluto 10	SLC10A2	12,97	NM_000452	7972692
	receptor polimérico de inmunoglobulina	PIGR	11,75	NM_002644	7923929
	adenilato ciclasa 5	ADCY5	11,55	NM_183357	8090070
	proteína transmembrana 176A	TMEM176A	11,50	NM_018487	8137264
	familia aldehído deshidrogenasa 1, miembro A1	ALDH1A1	11,30	NM_000689	8161755
	proteasa transmembrana, serina 4	TMPRSS4	9,44	NM_019894	7944164
	cinasa de repetición rica en leucina 2	LRRK2	8,57	NM_198578	7954810
	acuaporina 1	AQP1	8,21	NM_198098	8132118
	familia de portadores de soluto 17, miembro 1	SLC17A1	7,91	NM_005074	8124337
	Dominio del conjunto V que contiene inhibidor de activación de linfocitos T 1	VTCN1	7,24	NM_024626	7918936
	familia de portadores de soluto 27	SLC27A2	6,92	NM_003645	7983650
	familia de portadores de soluto 34,	SLC34A2	6,90	NM_	8094441

	miembro 2			006424	
ECM	mucina 20	MUC20	6,60	NM_152673	8084895
	miembro de la familia de la cadena media de acil-CoA sintetasa 3	ACSM3	6,41	NM_005622	7993756
	familia aldo-ceto reductasa 1, miembro B10	AKR1B10	6,19	NM_020299	8136336
	miembro A de fosfolipasa A1	PLA1A	6,13	NM_015900	8081890
	componente complementario 4A	C4A	6,09	NM_007293	8118409
Regulación descendente					
Categoría del gen	Nombre del gen	Símbolo del gen	Nivel de cambio	Sec. de ref.	ID de Probeset
	familia de portadores de soluto 14	SLC14A1	-16,06	NM_001128588	8021081
	inhibidor de la serpina peptidasa	SERPINE1	-11,15	NM_000602	8135069
	antígeno de superficie celular Thy-1	THY1	-6,99	NM_006288	7952268
	filagrina	FLG	-6,82	NM_002016	7920165
	lisil oxidasa	LOX	-6,17	NM_002317	8113709
	cadherina 13, H-cadherina	CDH13	-5,41	NM_001257	7997504
	metalotioneína 1L	MT1L	-5,25	NR_001447	7995793
	metalotioneína 1A	MT1A	-5,20	NM_005946	7995806
	activador del plasminógeno, tejido	PLAT	-4,90	NM_000930	8150509
	semaforina 7A	SEMA7A	-4,89	NM_003612	7990345
	inhibidor de la serpina peptidasa, clado B	SERPINB7	-4,88	NM_003784	8021623
	Transcrito inducible por el daño al ADN 4	DDIT4	-4,85	NM_019058	7928308
	ARN pequeño nucleolar, caja C/D 30	SNORD30	-4,67	NR_002561	7948900
	ciclina A2	CCNA2	-4,66	NM_001237	8102643
	agrupamiento de histonas 1, H2bm	HIST1H2BM	-4,63	NM_003521	8117594
	ARN pequeño nucleolar, caja C/D 25	SNORD25	-4,57	NR_002565	7948910
	dominio sema, dominio de inmunoglobulina (Ig)	SEMA3A	-4,53	NM_006080	8140668
	ARN pequeño nucleolar, caja C/D 74	SNORD74	-4,50	NR_002579	7922418
	quinureninasa (L-quinurenina hidrolasa)	KYNU	-4,47	NM_003937	8045539
	ciclina B2	CCNB2	-4,45	NM_004701	7983969

Para inferir la función de los 825 genes expresados diferencialmente, se usaron la herramienta de análisis de enriquecimiento de Ontología génica (GO) y DAVID. Los genes regulados positivamente y negativamente en esferoides de hKEpC se categorizaron en procesos celulares, según Partek (Figura 10C) y DAVID (Tabla 3), que

muestran los genes elevados más significativamente para agrupar en adhesión célula-célula/ECM/reconocimiento celular, transporte de iones, regulación de la biogénesis del componente celular, mientras que los genes regulados negativamente se relacionaron con el crecimiento celular/mitosis/ciclo celular y la locomoción celular.

5

Tabla 3

Regulación ascendente	
	Recuento
Adhesión celular	23
transporte de iones de sodio	8
adhesión célula-célula	10
transporte de aniones	7
movimiento celular	13
respuesta al estímulo hormonal	11
transporte de fosfato	3
regulación del movimiento celular	7
migración celular	8
organización de la estructura extracelular	6
proceso metabólico del aldehído celular	3
movilidad celular	8
morfogénesis celular implicada en la diferenciación	7
regulación de la localización celular	7
Regulación descendente	
	Recuento
Fase M	47
ciclo celular	67
fase del ciclo celular	51
proceso del ciclo celular	57
mitosis	37
ciclo celular mitótico	44
división celular	38
organización cromosómica	26
proliferación celular	23
meiosis	9
morfogénesis de los vasos sanguíneos	13
desarrollo de los vasos sanguíneos	14
desarrollo de la vasculatura	14
organización de la cromatina	14
regulación de la locomoción	9
regulación del movimiento celular	9
migración celular	11
regulación del movimiento celular	8
movimiento celular	15
crecimiento	8
localización de la célula	11
movilidad celular	11

La Tabla 4 elabora adicionalmente 23 genes categorizados en adhesión biológica, que estaban regulados positivamente en células esferoides (DAVID, $p < 0,00001$).

10

Tabla 4

Adhesión celular y biológica			
Símbolo	Nombre del gen	Asignación génica	Nivel de cambio
CLDN7	claudina 7	Implicada en la formación de uniones estrechas entre las células epiteliales	2,74
PCDHB5	Protocadherina beta-5	Miembro del agrupamiento génico protocadherina beta	3,32
CLDN3	Claudina 3	Miembro de la familia claudina, es una proteína de	3,93

		membrana integral y un componente de hebras de unión estrechas.	
CNTN6	contactina 6	Las contactinas median las interacciones de la superficie celular durante el desarrollo del sistema nervioso. Participa en la generación de oligodendrocitos actuando como un ligando de NOTCH 1.	3,09
PKHD1	enfermedad poliquística renal y hepática 1	Localizado predominantemente en el dominio apical de las células epiteliales polarizadas, lo que sugiere que puede estar implicado en la tubulogénesis y/o el mantenimiento de la arquitectura de la luz del conducto.	3,38
PCDHB2	protocadherina beta 2	Los dominios extracelulares interactúan de manera homófila para especificar conexiones diferenciales célula-célula.	2,94
CDH1	E-cadherina (epitelial)	molécula de adhesión celular	3,27
CX3CL1	ligando de hemoquina (motivo C-X3-C) 1	CX3CL1 causa sus funciones adhesivas y migratorias al interactuar con el receptor de quimiocinas CX3CR1	2,86
CXADR	virus coxsackie y receptor de adenovirus		2,95
BCL2L11	Tipo BCL2 11 (facilitador de la apoptosis)		2,42
SEMA5A	dominio sema siete repeticiones de trombospondina		4,01
PVRL4	asociado al receptor de poliovirus 4	Implicado en la adhesión celular a través de interacciones transhomófilas y heterófilas. Es una proteína de membrana de tipo I de un solo pase.	3,18
ARVCF	Proteína de repetición de armadillo eliminada en el síndrome velo-cardio-facial	Miembro de la familia de la catenina, que desempeña un papel importante en la formación de complejos de unión adherentes, que se cree que facilitan la comunicación entre los entornos internos y externos de una célula.	2,22
CDH16	cadherina 16, KSP-cadherina	molécula de adhesión celular	2,99
AGT	angiotensinógeno (inhibidor de serpina peptidasa, clado A, miembro 8)	Componente esencial del sistema renina-angiotensina (RAS)	5,67
ITGB6	integrina beta 6	Integrina alfa-V/beta-6 es un receptor para fibronectina y citotactina.	3,41
VNN1	vanina 1	Puede desempeñar un papel en la respuesta al estrés oxidativo	4,79
RHOB	Miembro de la familia del gen homólogo ras B	Media la apoptosis en células transformadas neoplásicamente después del daño al ADN.	2,58
		Afecta a la adhesión celular y la señalización del factor de crecimiento en las células transformadas.	
CNTN4	contactina 4	Miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas. Es una proteína de membrana neuronal anclada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) que funciona como una molécula de adhesión celular.	2,61
GPNMB	glucoproteína (transmembrana) nmb	glucoproteína transmembrana	6,03
SPON2	Espondina 2	Proteína de la matriz extracelular	15,33
CHL1	molécula de adhesión celular con homología a L1CAM	molécula de adhesión celular	4,58
CEA CAM1	Molécula de adhesión celular relacionada con el antígeno carcinoembrionario	molécula de adhesión celular	2,07

Por lo tanto, los esferoides de hKEpC generaron un nicho quiescente enriquecido en las interacciones célula-célula y de matriz celular. La naturaleza quiescente de los esferoides se confirmó por análisis de células proliferantes en esferoides enteros fijados e incluidos en parafina y teñidos para hematoxilina y eosina (Figura 11A) y para el

marcador de proliferación celular, Ki-67 (Figura 11B). Todos los esferoides de hKEpC presentaron un bajo índice de proliferación de <10 % de células positivas para Ki-67 por esferoide/sección, lo que es indicativo de la naturaleza quiescente de los esferoides.

5 EJEMPLO 4

Las células hAK heterogéneas cultivadas en medio acondicionado de riñón fetal muestran una clonogenicidad potenciada

10 Tras la observación de que los cultivos heterogéneos de células epiteliales de riñón mantienen la capacidad de formar esferas, los presentes inventores analizaron las condiciones de cultivo que potencian las capacidades clonogénicas de las células y permitirán el análisis clonal de subpoblaciones de células hAK. Las células se pusieron en placas en concentraciones de dilución límite (LD) en 4 condiciones de crecimiento diferentes: a) SCM, b) SFM, c) cultivo expandido en SCM y análisis LD realizado en SFM, d) SCM en relación 1:1 con medio acondicionado de
15 riñón fetal (FKCM). El análisis del número de pocillos colonizados, registrados después de 4 semanas, mostró que el SCM promueve mayores capacidades clonogénicas en comparación con el SFM. Esto fue especialmente evidente cuando se combinó con FKCM (condición d) (Figuras 12A-C). Los clones de FKCM mostraron una viabilidad y confluencia mejoradas a diferencia del SCM (Figuras 13A-D). La expansión clonogénica indicativa de autorrenovación podría realizarse durante más de 11 pases.

20 EJEMPLO 5

Las células que expresan NCAM1 aisladas de cultivos de hAK heterogéneos son altamente clonogénicas, y preferiblemente forman esferas

25 Tras la elucidación de diversas condiciones de cultivo que permiten una expresión mejorada de los genes progenitores renales, las capacidades clonogénicas y la formación de nefroesferoides, los presentes inventores determinaron marcadores de superficie que podrían identificar células dentro de los cultivos de hAK heterogéneos que presentan preferentemente estas características. Por consiguiente, se clasificaron las subpoblaciones celulares
30 positivas para los marcadores de superficie que se ha demostrado que marcan la población de progenitores renales del riñón humano en desarrollo, tales como NCAM1 y FZD7 (10, 11). NCAM1 que durante la nefrogénesis se localiza en las células del MM y sus derivados tempranos, incluyendo el mesénquima condensado y la nefrona temprana, no se expresa en el riñón adulto *in vivo* (11, 17, 18). El fraccionamiento eficiente de las células NCAM+ se logró con clasificación FACS (Figuras 14A-C) y, en menor medida, a través de microperlas. El análisis de los genes "troncales" renales en células NCAM+ en comparación con la fracción NCAM- obtenida de cultivos heterogéneos de cinco hAK
35 diferentes reveló una sobreexpresión de los marcadores de progenitores del epitelio renal temprano (*Six2*, *Osr1*, *Sall1*, *Pax2* y *Wt1*) y los antígenos de superficie tempranos (*FZD7*, *AVR2b*) (11), grupo polycomb (*Bmi-1*, *Ezh2*), ruta Wnt (*Beta-catenina*, *FZD7*), así como el marcador de pluripotencia, *Oct4* (Figuras 15A-E). El análisis de los marcadores de diferenciación renal reveló niveles elevados de aminopeptidasa (ENPAP) y acuaporina 1 (AQP1) y
40 un bajo contenido de co-transportador de Na/Cl (NCCT) y acuaporina 3 (AQP3), así como alto nivel de vimentina y bajo contenido de E-cadherina, lo que indica que las células NCAM+ provienen del túbulo proximal (Figuras 15A-E).

Habiendo identificado la capacidad clonogénica única de las células hAK cultivadas con FKCM, los presentes inventores examinaron a continuación tanto la capacidad de las células NCAM+ como NCAM- para formar clones de
45 células individuales en estas condiciones, así como su capacidad proliferativa en cultivo. Los experimentos realizados en cultivos que se originaron en 3 riñones diferentes revelaron que la fracción NCAM+ era altamente clonogénica en todos los casos (Figuras 16A-C). Aunque altamente clonogénicas, se encontró que las células NCAM+ eran menos proliferativas en el ensayo de proliferación de MTS en comparación con el equivalente negativo (Figura 16D). La actividad de formación de esferas en la población de células NCAM+ clasificadas a partir de cultivos
50 de hAK heterogéneos se evaluó a continuación. Sorprendentemente, inmediatamente después de clasificar los cultivos de bajo pase, solo las células NCAM+ generaron esferas mientras que la fracción NCAM- careció de esta capacidad. La expansión a corto plazo de las células NCAM+ después de la clasificación dio como resultado la aparición de esferas en la población NCAM-; sin embargo, las esferas bien definidas se observaron exclusivamente en las células NCAM+ (Figuras 16E-J). El análisis de las poblaciones clasificadas de los cultivos de alto pase mostró
55 que tanto las fracciones NCAM+ como NCAM- tenían habilidades de formación de esferas (datos no mostrados). Por consiguiente, mientras esferas bien definidas generadas a partir de células NCAM+ en cultivos de bajo pase demostraron una expresión mejorada de los genes progenitores renales en comparación con esferas formadas por células NCAM- y también con una fracción adherente NCAM+, en cultivos de alto pase, tanto las esferas de NCAM+ como de NCAM- mostraron niveles génicos elevados similares cuando se compararon con las células adherentes

NCAM+ (datos no mostrados). Por lo tanto, NCAM enriqueció fuertemente la capacidad de formación de esferas en cultivos heterogéneos de bajo pase. En cultivos de alto pase, la formación de esferas independientemente de la expresión de NCAM enriquece los genes progenitores renales.

5 EJEMPLO 6

Generación *in vivo* de estructuras tubulares humanas en el embrión de pollo por nefroesferoides y células NCAM+

10 Habiendo determinado que los esferoides de hKEpC tienen un perfil "troncal" renal mejorado y recapitulan un microambiente rico en ECM y moléculas de contacto celular, los presentes inventores probaron si esto conduce a una potencia funcional mejorada para generar estructuras renales. Por consiguiente, se realizó un injerto de células humanas sobre la membrana corioalantoidea (CAM) del embrión de pollo y se analizó su destino 7 días después de la implantación (Figura 17A-k). Los embriones de pollo se injertaron con esferoides de hKEpC completos, o
 15 suspensiones de células individuales de células esferoides disociadas (inmediatamente después de la disociación) y hKEpC monocapa. Las células suspendidas son especialmente importantes ya que representan una forma inyectable de células. La implantación de esferoides renales humanos completos en la CAM dio como resultado la formación de túbulos (Figura 17G). La comparación de la implantación de células individuales de hKEpC esferoides y monocapa demostró que los injertos generados a partir de células esferoides eran mucho más grandes que sus equivalentes (Figuras 17A-B). La tinción con H&E reveló una fuerte capacidad de formación de túbulos por células esferoides, por ejemplo, $0,43 \times 10^6$ células esferoides indujeron la formación de estructuras tubulares múltiples, mientras que se observaron pocos túbulos en los injertos generados por números similares de hKEpC monocapa (Figuras 17C-D). Se realizaron experimentos adicionales para determinar si los esferoides de hKEpC generados después de la expansión a largo plazo de las células monocapa (P6) pueden recapitular la formación de túbulos.
 25 $0,43 \times 10^6$ células esferoidales individuales disociadas se injertaron en las estructuras tubulares reconstituidas con CAM, mientras que la hKEpC monocapa expandida a largo plazo (P6) no logró generar estructuras similares (Figuras 17E-F). Es importante destacar que el injerto de los tipos celulares de control, las células madre mesenquimales (MSC) y la línea de células renales embrionarias humanas (HEK293) generaron masas celulares desorganizadas (Figuras 17H-I), lo que indica que solo las células derivadas de riñón tienen potencial nefrogénico en
 30 este modelo. De forma interesante, cuando se usaron células de riñón fetal humano (FK) como controles adicionales, no se observó formación tubular después de injertar $1,25 \times 10^6$ células FK (Figura 17J), mientras que el injerto de $2,5 \times 10^6$ células FK (Figura 17K) mostró formación tubular. Por lo tanto, muchas menos ($0,43 \times 10^6$) células esferoides renales adultas generan estructuras tubulares que acentúan adicionalmente su alta capacidad tubulogénica.

35 Para definir mejor las estructuras tubulares que se formaron mediante hKEpC esferoides disociadas, las secciones de injerto se tiñeron marcadores tubulares específicos de segmento (LTA, proximal, THG, distal, DBA, distal/recogida). Se encontró que las estructuras renales reconstituidas mostraban túbulos LTA, THG y DBA positivos y eran una reminiscencia de un amplio espectro tubular humano adulto (Figuras 18A-D). Para aclarar la especificidad de la expresión de DBA se realizó tinción inmunofluorescente y se descubrió que los túbulos DBA(+) comprendían una porción de los túbulos reconstituidos (Figura 18D). Las células esferoides obtenidas a partir de cultivos de alto pase también mostraron más de un tipo de túbulos diferenciados con tinción positiva de los marcadores THG y DBA y, en mucha menor medida, tinción con LTA (Figuras 19A-C). Por lo tanto, los esferoides de hKEpC potencian la potencia funcional para la formación de túbulos.

45 También se analizó la capacidad regenerativa de las células adherentes clasificadas NCAM+. En este experimento, se observó una fuerte reconstitución tubular por $0,43 \times 10^6$ células NCAM+ sin formar la fracción NCAM- estructuras similares (Figuras 20A-F). Por lo tanto, un número bajo de células NCAM+ esferoides y clasificadas puede recapitular estructuras renales *in vivo* indicativas de un alto potencial renal.

50

Bibliografía:

1. Weissman I. The ISSCR: who are we and where are we going? Cell Stem Cell. 2009;5:151-153.
2. Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, et al. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. Annu Rev Immunol. 2003;21:759-806.
3. Blanpain C, Fuchs E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009;10:207-217.
4. Barker N, van de Wetering M, Clevers H. The intestinal stem cell. Genes Dev. 2008;22:1856-1864.
5. Nishinakamura R. Stem cells in the embryonic kidney. Kidney Int. 2008;73:913-917.

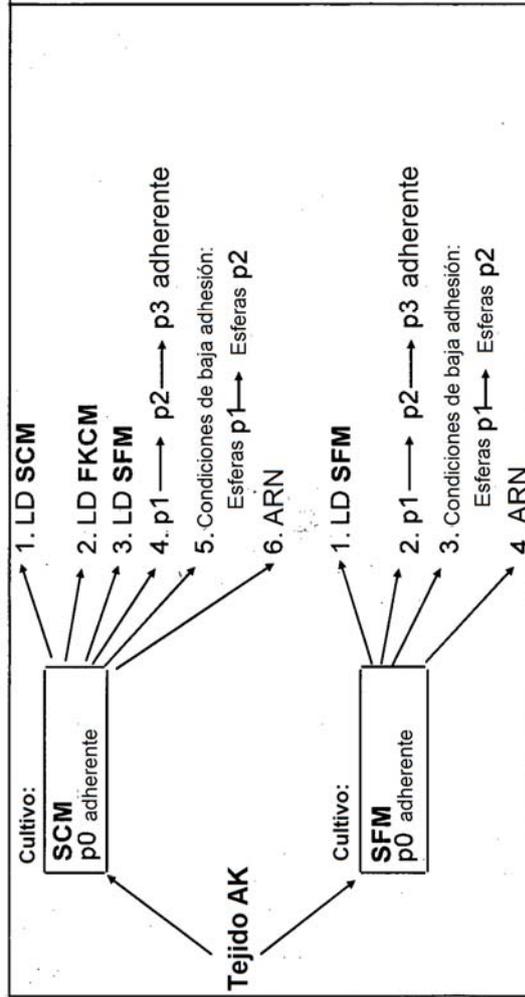
55

6. Hartman HA, Lai HL, Patterson LT. Cessation of renal morphogenesis in mice. *Dev Biol.* 2007;310:379-387.
7. Metsuyanım S, Pode-Shakked N, Schmidt-Ott KM, et al. Accumulation of malignant renal stem cells is associated with epigenetic changes in normal renal progenitor genes. *Stem Cells.* 2008;26:1808-1817.
- 5 8. Humphreys BD, Valerius MT, Kobayashi A, et al. Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury. *Cell Stem Cell.* 2008;2:284-291.
9. Dressler GR. Advances in early kidney specification, development and patterning. *Development.* 2009;136:3863-3874.
- 10 10. Dekel B, Metsuyanım S, Schmidt-Ott KM, et al. Multiple imprinted and stemness genes provide a link between normal and tumor progenitor cells of the developing human kidney. *Cancer Res.* 2006;66:6040-6049.
11. Metsuyanım S, Harari-Steinberg O, Buzhor E, et al. Expression of stem cell markers in the human fetal kidney. *PLoS One.* 2009;4:e6709.
12. WangTY, Sen A, Behie LA, Kallos MS. Dynamic behavior of cells within neurospheres in expanding populations of neural precursors. *Brain Res* 2006;1107:82-96.
- 15 13. Goldstein AS, Lawson DA, Cheng D, Sun W, Garraway IP, Witte ON. Trop2 identifies a subpopulation of murine and human prostate basal cells with stem cell characteristics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:20882-20887.
14. Lawson DA, Xin L, Lukacs RU, Cheng D, Witte ON. Isolation and functional characterization of murine prostate stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:181-186.
- 20 15. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, Wicha MS. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev* 2003;17:1253-1270.
16. Bez A, Corsini E, Curti D, BiggiogeraM, Colombo A, Nicosia RF, Pagano SF, Parati EA. Neurosphere and neurosphere-forming cells: Morphological and ultrastructural characterization. *Brain Res* 2003;993:18-29.
- 25 17. Klein G, Langegger M, Goridis C, and Ekblom P, Neural cell adhesion molecules during embryonic induction and development of the kidney. *Development*, 1988. 102(4): p. 749-61.
18. Bard JB, Gordon A, Sharp L, and Sellers WI, Early nephron formation in the developing mouse kidney. *J Anat*, 2001. 199(Pt 4): p. 385-92.
- 30 19. Abbate M, Brown D, Bonventre JV. Expression of NCAM recapitulates tubulogenic development in kidneys recovering from acute ischemia. *Am J Physiol.* 1999;277:F454-463
20. Sagrinati C, Netti GS, Mazzinghi B, et al. Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:2443-2456.
- 35

REIVINDICACIONES

1. Un nefroesferoide aislado que comprende células renales adultas humanas, siendo dicho nefroesferoide capaz de generar túbulos distales proximales y conductos colectores cuando se permite diferenciar *in vivo* después del injerto a la membrana corioalantoidea (CAM) del embrión de pollo, en el que dicho nefroesferoide aislado se puede obtener cultivando células renales adultas humanas en medio libre de suero (SFM) y las condiciones de baja adhesión, estando dicho nefroesferoide **caracterizado por** la expresión mejorada de al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en sal1, pax2, six2 y WT1 en comparación con dichas células de riñón adultas cultivadas en condiciones adherentes.
- 5
- 10 2. El nefroesferoide aislado de la reivindicación 1, **caracterizado por** una expresión mejorada de cada uno de sal1, pax2, six2 y WT1 en comparación con dichas células de riñón adulto cultivadas en condiciones de adherencia.
- 15 3. Una población aislada de nefroesferoides de la reivindicación 1 o 2 para su uso en el tratamiento del daño renal.
4. Un cultivo celular que comprende un medio de cultivo y una población aislada de nefroesferoides de la reivindicación 1 o 2.
- 20

FIG. 1



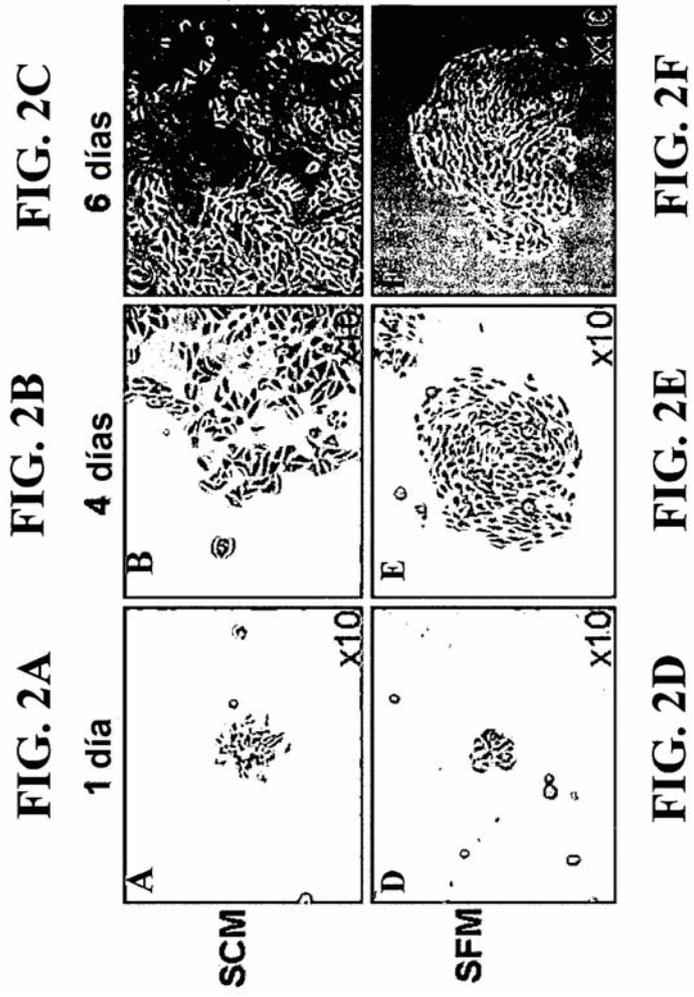


FIG. 3A

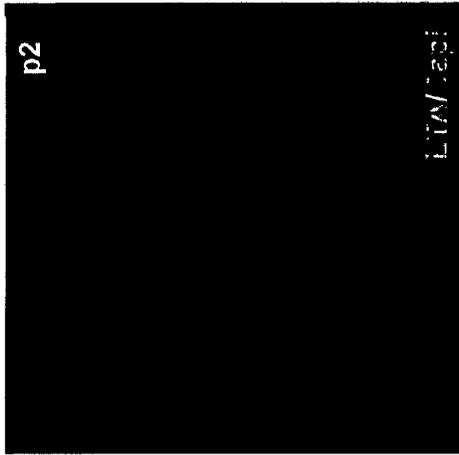


FIG. 3B

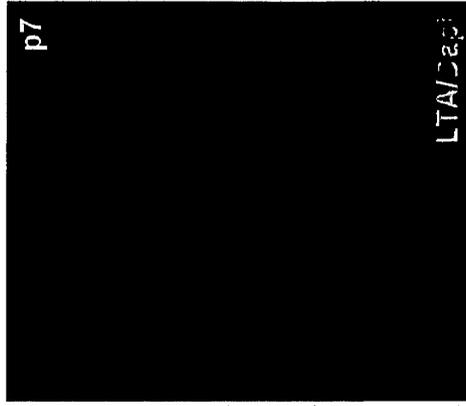


FIG. 3C



FIG. 3D



FIG. 3E

LT/DAPI

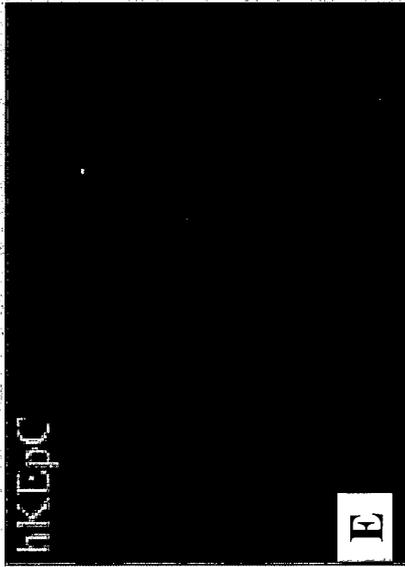


FIG. 3F

DB/DAPI

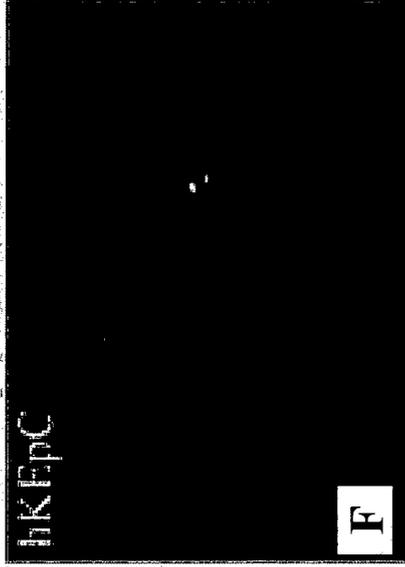


FIG. 3G

FIG. 3H

FIG. 3I

FIG. 3J

FIG. 4A

P3

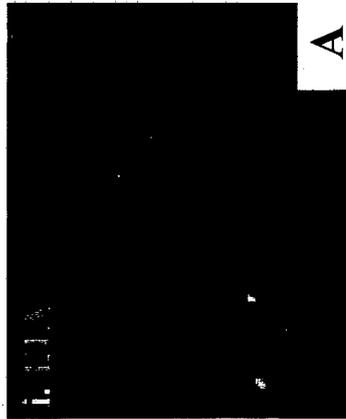


FIG. 4B

P4

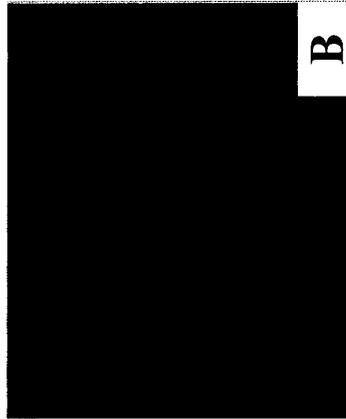


FIG. 4C

P5

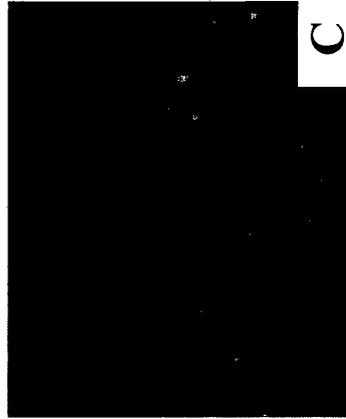


FIG. 4D



FIG. 4E

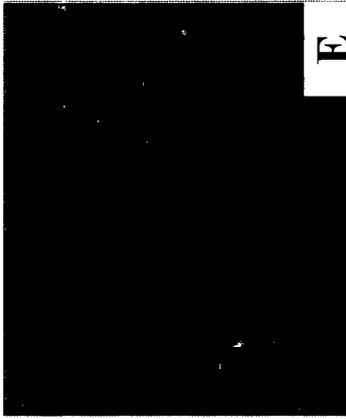
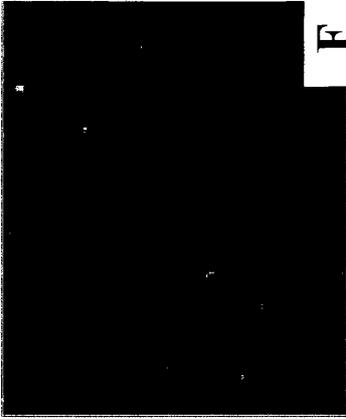


FIG. 4F



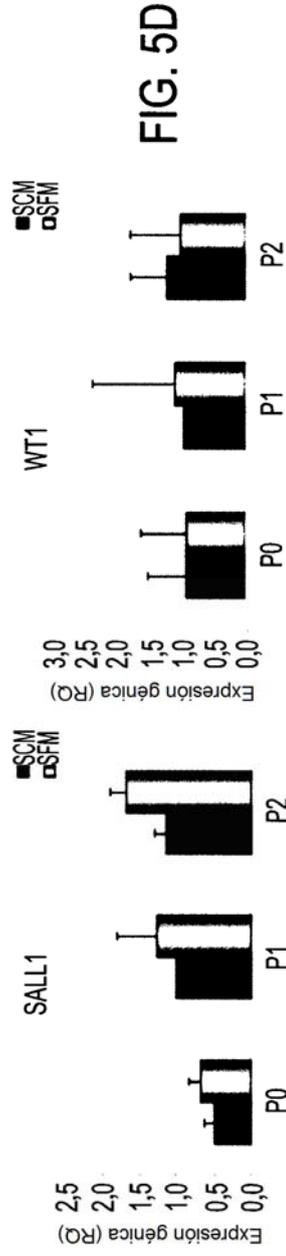
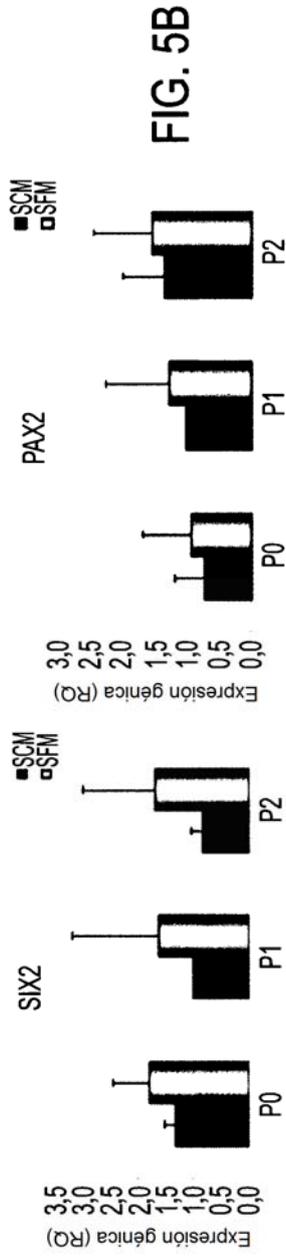


FIG. 5A

FIG. 5B

FIG. 5C

FIG. 6A

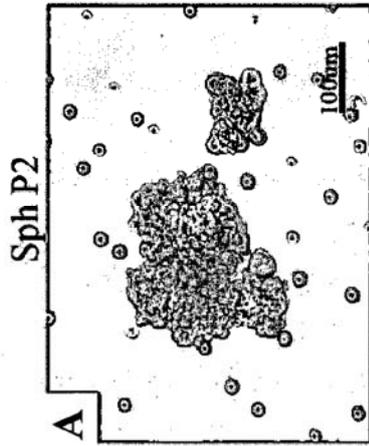


FIG. 6B

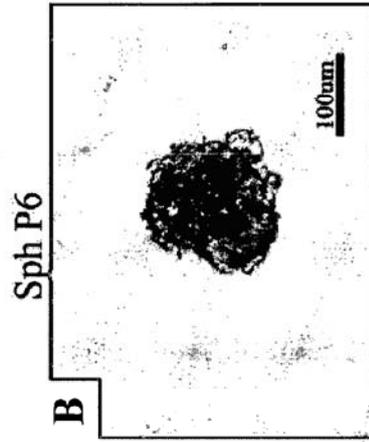


FIG. 6C

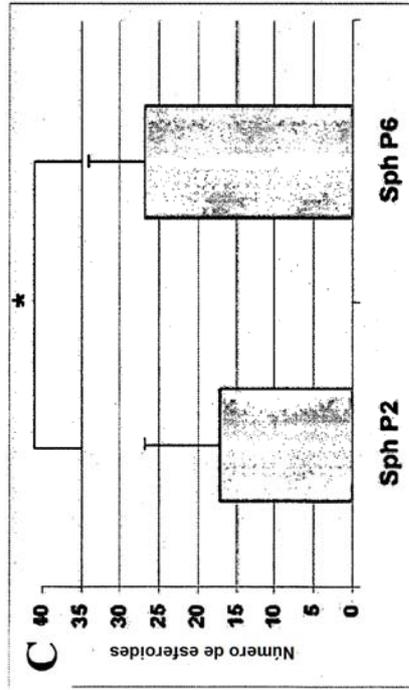


FIG. 6D

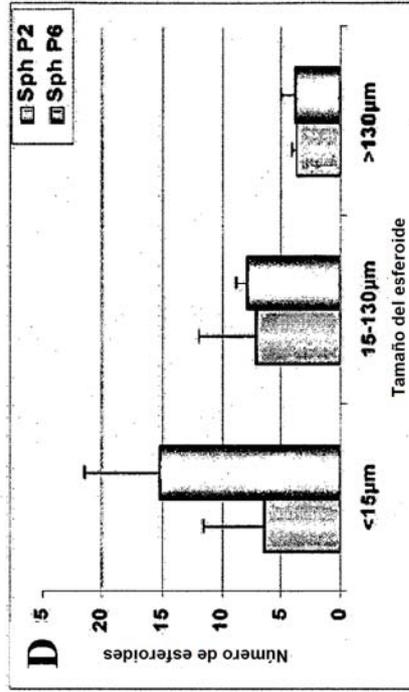


FIG. 7

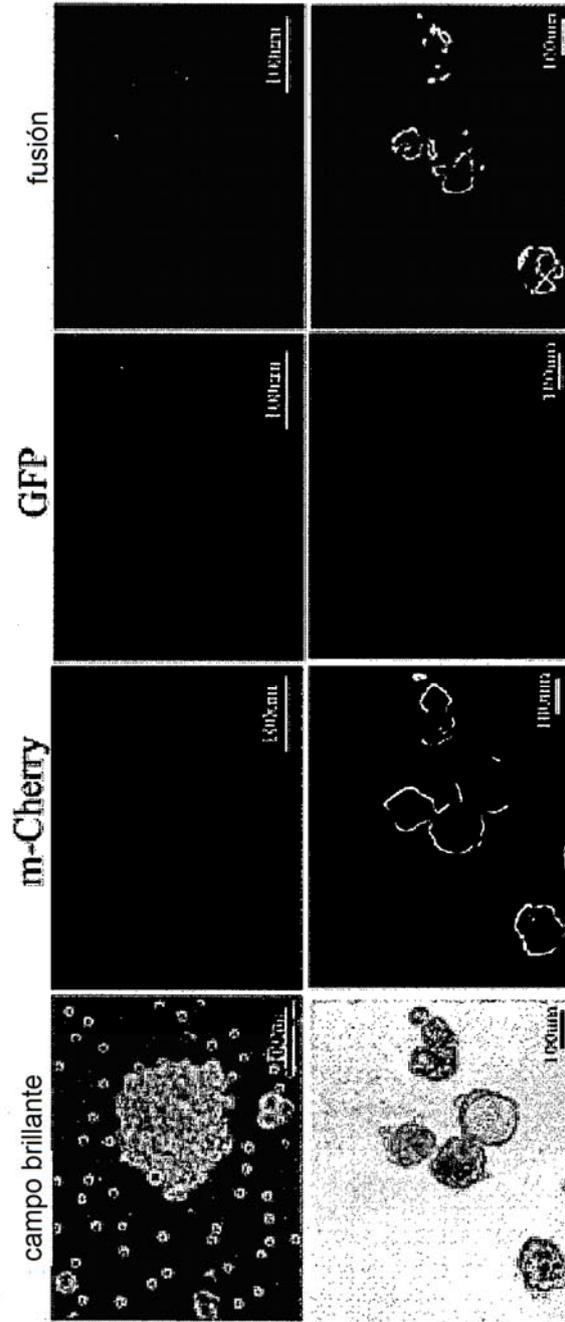


FIG. 8A



FIG. 8C



FIG. 8B



FIG. 8D

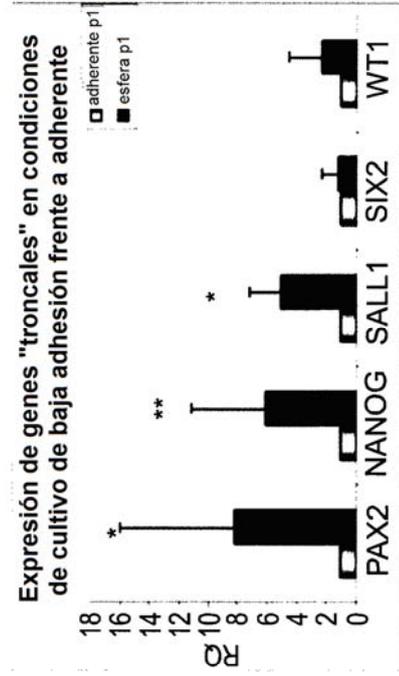


FIG. 8E



FIG. 8G

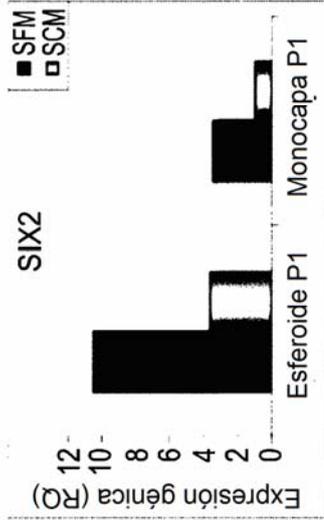


FIG. 8F

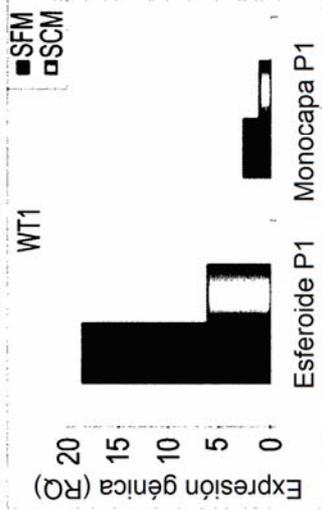


FIG. 8H

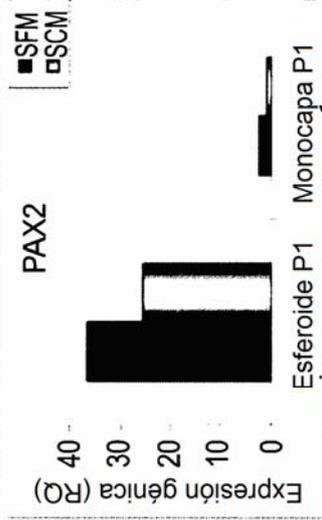


FIG. 8I

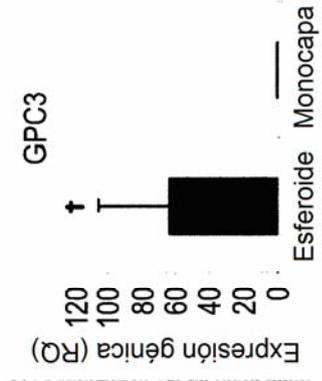


FIG. 8J



FIG. 9A

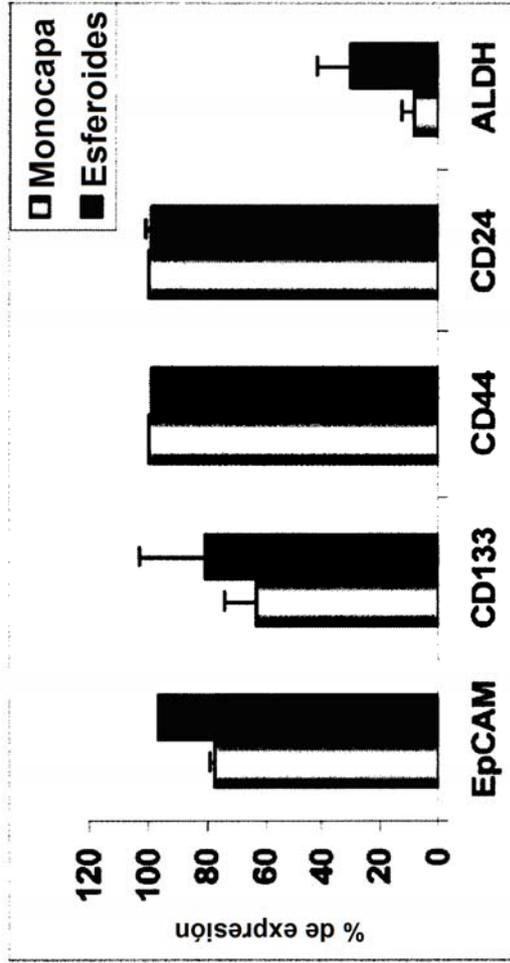
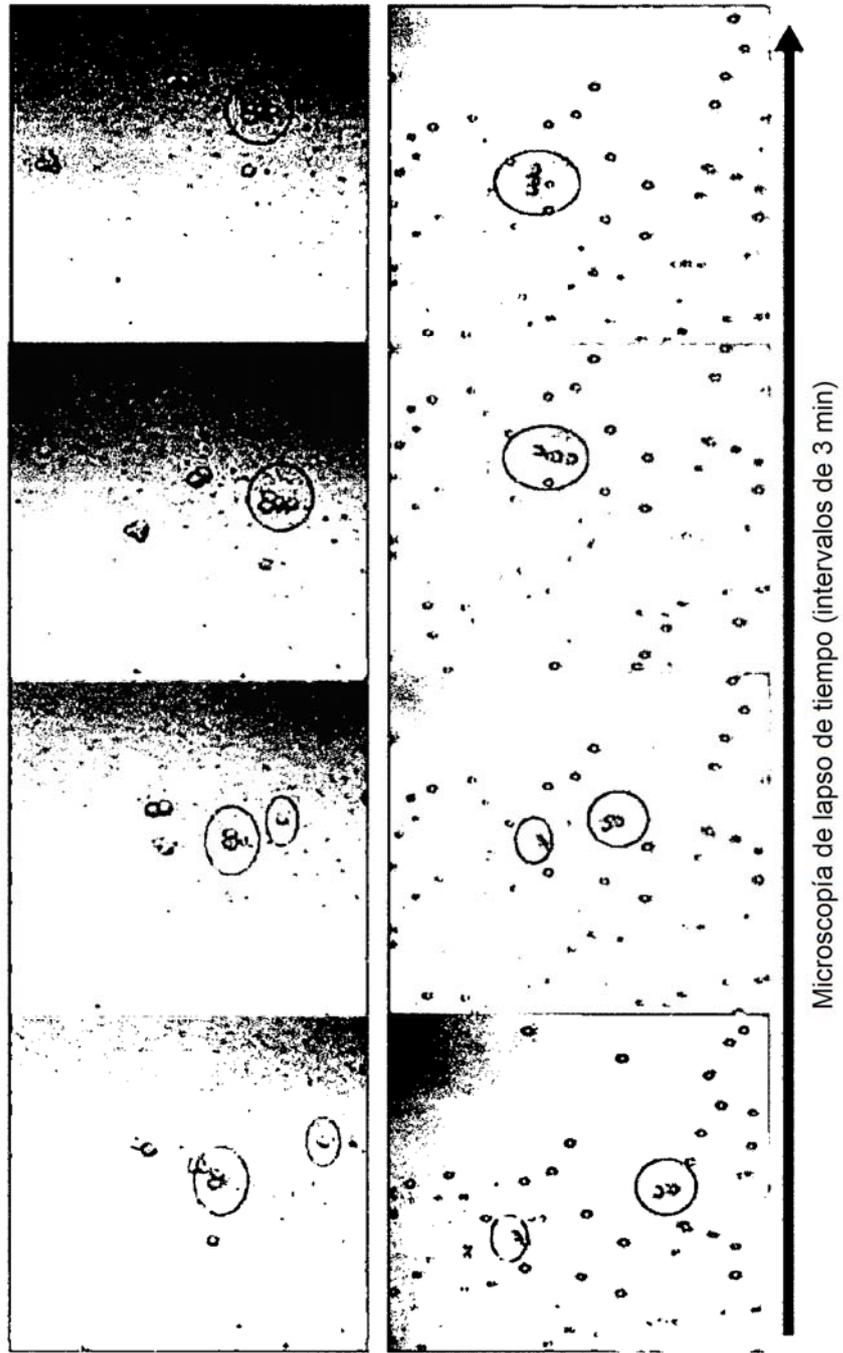


FIG. 9B



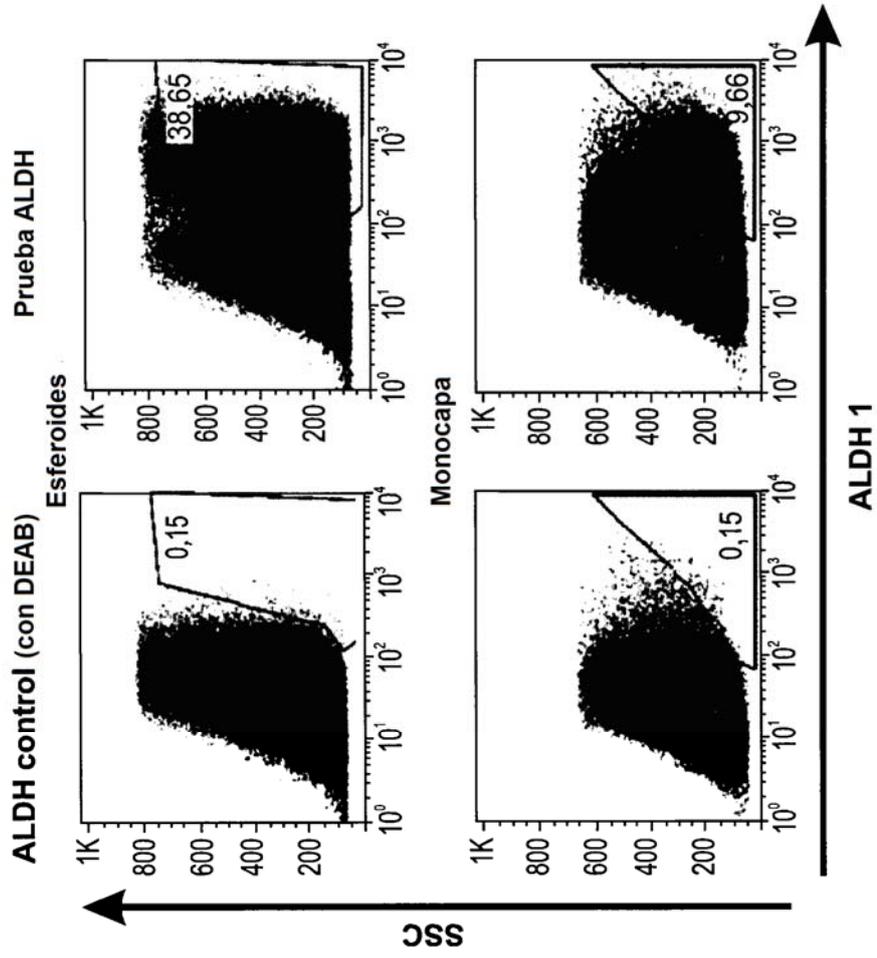
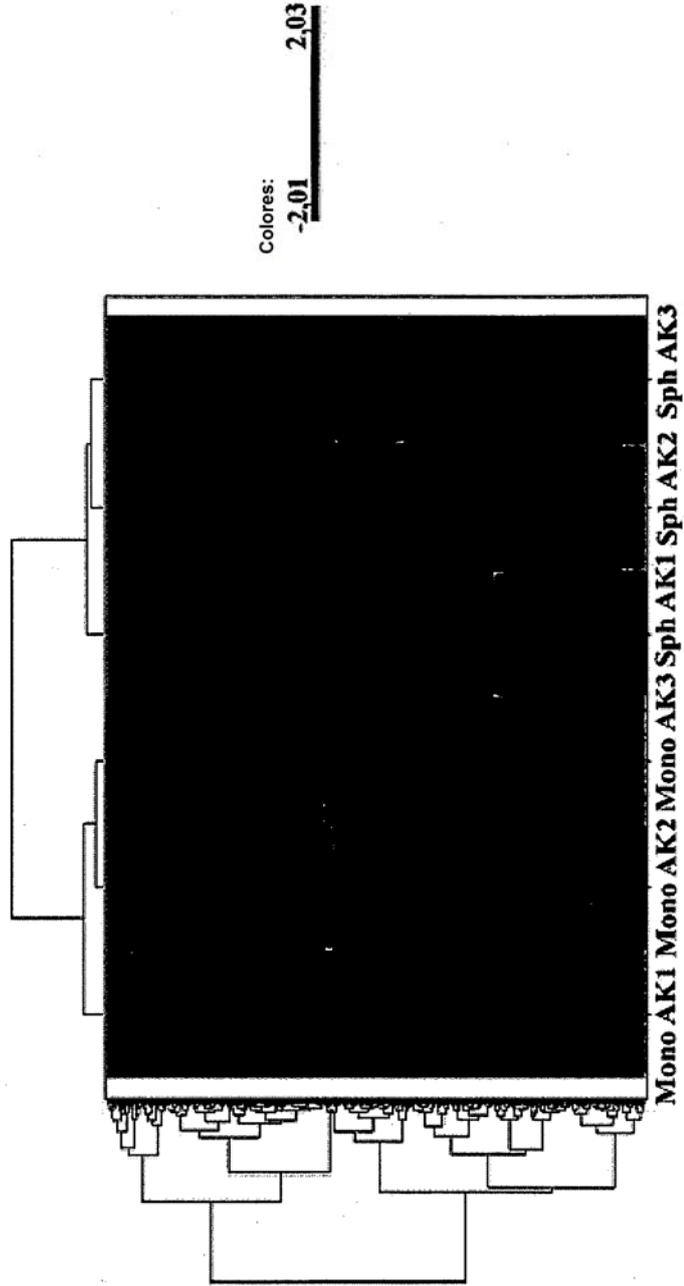


FIG. 9C

FIG. 10B



Procesos celulares

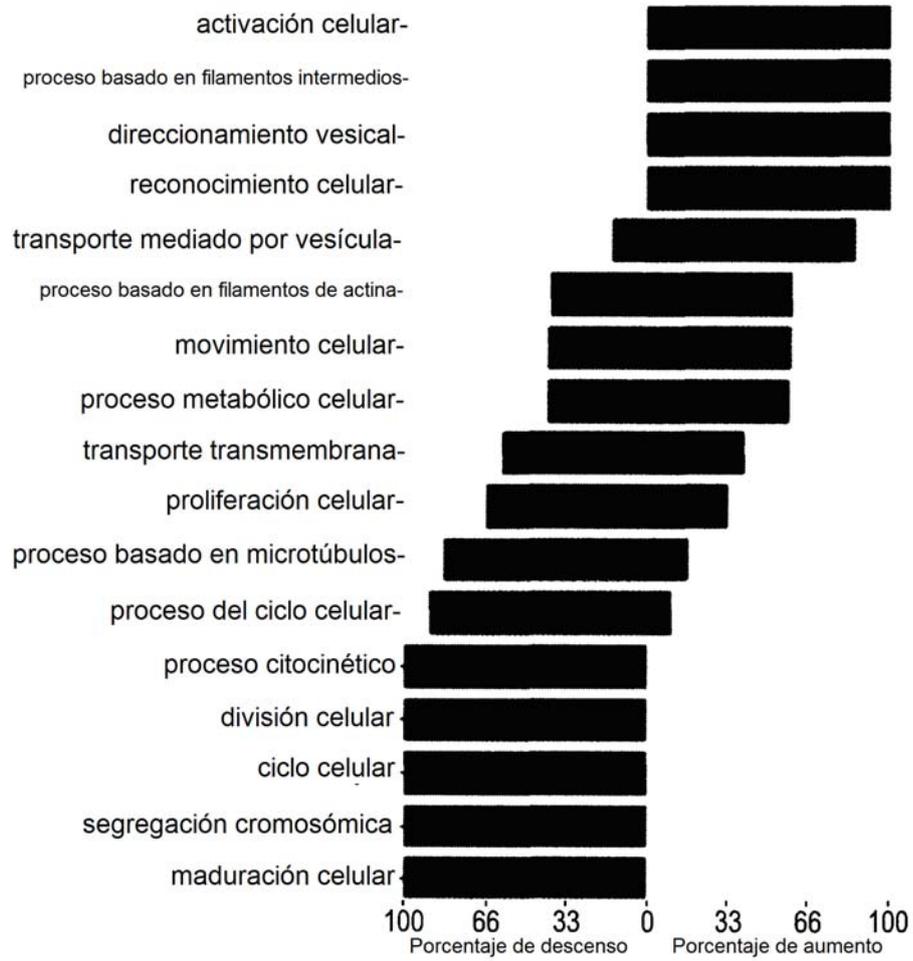


FIG. 10C

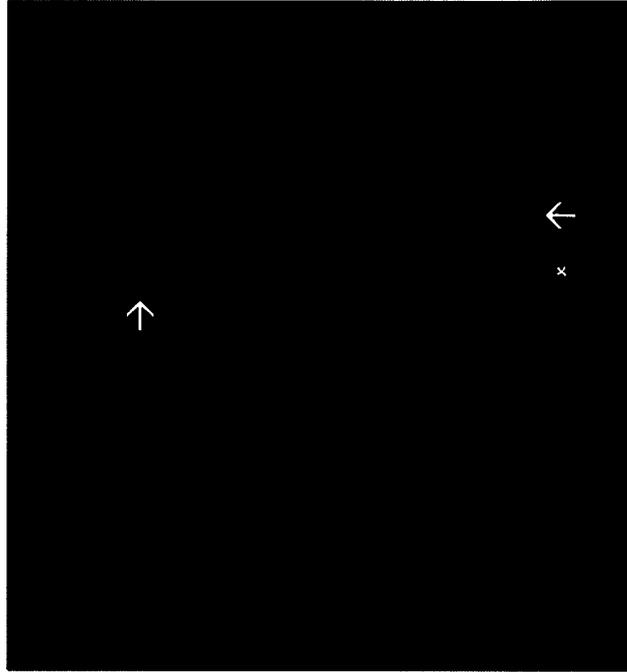


FIG. 11B



FIG. 11A

FIG. 12B

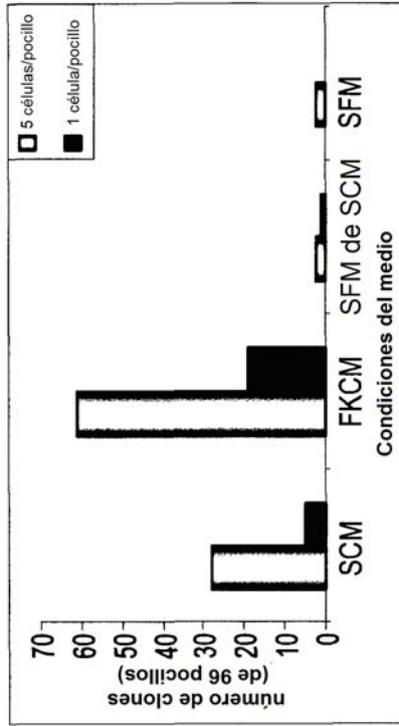


FIG. 12A

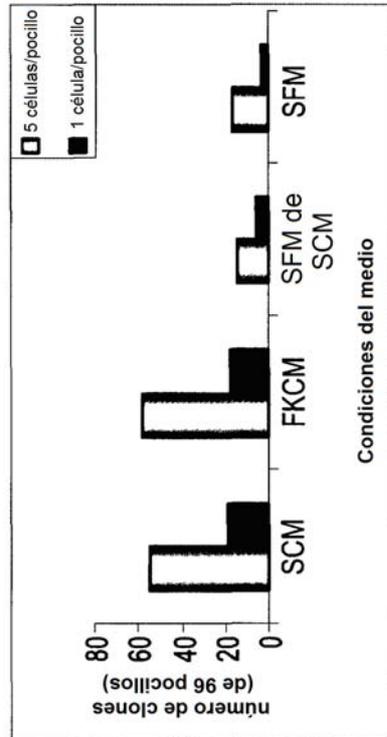
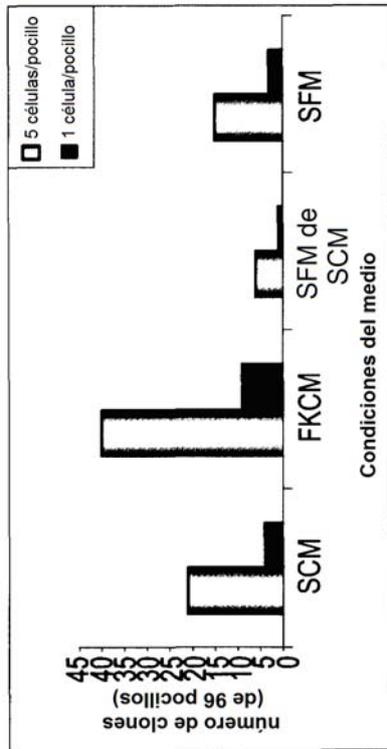


FIG. 12C

FIG. 13A



FIG. 13B



D SFM de SCM



FIG. 13C



FIG. 13D

FIG. 13C

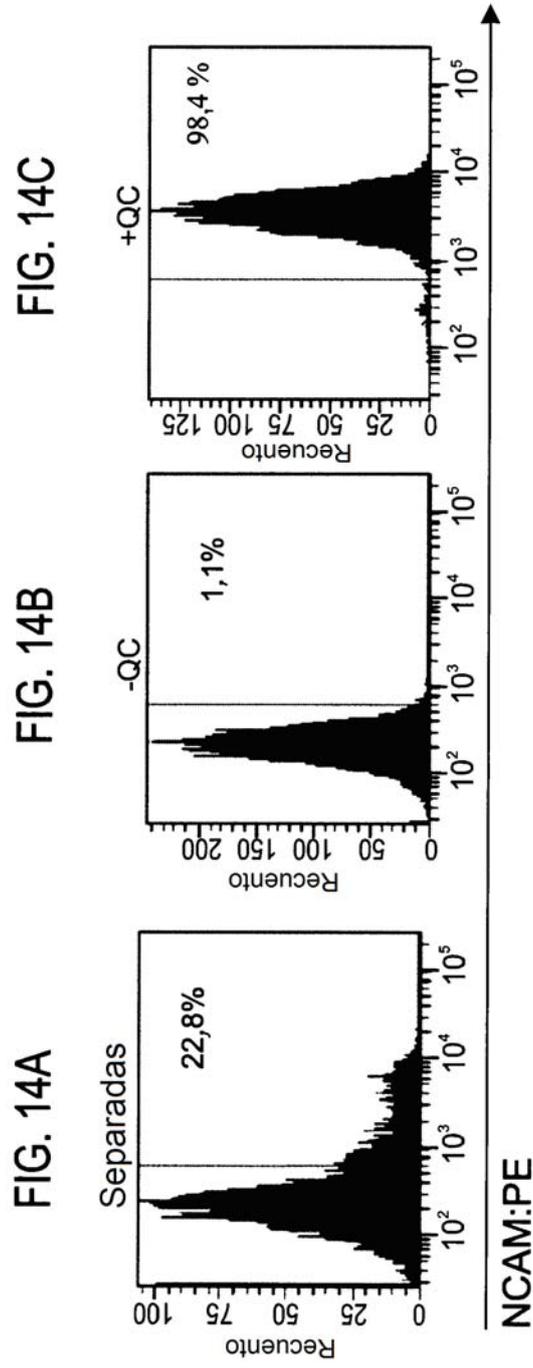


FIG. 15B

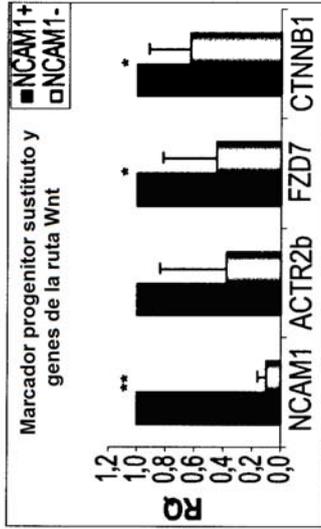


FIG. 15D

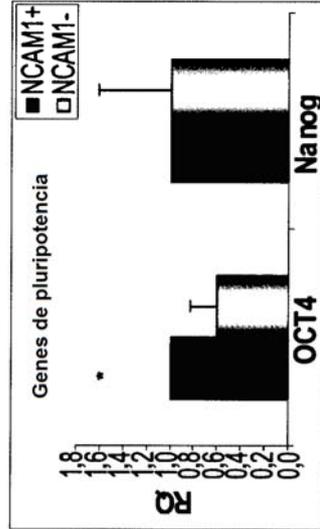


FIG. 15A

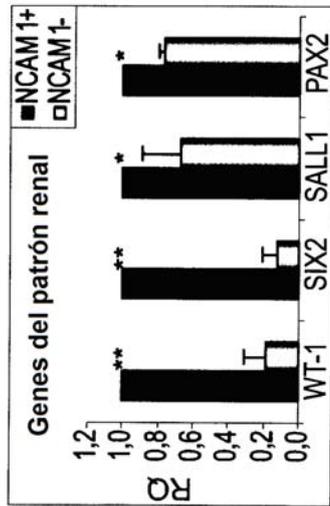


FIG. 15C

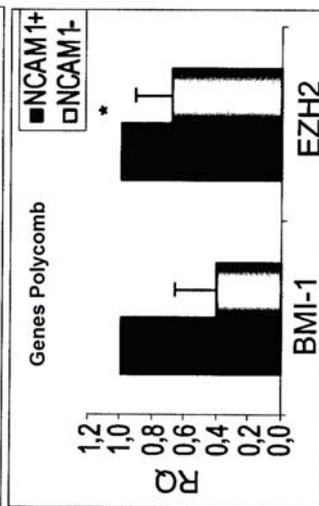


FIG. 15E

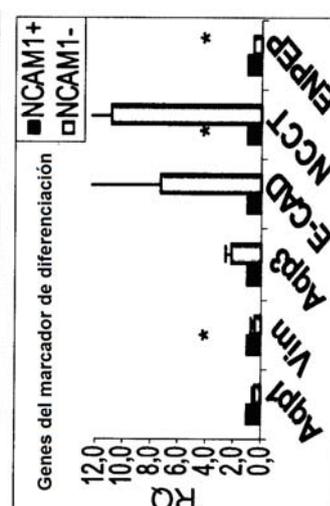


FIG. 16A

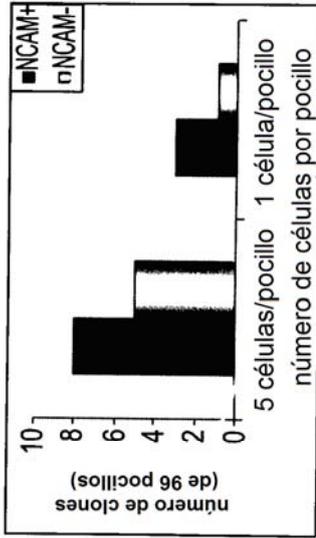


FIG. 16B

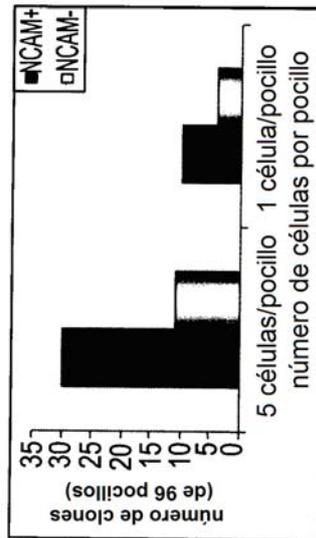


FIG. 16C

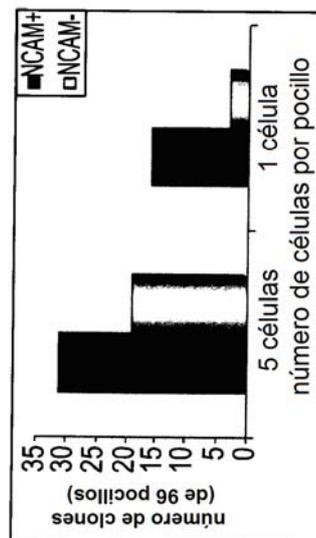
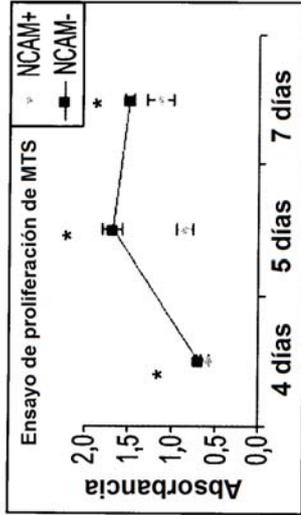
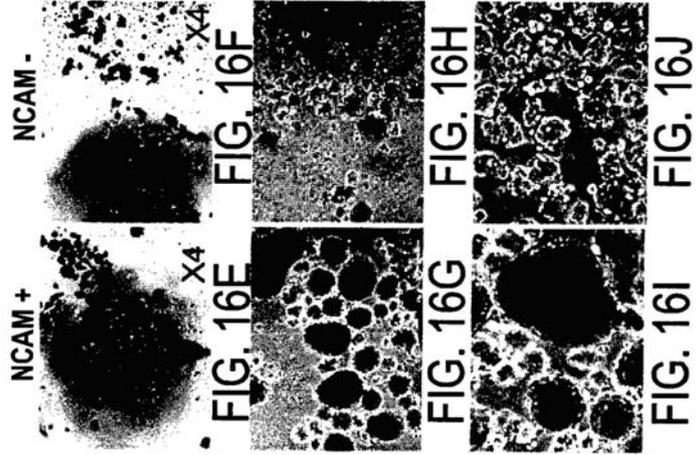


FIG. 16D



Ensayo de formación de esferas



Esferoides

Monocapa

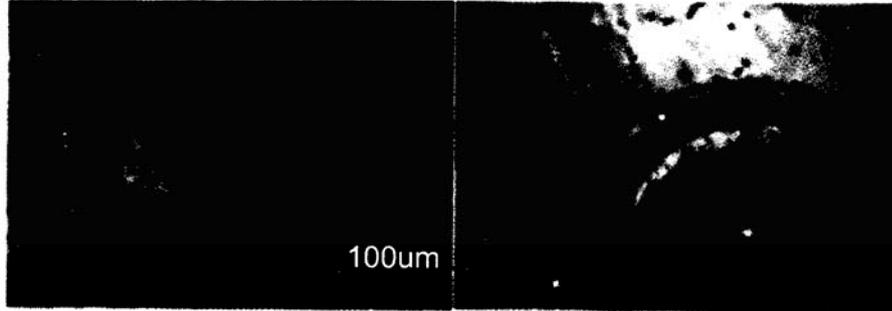


FIG. 17A

FIG. 17B

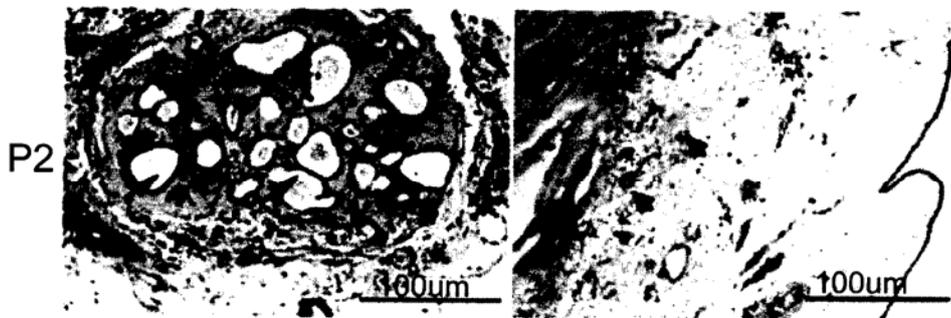


FIG. 17C

FIG. 17D

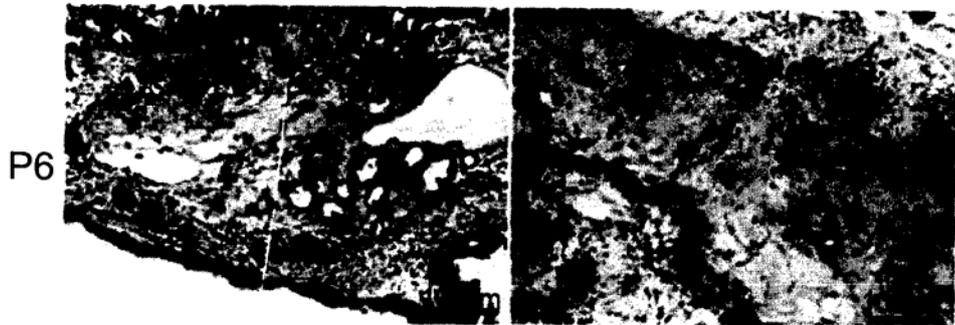


FIG. 17E

FIG. 17F

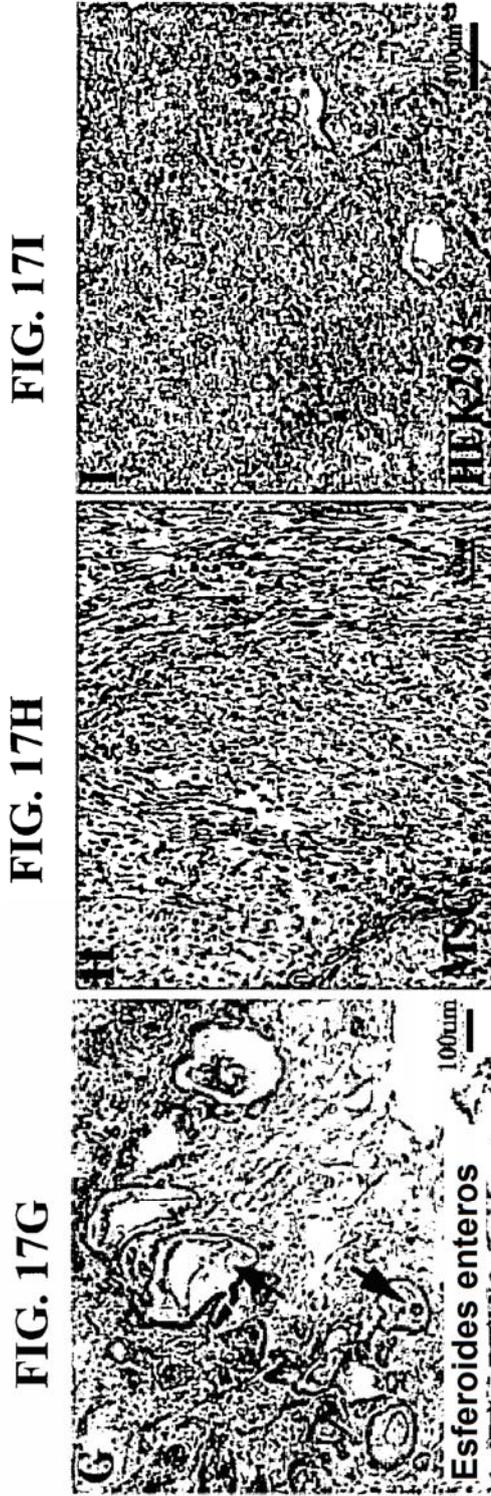


FIG. 17I

FIG. 17H

FIG. 17G

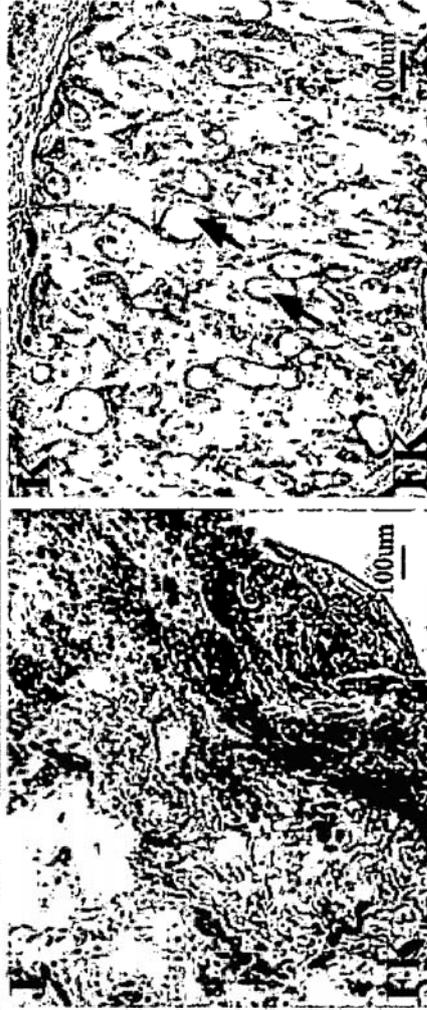


FIG. 17K

FIG. 17J

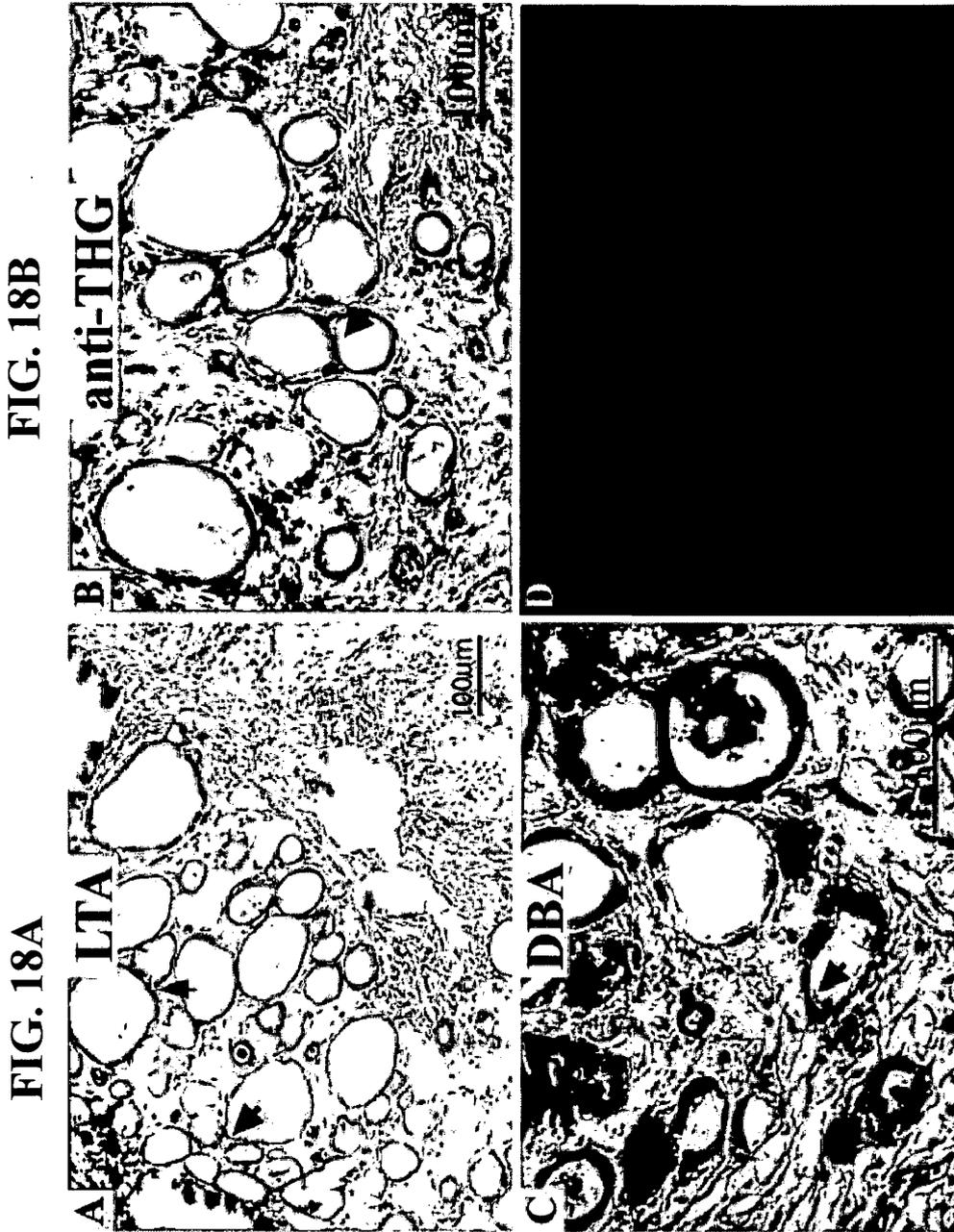


FIG. 18B

FIG. 18A

FIG. 18D

FIG. 18C

FIG. 19A



FIG. 19B



FIG. 19C



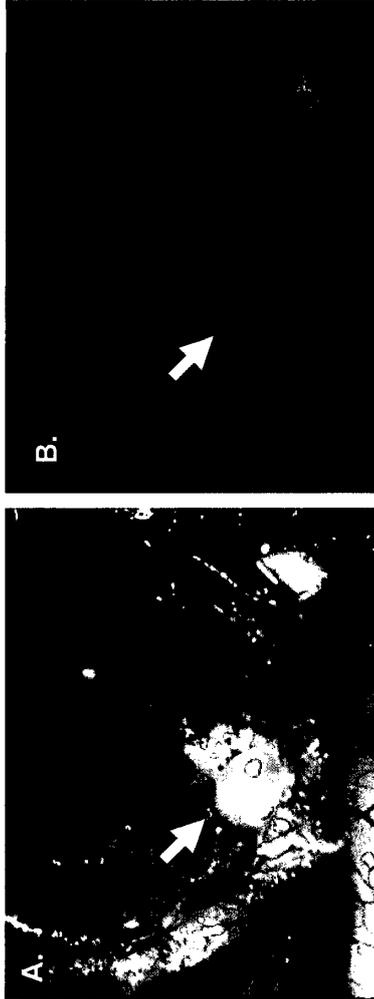


FIG. 20A

FIG. 20B



FIG. 20C



FIG. 20D

FIG. 20E

FIG. 20F