

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 725 502**

51 Int. Cl.:

C07K 14/505 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.06.2008 PCT/US2008/007161**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2008 WO08153970**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.06.2008 E 08768234 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 2162529**

54 Título: **Terapia celular selectiva para el tratamiento de la insuficiencia renal**

30 Prioridad:

08.06.2007 US 942716 P

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

24.09.2019

73 Titular/es:

**WAKE FOREST UNIVERSITY HEALTH SCIENCES
(100.0%)
391 Technology Way, Suite 199
Winston-Salem NC 27101, US**

72 Inventor/es:

**ATALA, ANTHONY y
YOO, JAMES**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 725 502 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

Terapia celular selectiva para el tratamiento de la insuficiencia renal

5 Campo de la invención

La presente invención está en el campo de la terapia celular selectiva para la restauración de una función orgánica.

10 Antecedentes de la invención

10 La insuficiencia renal crónica se caracteriza por una pérdida gradual de la función renal, y puede progresar eventualmente a un estado final de insuficiencia renal, en el que el riñón no funciona más tiempo al nivel para sostener el cuerpo. La insuficiencia renal de estadio final es una enfermedad devastadora que implica múltiples órganos en los individuos afectados. La causa más común de la enfermedad renal en estadio final en los EE. UU. es la diabetes.

20 Una de las funciones que lleva a cabo el riñón es la producción de eritropoyetina (EPO). Cuando el riñón está funcionando apropiadamente, una baja oxigenación tisular en el intersticio renal estimula las células intersticiales para que produzcan EPO. La EPO secretada a su vez estimula la producción de glóbulos rojos en la médula ósea, que recuperan la tensión de oxígeno tisular a niveles normales. La anemia causada por la hematopoyesis ineficaz es uno de los resultados inevitables de la insuficiencia renal crónica debido a la disminución de la capacidad renal para producir EPO. También se ha expuesto que la EPO protege contra el estrés oxidativo y la apoptosis.

25 El riñón es el productor primario de EPO en el cuerpo y por lo tanto es un objetivo primario del tratamiento de la anemia inducida por insuficiencia renal. Aunque la diálisis puede prolongar la supervivencia en muchos pacientes con un estadio final de enfermedad renal, solo el trasplante renal puede actualmente restaurar la función normal. Sin embargo, el trasplante renal está gravemente limitado por una escasez de donantes crítica.

30 Los tratamientos que se utilizan para aliviar la anemia asociada con la insuficiencia renal a lo largo de los años incluyen las transfusiones repetidas de glóbulos rojos y la administración de testosterona y otros esteroides anabólicos. Sin embargo, ninguna de estas modalidades ha sido completamente satisfactoria. Los pacientes que recibían transfusiones repetidas se sometían a una sobrecarga de hierro, y pueden desarrollar anticuerpos contra antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad. La testosterona tiene un efecto mínimo en la eritropoyesis en la médula ósea, y se asocia con efectos secundarios virilizantes, no deseados.

35 Los esfuerzos previos para mitigar la anemia asociada a la insuficiencia renal incluían la administración de EPO recombinante purificada (véase, por ejemplo, la Pat. de EE. UU. N.º 6.747.002 de Cheung et al., Pat. de EE.UU. N.º 6.784.154 de Westenfelder). Sin embargo, la administración de EPO recombinante solamente eleva los niveles de EPO en la sangre temporalmente, y puede dar lugar a deficiencia de hierro. Las estrategias de terapia génica también se han perseguido, en las que se produce EPO utilizando células huésped transfectadas (véase, por ejemplo, la Pat. de EE. UU. N.º 5.994.127 de Selden et al., la Pat. de EE. UU. N.º 5.952.226 de Aebischer et al., la Pat. de EE. UU. N.º 6.777.205 de Carcagno et al.; Rinsch et al. (2002) *Kidney International* 62:1395-1401). Sin embargo, estas estrategias implican la transfección de células no renales, y necesita técnicas tales como la encapsulación celular para evitar el reconocimiento antigénico y el rechazo inmunitario al trasplantarlas. También, la transfección con un ADN exógeno puede ser inestable, y las células pueden perder su capacidad para expresar EPO a lo largo del tiempo.

50 Las estrategias basadas en células renales para el remplazo de tejido renal están limitadas por la necesidad de identificar y expandir las células renales en cantidades suficientes. Además, el cultivo de células renales con fines de modificación de tejido renal es particularmente difícil, debido a la heterogeneidad celular y estructural única. El riñón es un órgano complejo con múltiples funciones incluyendo la excreción de desechos, la homeostasis corporal, el equilibrio electrolítico, el transporte de solutos, así como la producción de hormonas.

55 Sigue existiendo una gran necesidad de opciones de tratamiento alternativas para aliviar la anemia causada por el fallo de células renales para producir suficientes cantidades de eritropoyetina.

Sumario de la invención

60 De acuerdo con un aspecto de la invención se proporciona un método de producción de una población aislada de células productoras de EPO de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. En particular, el método comprende las etapas de:

65 proporcionar células renales diferenciadas que comprenden células intersticiales peritubulares;
cultivar dichas células renales diferenciadas *in vitro*, en las que dichas células intersticiales peritubulares se cultivan en co-cultivo con otros tipos de células renales; y
el replicado de dichas células renales diferenciadas, en el que dichas células producen EPO después del

replicado;

produciendo de esta manera una población aislada de células productoras de EPO.

También se describe en el presente documento en los Ejemplos de la presente divulgación poblaciones aisladas de células renales recolectadas a partir de células diferenciadas del riñón que se han pasado y/o expandido *in vitro*. En algunos ejemplos, las células renales incluyen células intersticiales peritubulares y/u otras células endoteliales del riñón. En algunos ejemplos, las células renales consisten o consisten esencialmente en células intersticiales peritubulares y/o endoteliales del riñón recolectadas del tejido renal y pasadas *in vitro*. En algunos ejemplos, las células producen eritropoyetina (EPO). En ejemplos adicionales, las células renales se seleccionan por su producción de EPO.

También se describen métodos de producción de una población aislada de células productoras de EPO, que incluye las etapas de: 1) recolectar células renales diferenciadas; y 2) el replicado de las células renales diferenciadas, en el que las células producen EPO después de dicho replicado, produciendo de esta manera una población aislada de células productoras de EPO. En algunas realizaciones los métodos incluyen adicionalmente la etapa de seleccionar las células renales diferenciadas por la producción de EPO. En algunas realizaciones, la etapa de replicado incluye el cultivo de células renales diferenciadas en un medio que comprende insulina transferrina selenio (ITS).

Los métodos de tratamiento de una enfermedad renal u otra dolencia, cuya enfermedad o dolencia dé como resultado una disminución de la producción de EPO en un sujeto (por ejemplo, un paciente) que necesite del mismo también se describen, que incluyen las etapas de: 1) proporcionar una población aislada de células que producen EPO; y 2) la administración de la población al sujeto (por ejemplo, en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad renal y/o la disminución de la producción de EPO), de manera que las células productoras de EPO producen EPO *in vivo*. En algunos ejemplos, la etapa de provisión se lleva a cabo recolectando células renales diferenciadas del riñón y replicando las células *in vitro*. En algunos ejemplos, la población de células renales productoras de EPO incluye, consiste o consiste esencialmente en células endoteliales peritubulares diferenciadas y/o células intersticiales recolectadas de entre células diferenciadas del riñón y que se han pasado *in vitro*. En algunos ejemplos, la población se proporciona en un vehículo adecuado (por ejemplo, un gel de colágeno) para la administración. En algunos ejemplos, la etapa de administración se lleva a cabo implantando la población de células en el riñón del paciente. En algunos ejemplos, la etapa de administración se lleva a cabo inyectando por vía subcutánea o implantando dicha composición. En algunas realizaciones, las células productoras de EPO son humanas.

Se describe adicionalmente poblaciones aisladas de células que incluyen células renales humanas diferenciadas recolectadas de tejido renal humano y pasadas *in vitro*. En algunos ejemplos, las células renales consisten o consisten esencialmente en células intersticiales peritubulares y/o endoteliales del riñón recolectadas del tejido renal y pasadas *in vitro*. En algunas realizaciones, las células renales humanas diferenciadas producen eritropoyetina (EPO). En algunos ejemplos, se han hecho replicados con las células renales humanas de 1-20 veces. En algunos ejemplos, las células renales humanas se han pasado al menos 3 veces. En algunos ejemplos, la población se ha seleccionado por la producción de EPO. Algunos ejemplos se someten a la condición de que las células no se hayan transfectado con un ADN exógeno que codifique un polipéptido.

Las composiciones que comprenden la población de células renales humanas como se describen en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable, también se describen. En algunos ejemplos, el vehículo comprende colágeno.

Otro aspecto de la presente divulgación es el uso de los métodos como se describen en el presente documento para la preparación de una composición o medicamento para su uso en el tratamiento o para llevar a cabo un método de tratamiento como se describen en el presente documento (por ejemplo, para tratar una enfermedad renal u otra dolencia que dé como resultado la disminución de la producción de EPO), o para hacer un artículo de producción como se describe en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1. Mecanismo de la producción de eritropoyetina (EPO). Las células intersticiales peritubulares renales del riñón detectan los niveles bajos de oxígeno en la sangre, y se secreta la EPO en la sangre. La EPO estimula la proliferación y diferenciación de progenitores eritroides en reticulocitos, y evita la apoptosis, causando que entren más reticulocitos en la sangre circulante. Los reticulocitos se diferencian en eritrocitos, aumentando el tamaño eritrocitario. De esta manera aumenta el suministro de oxígeno a los tejidos.

FIG. 2. Se confirmó la inmunoreactividad de la eritropoyetina intracelular en el cultivo primario de células renales en el replicado 1 (P1), replicado 2 (P2) y replicado 3 (P3), en comparación con el control negativo (X400).

FIG. 3. Imágenes microscópicas de las células que expresan eritropoyetina en tejido renal (panel de la izquierda) y células renales cultivadas (panel de la derecha).

FIG. 4. Cuantificación de las células productoras de eritropoyetina (EPO). El número de células que expresan EPO disminuía con los siguientes replicados (* $p < 0,05$).

FIG. 5. Análisis de transferencia de Western de la EPO proteica (34 kDa) detectada en extractos celulares solubilizados con detergente de las células renales cultivadas en los replicados primarios tempranos (P0-P3).

FIG. 6. Análisis de la expresión de EPO utilizando FACS. Fila superior: células de ratón, replicados 0-3. Fila

inferior: células de rata, replicados 0-3.

Figura 7A-7B. Caracterización celular renal de ratón. La expresión de EPO se confirmó mediante inmunofluorescencia (**Figura 7A**) (se utilizaron células KNRK como control positivo). También se detectaron los marcadores renales GLEPP1 y Tamm Horsfall (**Figura 7B**).

Figura 8. Caracterización celular renal de rata. Las células renales de rata cultivadas tienen distintas morfologías celulares que se muestran mediante microscopía de contraste (paneles de la izquierda), y que expresan los marcadores renales GLEPP1 y Tamm Horsfall (paneles de la derecha).

Figura 9. Expresión de EPO en células HepG2 se demostró por transferencia de western y comparado con la expresión de EPO en el tejido renal.

Figura 10. Expresión de EPO proteica en células cultivadas en condiciones hipóxicas. Se cultivaron células de riñón de rata Lewis y células HepG2 en condiciones normales e hipóxicas, y se evaluó la producción de EPO mediante transferencia de Western de las células. 34 kDa = EPO; 43 kDa = β -Actina.

Figura 11. Expresión de EPO proteica en el medio de cultivo en condiciones hipóxicas. Se ensayó la EPO en el medio de cultivo de células renales de rata Lewis y células HepG2 mediante transferencia de Western. 34 kDa = EPO; 43 kDa = β -Actina.

Figura 12. Se prepararon lisados de proteína total de las células renales primarias de rata en los replicados 1 y 2. Se procesaron placas de muestras normóxicas (NC), muestras en un 3 % de O₂ y un 7 % de O₂ y se ejecutaron en un 10 % de SDS-PAGE. Se utilizó la línea celular KNRK como control positivo.

Figura 13. Medición de la EPO en concentrados de medio mediante transferencia de Western. Las células primarias cultivadas de las ratas Lewis se cultivaron hasta cerca de la confluencia en cada replicado en placas de 10 cm. Las células se privaron con KSFM durante 24 h y entonces se colocaron en una cámara hipóxica (con un 1 % de O₂) durante 24, 48 o 72 h. A continuación de la incubación en hipoxia, se recolectó el medio y se concentró con un dispositivo de ultracentrifugación amicon mwco 10K (Millipore). Entonces se cargaron 40 ug de proteína total en un gel de poliacrilamida al 10 %. Se utilizaron células KNRK como control positivo.

Figura 14. Análisis histológico de los implantes recuperados que muestran que las células renales sobrevivían y formaban tejido *in vivo*. La presencia de células productoras de EPO se confirmó inmunohistoquímicamente utilizando anticuerpos específicos de EPO (x400). Panel de la izquierda: densidad celular inicial de 1×10^6 células/inyección. Panel de la derecha: densidad celular inicial de 1×10^6 células/inyección. Fila superior de cada panel: 2 semanas. Fila inferior de cada panel: 4 semanas.

Figura 15. Efecto del medio de cultivo y la hipoxia en las células renales primarias medido por PCR en tiempo real. Las células renales primarias (p0) se cultivaron hasta un 80 % de confluencia en placas de 10 cm. Se cultivaron tres placas de células con DMEM o KSFM libres de suero y se colocaron en una cámara hipóxica con un 3 % de O₂. Después de 24 h, se procesaron las muestras para la síntesis de ARN total y ADNc. La PCR en tiempo real se hizo por triplicado, y las muestras se cuantificaron con respecto a la muestra normóxica.

Figura 16. Efecto de la hipoxia en las células renales primarias medido por PCR en tiempo real. Se cultivaron las células renales primarias (replicados 0 y 2) hasta un 80 % de confluencia en placas de 10 cm. Las células se cultivaron entonces en KSFM libre de suero y se colocaron en una cámara hipóxica al 1 % de O₂. Después de 24, 48 o 72 h, las muestras se procesaron para el ARN total y la síntesis ADNc. La PCR en tiempo real se hizo por triplicado, y las muestras se cuantificaron con respecto a la muestra normóxica.

Figura 17. Efecto de la hipoxia en células renales primarias medido por PCR en tiempo real. Las células renales primarias (replicado 0) se cultivaron hasta un 80 % de confluencia en placas de 10 cm. Las células se colocaron entonces en una cámara hipóxica con un 1 % de O₂ durante hasta 24 h. Las muestras se procesaron entonces para el ARN total y la síntesis de ADNc. La PCR en tiempo real se hizo por triplicado, y las muestras se cuantificaron con respecto a la muestra normóxica.

Figura 18. Las células renales humanas primarias se expandieron. Se muestran las células de los replicados 2, 4, 7 y 9.

Figura 19. Las células renales humanas primarias se mantuvieron a través de 20 doblajes.

Figura 20. Caracterización de células renales humanas. Las células GLEPP1 y positivas a EPO están presentes en la población.

Figura 21. Suministro a las células renales humanas *in vivo* con un vehículo de colágeno a 20 mg/ml. En la recuperación, 3 semanas después de la inyección, el volumen de la inyección se había mantenido, y la neovascularización estaba presente.

Figura 22. Inyección de colágeno con células renales humanas cultivadas daba como resultado la formación de tejido que expresa EPO *in vivo*.

Descripción Detallada de las realizaciones preferidas

La terapia basada en células para la insuficiencia renal se puede abordar en dos direcciones: total y selectiva. Se describe en el presente documento el abordaje de terapia celular selectiva para conseguir la restauración de componentes orgánicos funcionales específicos.

Como se utiliza en el presente documento en la descripción de la invención y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de "un", "una" y "el" tienen la intención de incluir las formas plurales también, a menos de que el contexto indique claramente otra cosa. Además, los términos "aproximadamente" y "de manera aproximada" como se utilizan en el presente documento cuando se refieren a un valor medible tal como una cantidad de un compuesto, dosis, tiempo, temperatura, y similares, quiere decir que engloba variaciones del 20 %, 10 %, 5 %, 1 %, 0,5 %, o

incluso del 0,1 % de la cantidad especificada. También, como se utiliza en el presente documento, “y/o” o “/” se refiere y engloba a todas y cada una de las posibles combinaciones de uno o más de los artículos asociados enumerados, así como a la falta de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa (“o”).

5 “Tejido renal” es el tejido aislado o recolectado del riñón, cuyo tejido contiene células renales. En algunas realizaciones, las células renales son positivas para uno o más marcadores renales conocidos, por ejemplo, GLEPP1, Tamm Horsfall, etc. “Célula” o “células” pueden ser de cualquier especie adecuada, y en algunas realizaciones son de la misma especie que el sujeto en el que se implantan los tejidos que se producen por el proceso del presente documento. Las células de mamífero (incluyendo de ratón, rata, perro, gato, mono y células humanas) son en algunas realizaciones particularmente preferidas. “Aislado” como se utiliza en el presente documento significa que las células se colocan en condiciones distintas de su entorno natural. Los tejidos o células se “recolectan” cuando se aíslan inicialmente de un sujeto, por ejemplo, un explante primario.

15 Los “sujetos” son en general sujetos humanos e incluyen, pero no se limitan a, “pacientes”. Los sujetos pueden ser masculinos o femeninos y pueden ser de cualquier raza o etnia, incluyendo, pero sin limitarse a, raza blanca, afroamericana, africana, asiática, hispana, india, etc. Los sujetos pueden ser de cualquier edad, incluyendo, recién nacidos, neonatos, bebés, niños, adolescentes, adultos, y geriátricos.

20 Los sujetos también pueden incluir sujetos animales, particularmente sujetos mamíferos tales como caninos, felinos, bovinos, caprinos, equinos, ovinos, porcinos, roedores (por ejemplo, ratas y ratones), lagomorfos, primates no humanos, etc., para, por ejemplo, medicina veterinaria y/o fines de desarrollo farmacéuticos de fármacos.

25 Las células pueden ser singénicas (es decir, genéticamente idénticas o relacionadas estrechamente, de manera que se minimice el rechazo del tejido trasplantado), alogénicas (es decir, de un miembro no genéticamente idéntico de la misma especie) o xenogénicas (es decir, de un miembro de una especie diferente). Las células singénicas incluyen las que son autogénicas (es decir, del paciente que se va a tratar) e isogénicas (es decir, genéticamente idénticas, pero de un sujeto diferente, por ejemplo, de un gemelo idéntico). Las células se pueden obtener, por ejemplo, de un donante (sea vivo o un cadáver) o derivarse de una cepa celular establecida o línea celular. Las células se pueden recolectar de un donante, por ejemplo, utilizando técnicas de biopsia convencionales conocidas en la técnica.

30 El “cultivo primario” es el primer cultivo que se convierte en establecido después de la siembra de células desagregadas o explantes primarios en un vaso de cultivo. “Expansión” como se utiliza en el presente documento se refiere a un aumento del número de células viables. La expansión se puede conseguir, por ejemplo, “cultivando” las células a través de uno o más ciclos celulares en los que al menos una parte de las células se dividen para producir células adicionales.

35 “Replicado *in vitro*” o “replicado” se refiere a la transferencia o subcultivo de un cultivo celular a un segundo vaso de cultivo, lo que implica habitualmente la desagregación mecánica o enzimática, la resiembra, y a menudo la división en dos o más cultivos hijos, dependiendo de la tasa de proliferación. Si la población se selecciona por un genotipo o fenotipo particular, el cultivo se convierte en una “cepa celular” al subcultivarlo, es decir, el cultivo es homogéneo y posee las características deseables (por ejemplo, la capacidad para expresar EPO).

40 “Expresar” o “expresión” de EPO significa que se transcribe un gen que codifica EPO, y preferentemente se traduce. Normalmente, de acuerdo con la presente invención, la expresión de una región codificante de EPO dará como resultado la producción del polipéptido codificado, de manera que la célula es una “célula productora de EPO”. En algunas realizaciones, las células producen EPO sin una modificación adicional tal como la introducción de un gen exógeno. En algunas realizaciones, la invención se somete a la condición de que las células productoras de EPO no se modifican por la introducción de un gen exógeno y/o por un químico exógeno que estimule la producción de EPO.

45 50 En algunas realizaciones, se hacen replicados con las células una, dos o tres veces. En otras realizaciones más, las células se replican más de 3 veces. En algunas realizaciones, se hacen replicados con las células 1-2, 1-3 o 1-4 o más veces. En algunas realizaciones, se hacen replicados con las células 2-4 o 2-4 o más veces. En realizaciones adicionales, se hacen replicados con las células 5, 8, 10, 12 o 15 o más veces. En algunas realizaciones, se hacen replicados con las células 1, 2, 3 o 4 a 8, 10, 15 o 20 o más veces. El número de replicados que se utiliza se puede seleccionar, por ejemplo, por la producción relativa de EPO medida en la población celular después de cada replicado.

55 60 El crecimiento y expansión de las células renales es particularmente desafiantes debido a que estas células tienen la tendencia a detener el crecimiento y a una diferenciación temprana. Este desafío se supera en algunas realizaciones de la presente invención utilizando un medio específico para células renales que contenga aditivos que promuevan su crecimiento. En consecuencia, en algunas realizaciones, las células renales se cultivan en un medio que incluyen aditivos tales como factores de crecimiento y otros suplementos que promueven su crecimiento. Las células productoras de EPO se cultivan en co-cultivos con otros tipos de células renales.

65 En algunas realizaciones, las células renales se cultivan en Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (FBS) o suero de ternero fetal (FCS) y, opcionalmente, con

penicilina-estreptomina (P/S). En otras realizaciones, las células renales se cultivan en medio libre de queratinocitos (KSMF). En realizaciones adicionales, las células renales se cultivan en KSMF con uno o más de los siguientes aditivos: extracto de hipófisis bovina (BPE) (por ejemplo, 50 g/ml), factor de crecimiento epitelial (EGF) (por ejemplo, 5 ng/ml), solución antibiótica-antimicótica (GIBCO) (por ejemplo, 5 ml), suero fetal bovino (FBS) (Gemini Bio-Product) (por ejemplo, 12,5 ml del 2,5 %), e insulina transferrina selenio (ITS) (Roche) (por ejemplo, 50 mg para 5 ml de medio). Como entenderán los expertos en la técnica, en algunas realizaciones del medio anterior, la penicilina-estreptomina (P/S) y la solución antibiótica-antimicótica son intercambiables.

El replicado de las células renales de acuerdo con algunas realizaciones se puede conseguir utilizando procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden despegar utilizando tripsina/EDTA y transferirse a otras placas. Esto es un procedimiento convencional para muchos tipos de células. En resumen, en algunas realizaciones esto se puede conseguir mediante las siguientes etapas: 1) Retirar el medio. 2) Añadir 10 ml de PBS/EDTA (0,5 M) durante 4 minutos. Confirmar la separación de las uniones celulares con un microscopio de contraste de fases. 3) Retirar el PBS/EDTA y añadir 7 ml de Tripsina/EDTA. 4) Añadir 5 ml de medio cuando el 80-90 % de las células ascienden bajo el microscopio. 5) Aspirar la suspensión celular en un tubo de ensayo de 15 ml. 6) centrifugar las células a 1000 rpm durante 4 minutos. 7) Retirar el sobrenadante. 8) Resuspender las células en 5 ml de medio. 9) Pipetear 100 μ l de la suspensión celular y llevar a cabo una tinción con azul tripano para la viabilidad celular. 10) Contar el número de células en un hematocitómetro. 11) Hacer alícuotas con un número deseado de células en la placa y llevar al volumen de medio hasta un total de 10 ml. 12) Colocar las células en la incubadora.

La "selección" se puede basar en cualquiera de las propiedades únicas que distingan un tipo celular de otro, por ejemplo, la densidad, tamaño, marcadores únicos, rutas metabólicas únicas, necesidades nutricionales, expresión proteica, excreción proteica, etc. Por ejemplo, las células se pueden basar en la densidad y tamaño con el uso de gradientes de centrifuga. Los marcadores únicos se pueden seleccionar con clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), clasificación con perlas inmunomagnéticas, clasificación celular activadas por magnetismo (MACS), selección, etc. Las rutas metabólicas únicas y las necesidades nutricionales se pueden aprovechar variando la composición y/o la cantidad de ingredientes nutritivos del medio en el que se cultivan las células, particularmente en un entorno libre de suero. La expresión y/o excreción proteica se puede detectar con distintos ensayos, por ejemplo, ELISA.

Una "célula productora de EPO" se refiere a células diferenciadas, de las cuales al menos una parte produce EPO (por ejemplo, al menos un 20, 30, 40, o un 50 % o más, o más preferentemente un 60, 70, 80, o 90 % o más de las células producen EPO). En algunas realizaciones, las células producen EPO sin una modificación adicional tal como la introducción de un gen exógeno y/o mediante un químico exógeno que estimule la producción de EPO. Las células se recolectan de, las células intersticiales peritubulares del riñón. En algunas realizaciones, las células se seleccionan por su capacidad para producir EPO. Las células se expanden en número mediante replicados. En algunos ejemplos de la divulgación, se pueden utilizar células con la función específica de la producción de EPO del riñón y de otras fuentes. Por ejemplo, la EPO también se produce normalmente en el hígado.

En el riñón, se sabe en general que la EPO se produce por las células intersticiales peritubulares (FIG. 1). En algunas realizaciones, una población aislada de células renales diferenciadas comprende, consisten en o consisten esencialmente en células intersticiales peritubulares del riñón, que consisten en o consisten esencialmente en un 80, 90, 95 o 99 por ciento o más, o no más de un 20, 10, 5 o 1 por ciento o menos, en número de otros tipos celulares. En otras realizaciones, la población aislada de células renales diferenciadas incluye otros tipos celulares. En otras realizaciones, la población aislada de células renales diferenciadas incluye otros tipos celulares, por ejemplo, células endoteliales peritubulares.

En algunas realizaciones, la población aislada de células renales diferenciadas comprende, consiste en, o consisten esencialmente en células renales que se seleccionan por la producción de EP, que consisten en o consisten esencialmente en 80, 90, 95 o 99 por ciento o más, o no más de un 20, 10, 5 o 1 por ciento o menos, en número de células que no expresan la EPO. La selección se puede conseguir seleccionando las células que expresan EPO utilizando marcadores específicos. En algunas realizaciones, las células pueden incluir distintos tipos de células renales, junto con las células que expresan la EPO. En realizaciones adicionales, toda la colonia de células renales se puede utilizar para la expansión y tratamiento.

En algunas realizaciones, la población aislada de células renales diferenciadas tiene una "longevidad" de manera que son capaces de crecer a través de al menos 5, 10, 15, 20, 25 o 30 o más doblajes de la población cuando se cultivan *in vitro*. En algunas realizaciones, las células son capaces de la proliferación a través de 40, 50 o 60 doblajes de la población o más cuando se cultivan *in vitro*.

"Diferenciadas" se refiere a células o una población que contiene células que tienen funciones especializadas, por ejemplo, la producción de EPO y/o la expresión de marcadores conocidos de células diferenciadas (por ejemplo, marcadores de células renales GLEPP1 y/o Tamm Horsfall). En este sentido, no son células progenitoras ni madre. Algunas realizaciones de la presente invención se someten a la condición de que no se hacen replicados de las células diferenciadas recolectadas en condiciones para crear una población de células menos especializadas.

De manera alternativa, en otras realizaciones, las células se cultivan para producir líneas celulares, que más tarde se pueden diferenciar para producir células más especializadas. El establecimiento de "líneas celulares" en oposición a las cepas celulares, es por que son y mucho no diferenciadas, aunque se pueden diferenciar en un linaje particular. La propagación natural favorece el fenotipo proliferativo, y en algunas realizaciones, las células pueden necesitar una reinducción de la diferenciación, por ejemplo, por alteración de las condiciones de cultivo. Existen varios factores de diferenciación conocidos en la técnica que pueden inducir la diferenciación en líneas celulares (por ejemplo, citocinas tales como la epimorfina y HGF, vitaminas, etc.).

10 Métodos de tratamiento

En algunos ejemplos de la divulgación, las células que producen EPO se administran a un sujeto que tiene necesidad de las mismas (por ejemplo, mediante inyección) en el riñón (por ejemplo, en la corteza o en la médula). En otros ejemplos, las células que producen EPO se administran en otras áreas del cuerpo, por ejemplo, el hígado, peritoneo, etc. En algunos ejemplos, las células que producen EPO se administran por vía subcutánea, subcapsular, etc. En ejemplos adicionales, las células que producen EPO se administran por implante de un sustrato (por ejemplo, un armazón de colágeno en gel) que contiene dichas células que producen EPO descritas en el presente documento. En otros ejemplos más, las células productoras de EPO se administran mediante implante de un sustrato (por ejemplo, un armazón de gel de colágeno) que contiene dichas células productoras de EPO descritas en el presente documento. En otros ejemplos más, las células productoras de EPO se administran mediante un acceso vascular (por ejemplo, de manera sistémica o local).

Las enfermedades que se pueden tratar con los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, anemias. Las anemias incluyen, pero no se limitan a, las que se asocian con una insuficiencia renal o enfermedad renal en último estadio, las anemias producidas por quimioterapias o radiación, las anemias de trastornos crónicos, por ejemplo, infecciones crónicas, enfermedades autoinmunitarias, artritis reumatoide, SIDA, enfermedades malignas, anemia del neonato prematuro, anemia por hipotiroidismo, anemia por malnutrición (por ejemplo, por deficiencia de hierro), y anemias asociadas con trastornos sanguíneos.

"Tratar" se refiere a cualquier tipo de tratamiento que proporciona un beneficio a un paciente, por ejemplo, un paciente que sufre o está en riesgo de desarrollar una enfermedad (por ejemplo, una enfermedad renal, etc.). El tratamiento incluye acciones que se toman y acciones que no se toman con el fin de mejorar la afección del paciente (por ejemplo, el alivio de uno o más síntomas), el retraso de la aparición o progresión de la enfermedad, etc.

Otros sistemas endocrinos se pueden beneficiar de las terapias desveladas en el presente documento, por ejemplo, la terapia con células productoras de vitamina D o el sistema angiotensina. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de EE. UU. N.º 2005/0002915 de Atala et al. Se pueden utilizar células con una función específica del riñón y otras fuentes, es decir, células que producirían funciones de diana. Por ejemplo, la EPO se produce también normalmente en el hígado.

Preferentemente, las células se mezclan o se siembran en un vehículo farmacéuticamente aceptable antes de la administración. "Farmacéuticamente aceptable" significa que el compuesto o composición son adecuados para la administración a un sujeto para conseguir los tratamientos descritos en el presente documento, sin efectos secundarios excesivamente perjudiciales a la luz de la gravedad de la enfermedad y necesidad del tratamiento. Dichas formulaciones se pueden preparar utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente de EE. UU. 2003/0180289; Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro, editor, 20ª ed. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, Pa., 2000. El vehículo puede ser un sólido o un líquido o ambos (por ejemplo, hidrogeles), y se pueden formular con las células como una formulación de dosis unitaria. En algunas realizaciones, las células se proporcionan como una suspensión en el vehículo para reducir la coagulación de las células. En otras realizaciones las células se siembran en un armazón o matriz biodegradable.

En algunas realizaciones, las células se mezclan con un gel adecuado para la administración. Los geles adecuados que se pueden utilizar en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, agar, colágeno, fibrina, hidrogeles, etc. Además de los geles también se pueden utilizar en la presente invención otros compuestos de soporte. Los análogos de matriz extracelular, por ejemplo, se pueden combinar con geles de soporte para optimizar o funcionalizar el gel. También se pueden introducir uno o más factores de crecimiento en las suspensiones celulares.

Las formulaciones de la divulgación incluyen las de administración parenteral (por ejemplo, por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal) mediante inyección o implante. En un ejemplo, la administración se lleva a cabo de manera intravascular, sea por inyección simple o mediante inyección a través de un catéter posicionado en un vaso sanguíneo adecuado, tal como una arteria renal. En algunos ejemplos, la administración se lleva a cabo mediante "infusión", en la que las composiciones se introducen en el cuerpo a través de una vena (por ejemplo, la vena porta). En otros ejemplos, la administración se lleva a cabo como un injerto en un órgano o tejido que se va a aumentar como se ha expuesto anteriormente, por ejemplo, el riñón y/o el hígado.

Un "armazón o matriz biodegradable" es cualquier sustancia que no tenga efectos tóxicos o perjudiciales sobre la

función biológica y que sea susceptible de disgregarse en componentes elementales por un huésped. Preferentemente, el almacén o matriz es poroso para permitir el depósito celular tanto sobre como en los poros de la matriz. Dichas formulaciones se pueden preparar suministrando al menos una población celular en un almacén biodegradable para sembrar la población celular sobre y/o en el almacén. El almacén sembrado se puede implantar entonces en el cuerpo de un sujeto receptor.

En algunos ejemplos, las células se administran por inyección de las células (por ejemplo, en un vehículo adecuado) directamente en el tejido de un sujeto. Por ejemplo, las células se pueden inyectar en el riñón (por ejemplo, en el espacio subcapsular del riñón). Debido a que los efectos funcionales de la producción de EPO serán sistémicos, las células también se pueden administrar mediante inyección en otros tejidos (por ejemplo, en el hígado, por vía subcutánea, etc.).

Las células también se pueden suministrar de manera sistémica. En ejemplos adicionales, las células se suministran al tejido fuera del riñón (por ejemplo, en el hígado), ya que el resultado de los efectos funcionales de la producción de EPO será sistémico. Véase, por ejemplo, el "protocolo Edmonton", un método de suministro establecido en el que las células se infunden en la vena porta de un paciente (Shapiro et al. (2000) N Engl J Med 343:230-238).

De acuerdo con algunos ejemplos, las células que se administran al sujeto pueden ser singénicas (es decir, idénticas genéticamente o relacionadas estrechamente, de manera que se minimiza el rechazo del trasplante tisular), alogénicas (es decir, de un miembro no genéticamente idéntico de la misma especie) o xenogénicas (es decir, de un miembro de una especie diferente), como anteriormente, con respecto al sujeto que se va a tratar, dependiendo de otras etapas tales como la presencia o ausencia de encapsulación o la administración de terapia de supresión de las células. Las células singénicas incluyen las autogénicas (es decir, del sujeto que se va a tratar) e isogénicas (es decir, de un sujeto diferente pero genéticamente idéntico, por ejemplo, de un gemelo idéntico). Las células se pueden obtener de, por ejemplo, un donante (sea vivo o un cadáver) o derivadas de una cepa celular o línea celular establecida. A modo de ejemplo de un método que se puede utilizar para obtener células de un donante (por ejemplo, un receptor potencial de un injerto en bioalmacén), se pueden emplear técnicas de biopsia convencionales conocidas en la técnica. De manera alternativa, las células se pueden recolectar del sujeto, expandirse/seleccionarse *in vitro*, y reintroducirse en el mismo sujeto (es decir, autogénicas).

En algunos ejemplos, las células se administran en una cantidad terapéuticamente eficaz. La dosificación terapéuticamente eficaz de células variará de alguna manera de un sujeto a otro, y dependerá de factores tales como la edad, peso, y afección del sujeto y la vía de suministro. Dichas dosificaciones se pueden determinar de acuerdo con procedimientos conocidos para los expertos en la técnica. En general, en algunos ejemplos, se puede administrar una dosificación 1×10^5 , 1×10^6 o 5×10^6 hasta 1×10^7 , 1×10^8 o 1×10^9 células o más por sujeto, administradas juntas o de una sola vez o administradas con varias administraciones subdivididas. En otros ejemplos, se puede administrar una dosificación de entre $1-100 \times 10^8$ células por kilogramo de peso corporal del sujeto, administradas juntas de una vez o administradas subdivididas en varias administraciones. Por supuesto, se pueden hacer administraciones de seguimiento si fuera necesario.

Las células se pueden administrar de acuerdo con algunos ejemplos para conseguir un intervalo de hematocrito determinado. El intervalo de hematocrito diana o ideal puede variar de un sujeto a otro, dependiendo de, por ejemplo, las comorbilidades específicas. En algunos ejemplos el hematocrito diana es desde el 30-40 %, en algunos ejemplos el hematocrito diana es del 33-38 %, y en algunos ejemplos el hematocrito diana es del 33-36 %. Al administrarse las células como se describe en el presente documento, se puede medir el hematocrito y, si se desea o fuera necesario, se corrige, por ejemplo, mediante la implantación adicional de células y/u otros métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, suplementando EPO recombinante). Se pueden utilizar otros métodos de tratamiento para la anemia y/o la enfermedad renal en conjunción con los métodos de tratamiento proporcionados en el presente documento, por ejemplo, una dieta de gestión calórica-proteica adaptada.

En ejemplos adicionales, si se desea o fuera necesario, se puede administrar al sujeto un agente para la inhibición del rechazo del trasplante de las células administradas, tal como rapamicina, azatioprina, corticosteroides, ciclosporina y/o FK506, de acuerdo con técnicas conocidas. Véase, por ejemplo, R. Calne, Pat. de EE. UU. N.º 5.461.058, 5.403.833 y 5.100.899; véase también las Pat. de EE. UU. N.º 6.455.518, 6.346.243 y 5.321.043. Algunos ejemplos utilizan una combinación de implante e inmunosupresión, que minimiza el rechazo del injerto. El implante se puede repetir según se necesite para crear una masa adecuada de tejido trasplantado.

La presente invención se explica con más detalle en los siguientes Ejemplos no limitantes.

Ejemplos

La anemia es un resultado inevitable de la insuficiencia renal crónica debido a la disminución de la capacidad del riñón para producir eritropoyetina (EPO) por las células intersticiales peritubulares. Los inventores investigaron si el suplemento de células productoras de eritropoyetina sería una opción posible de tratamiento para la anemia inducida por la insuficiencia renal mediante el examen de la viabilidad de la selección y expansión de células productoras de eritropoyetina para la terapia basada en células.

Los siguientes ejemplos demuestran que las células productoras de EPO están presentes en las células renales recolectadas del riñón de ratón y rata. Además, las células que se aíslan y expanden utilizando los métodos descritos posteriormente incluyen células que expresan EPO en cada estadio de cultivo examinado. Además, el porcentaje actual de células que expresan el marcador de EPO en cultivo era consistente con la población celular presente en los tejidos renales normales (véase, Yamaguchi-Yamada et al., J Vet Med Sci, 67: 891, 2005; Sasaki et al., Biosci Biotechnol Biochem, 64:1775, 2000; Krantz, Blood, 77: 419,1991).

Ejemplo 1. Expansión de cultivos primarios de células renales. Se expandieron en cultivo células renales de ratones C57BL/6 de 7-10 días de edad. El riñón molido (1 riñón de ratón) se colocó en un tubo de 50 cc con 15 ml de colagenasa/dispasa (0,2 mg/ml). Los fragmentos de tejido renal se incubaron en un agitador a 37 °C durante 30 min con la mezcla de colagenasa/dispasa (0,2 mg/ml; 15 ml). Se añadió PBS estéril con Gelatina (20 ml) (con Gelatina (DIFCO) 2 mg/ml) a la solución de digestión. La mezcla se filtró a través de un filtro de 70 micrómetros para retirar los fragmentos de tejido sin diferir. La solución recolectada se mezcló bien (teniendo cuidado de no hacer burbujas de aire), y se dividió en dos tubos de 50 cc. Los tubos se centrifugaron a 1000(-1500) rpm durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y el aglomerado de cada tubo se resuspendió en 3 ml de medio KSFM. Se utilizó medio DMEM (con un 10 % de FBS, 5 ml P/S) para las células del estroma y KSFM con BPE, EGF, 5 ml de antibiótico-antimicótico, 12,5 ml de FBS (Gemini Bio-Product, 2,5 %), insulina transferrina selenio (Roche) (50 mg por 5 l de medio) con BPE y EGF para los componentes epiteliales. Se puede añadir también P/S o antibiótico-antimicótico (GIBCO). Cada tejido se sembró en una placa de 25 mm y se añadió el medio (un total de 3 ml).

Las células se mantuvieron cambiando el medio al día siguiente, y luego cada 2 días dependiendo de la densidad celular. Se hicieron replicados de las células cuando tenían un 80-90 % de confluencia mediante despegado utilizando tripsina/EDTA y se transfirieron a otras placas con las siguientes etapas: 1) retirada del medio. 2) adición de 10 ml de PBS/EDTA (0,5 M) durante 4 minutos. Confirmando la separación de las uniones celulares bajo un microscopio de contraste de fase. 3) Retirada del PBS/EDTA y adición de 7 ml de Tripsina/EDTA. 4) Adición de 5 ml de medio cuando el 80-90 % de las células se elevaban bajo el microscopio. 5) Aspiración de la suspensión celular en un tubo de ensayo de 15 ml. 6) Centrifugación de las células a 1000 rpm durante 4 minutos. 7) Retirada del sobrenadante. 8) Resuspensión de las células en 5 ml de medio. 9) Pipeteado de 100 ul de la suspensión celular u tinción con tripano azul para el ensayo de viabilidad. 10) Recuento del número de células en el hematocitómetro. 11) Separación en alícuotas del número deseado de células en la placa y hacer que el volumen de medio llegue a un total de 10 ml. 12) Colocación de las células en la incubadora.

De manera alternativa, se utilizó el siguiente protocolo. Los riñones de ratones macho C57BL/6 de 10 días de edad se recolectaron en solución tampón de Krebs (Sigma Aldrich, St. Louis, Mo. EE. UU.) que contenía un 10 % de antibiótico/antimicótico (Gibco Invitrogen, Carlsbad, Calif. EE. UU.) para evitar el riesgo de contaminación. Los riñones se transportaron inmediatamente a una campana de cultivo en la que se retiró la cápsula. La región medular del riñón se retiró y solo se utilizó el tejido cortical para aislar las células que se habían identificado previamente como células productoras de EPO (Maxwell et al., Kidney International, 44:1149,1993). El tejido renal se molió y digirió enzimáticamente utilizando Liberase Blendzyme (Roche, Mannheim, Alemania) durante 25 minutos a 37 grados Celsius en un baño de agua con agitado. El sobrenadante se retiró y el aglomerado celular se pasó a través de un filtro de 100 um para obtener una suspensión de células únicas para el cultivo.

Posteriormente, las células se colocaron en placas con una densidad de 5×10^5 células/ml en placas tratadas para cultivo tisular de 10 cm cargadas con el medio de cultivo. El medio de cultivo consistía en medio libre de suero con queratinocitos (KSFM) y medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) premezclados con una relación de 1:1. El medio DMEM premezclado contenía [3/4] de DMEM y [1/4] de mezcla nutritiva F12 de Ham suplementada con un 10 % de suero bovino fetal (FBS), un 1 % de penicilina/estreptomina, un 1 % de glutamina 100* (Gibco), 1 ml de hidrocortisona a 0,4 ug/ml, 0,5 ml de una solución de toxina del cólera a 10^{-10} M, 0,5 ml de una solución de insulina a 5 mg/ml, 13, 5 ml/500 ml de una solución de adenina de 1,2 mg/ml, 0,5 ml de una mezcla de 2,5 mg/ml de transferrina + 0,136 mg/ml de triyodotironina, y 0,5 ml de una solución de factor de crecimiento epidérmico (EGF) a 10 ug/ml. Todos los reactivos para el cultivo tisular se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo. EE. UU.) a menos de que se establezca otra cosa. Las células se incubaron a 37 °C bajo un 5 % de CO₂ con cambio de medio cada 3 días, y se subcultivaron las células para la expansión a una relación de 1:3 cuando conflúan.

Ejemplo 2. Caracterización por la producción de EPO. Las células de los primeros replicados (1, 2 y 3) se caracterizaron por la expresión de EPO utilizando inmunocitoquímica y análisis de transferencia de Western con anticuerpos específicos (anticuerpos policlonales anti-EPO de conejo, sc-797956, Santa Cruz Technologies, Santa Cruz, Calif.).

Las células renales se colocaron en placas en portaobjetos de cámara de 8 pocillos con una densidad de 3000 células por pocillo. Las células se incubaron a 37 °C bajo un 5 % de CO₂ durante 24 h para permitir su unión. Se continuó con una fijación con un 4 % de paraformaldehído durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se llevó a cabo la permeabilización de las membranas celulares mediante la adición de un 0,1 % de Triton-X 100 en PBS durante 3 minutos a temperatura ambiente. Entonces se incubaron las células en suero de cabra durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después del lavado, se incubaron las células con los anticuerpos primarios durante 1 hora

(1:50) a temperatura ambiente. Se lavaron las células una segunda vez y se añadieron los anticuerpos policlonales anti-conejo de cabra (IgG policlonal anti-conejo, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Calif.) (1:200) continuando con la incubación a temperatura ambiente durante 45 minutos. A continuación de una etapa de lavado final se llevó a cabo la detección cromogénica de EPO utilizando el kit Vector ABC de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, Calif.). Los portaobjetos sin anticuerpos primarios servían como controles internos negativos, y el tejido renal de ratón normal servía como control positivo.

Las células renales del cultivo presentaban múltiples fenotipos bajo el microscopio. Las células alcanzaban la confluencia en 7 a 10 días de la colocación en placas. Muchas de las células observadas en los 3 primeros replicados después del aislamiento del riñón se teñían positivamente para la EPO, en comparación con los controles negativos, que no mostraban tinción de fondo o no específica (FIG. 2), lo que indicaba que la tinción observada era debida probablemente a la presencia de EPO en los cultivos. El número de células que se teñía positivamente para EPO se mantenían durante el mismo periodo de tiempo. La tinción inmunohistoquímica del tejido renal indicaba una cantidad similar de expresión de EPO que la que se encontraba en las células cultivadas (FIG. 3).

El número de células que expresaban EPO disminuía ligeramente con los replicados posteriores (FIG. 4). Esto es debido más probablemente al aumento del número de replicados y pérdida de células/función con el tiempo y la manipulación. Sin embargo, el porcentaje relativo parece que se mantiene estable después del primer replicado.

La expresión de EPO se confirmó también por transferencia de Western, como se muestra nel FIG. 5.

Ejemplo 3. Caracterización de células renales de ratón y rata. Se utilizó un análisis FACS para cuantificar el número de célula productoras de EPO en los cultivos de células renales establecidos en cada replicado (1-3 replicados). Las células se recolectaron por tripsinización y centrifugación, se resuspendieron en medio, y se pasaron a través de un filtro celular de 70 um para asegurar una suspensión de células únicas. Después del recuento de las células, se centrifugaron y resuspendieron en PBS a $5-7,5 \times 10^5$ célula/tubo para retirar el FBS de las células. Las células se fijaron con formaldehído al 2 % durante 10 minutos a 4 °C y se permeabilizaron utilizando metanol al 100 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se resuspendieron en un 3 % de suero de cabra en PBS seguido por la incubación con el anticuerpo primario anti-EPO de conejo (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif.) durante 45 minutos en hielo. Las células se lavaron dos veces con suero de cabra al 3 % en PBS antes de la incubación con los anticuerpos secundarios anti-conejo de cabra conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) durante 1 hora. Las células se lavaron entonces completamente un suero al 3 % en PBS y se transfirieron a la máquina de FACS (FACS Calibur E6204, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, N.J.).

Los experimentos de clasificación celular activada por fluorescencia demostraban que un 44 % de las células del replicado 1 (P1) eran positivas a EPO. Este porcentaje aumentaba al 82 % en el replicado 2 (P2), y luego volvía a caer al 42 % en el replicado 3 (P3). Esto puede indicar que, durante los primeros pocos días de cultivo, se produce la proliferación de células productoras de EPO y/o la regulación positiva de la expresión genética de EPO en respuesta a la baja concentración de oxígeno en el medio en comparación con el tejido vivo normal. Estas respuestas se podrían entonces normalizar durante los siguientes pocos días, dando como resultado un número de células productoras de EPO que está próximo al que se encuentra en el tejido renal (FIG. 6, fila superior).

Los datos de FACS demuestran el mantenimiento de la expresión de EPO durante varios replicados. Se debería destacar que había una oleada del número de células que expresan EPO (un 82 %) en el cultivo del replicado 2, lo que se confirmó por varios experimentos repetidos. Aunque sin el deseo de quedar unidos por ninguna teoría en particular, una posible explicación de este fenómeno podría ser que la expresión de EPO es un rasgo inherente de todas las células renales que puede encenderse y apagarse según se necesite. En este caso, a continuación del abrupto cambio de las condiciones de supervivencia entre el cuerpo y la placa de cultivo, las células pueden dirigirse para que expresen EPO momentáneamente hasta que se produce la estabilización del cultivo. Consistentemente con esto, la oleada de EPO se revertía rápidamente y los análisis del replicado 3 mostraban un porcentaje inferior de células productoras de EPO (un 42 %).

La caracterización de las células de ratón mediante inmunofluorescencia confirmaba la expresión de EPO (FIG. 7A). La población de células era positiva para los marcadores celulares de riñón GLEPP1 y Tamm Horsfall (FIG. 7B).

Los replicados 0, 1 y 2 de células de rata también se analizaron en cuanto a la producción de EPO utilizando la clasificación celular activada por fluorescencia (FACS) (FIG. 6, fila inferior). Las células de rata cultivadas tenían distintas morfologías celulares y eran positivas a los marcadores celulares de riñón GLEPP1 y Tamm Horsfall (FIG. 8).

Ejemplo 4. Exposición de los cultivos productores de EPO a condiciones de hipoxia. Aunque el mantenimiento de las características fenotípicas es esencial durante los estadios de expansión celular, un componente crítico que asegura el éxito de la terapia celular es la capacidad de las células productoras de EPO para regular y mantener los niveles normales de EPO. La EPO pertenece a la familia de citocinas hematopoyéticas, y controla la eritropoyesis en la médula ósea, y regula la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células progenitoras eritroides mediante la transducción de la señal mediada por el receptor de EPO (EPOR). La EPO se produce sobre todo en el

riñón, y cuando este órgano falla, la producción de EPO falla, dando lugar a anemia. La expresión de EPO en el cuerpo depende sobre todo de la tensión de oxígeno en el entorno que rodea las células capaces de producir EPO. Los factores que tienen influencia en los niveles de oxígeno incluyen la falta de oxígeno en el aire ambiental y la disminución del flujo de sangre.

5 Para determinar si las células que expresan EPO en cultivo podían responder a un cambio en los niveles de oxígeno, se llevó a cabo un experimento en el que las células se privaban de suero durante 24 horas seguido por la exposición a distintos niveles de oxígeno *in vitro*. Las células de riñón de rata Lewis y las células HepG2 (línea celular de carcinoma hepatocelular de hígado humano) se cultivaron en condiciones normales e hipóxicas, y se evaluó la producción de EPO y confirmó mediante transferencia de Western de las células. La presencia de EPO en el medio de cultivo también se midió y confirmó analizando los sobrenadantes de las células renales cultivadas en condiciones normóxicas e hipóxicas con el ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas sándwich de doble anticuerpo utilizando un kit Quantikine® IVD® Erythropoietin ELISA (R&D Systems®, Minneapolis, Minn.).

15 Las células se colocaron en medio libre de suero durante 24 horas antes del experimento. Las placas se transfirieron entonces a una cámara hipóxica y se expusieron a diferentes condiciones hipóxicas (un 1 %, 3 %, 5 %, y 7 % de oxígeno). Se utilizaron células HepG2 como controles positivos, ya que se había expuesto previamente que producen altos niveles de EPO en cultivo (Horiguchi et al., Blood, 96: 3743). La expresión de EPO por las células HepG2 se confirmó por transferencia de Western (FIG. 9). Todas las células se recolectaron en tampón de lisis que contenía NP-40. Se midió la concentración de proteínas en cada muestra utilizando el ensayo proteico de Bio-Rad. Se ejecutaron 40 ug de proteína total en gel de acrilamida al 10 % utilizando SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron entonces a una membrana de PVDF (Millipore Corp.). Se utilizó la detección de expresión de β -actina en los lisados como control de carga. Se utilizó el anticuerpo de EPO (sc-7956 policlonal de conejo, Santa Cruz Biotechnology) a 1:200 y se utilizó el anticuerpo secundario (7074 anti-conejo de cabra, Cell Signaling Technology, Beverly, Mass.) a 1:2000. Para medir la cantidad de EPO secretada en el medio por los cultivos renales primarios, se recolectó el medio y se concentró a 500 ul utilizando un dispositivo de filtro de Ultracentrífuga Amicon (Millipore Corporation, Billerica, Mass.). Las muestras de este medio se ejecutaron en un gel de poliacrilamida al 10 %. Se utilizó un anticuerpo de EPO (sc-7956 policlonal de conejo, Santa Cruz Biotechnology) a 1:100 y se utilizó el anticuerpo secundario (7074 anti-conejo de cabra, Cell Signaling Technology, Beverly, Mass. EE. UU.) a 1:2000.

30 La transferencia de Western mostraba un ligero aumento de expresión de EPO en el lisado celular después de la hipoxia (FIG. 10). Estos resultados, sin embargo, no se veían cuando se utilizaron concentrados de medio para medir la EPO (FIG. 11). El ensayo del medio indicaba que todos los concentrados de medio (en condiciones hipóxicas y normóxicas) contenían la misma cantidad baja de EPO.

35 De manera alternativa, se preparaban los lisados de proteína total a partir de células renales primarias de rata en los replicados 1 y 2. Las placas de las muestras normóxicas (NC), las muestras en un 3 % de O₂ y un 7 % de O₂ se procesaron y ejecutaron en un SDS-PAGE al 10 %. Se utilizó la línea celular KNRK como control positivo. Los resultados se muestran en la FIG. 12.

40 Sin el deseo de quedar ligados por teoría particular alguna, esto puede indicar que 24 horas puede no ser un tiempo suficiente para que aumenten los niveles de EPO secretada a un nivel que sea detectable por la transferencia de Western. Es probable que sea necesario un tiempo de exposición más largo para que las células comiencen a secretar EPO, ya que la producción proteica de novo puede tomar varias horas para ser aparente. Por lo tanto, se llevó a cabo el siguiente experimento, en el que las células se colocaron en condiciones hipóxicas durante 24, 48 y 72 horas.

50 Las células primarias cultivadas de las ratas Lewis aumentaron cerca de la confluencia en cada replicado en las placas de 10 cm. Las células se colocaron en una cámara hipóxica (un 1 % de O₂) durante 24, 48 o 72 h. A continuación del cultivo en hipoxia, se recolectó el medio y se concentró en un dispositivo de centrífuga Amicon Ultra con un punto de corte de peso molecular de 10 K (Millipore). Entonces se cargaron 40 ug de proteína total en un gel de Poliacrilamida al 10 %. Se utilizaron las células KNRK como control positivo. Los resultados se muestran en la FIG. 13.

55 En resumen, todos los experimentos indicaban que los niveles de EPO en las células de cultivo primario eran mayores o iguales a los que se medían en los controles positivos con HepG2, y las células productoras de EPO eran capaces de responder al cambio de entorno.

60 **Ejemplo 5. Administración de células productoras de EPO *in vivo*.** Para determinar si las células productoras de EPO sobreviven y forman tejidos *in vivo*, se implantaron por vía subcutánea células renales mezcladas en gel de colágeno en ratones atímicos a concentraciones de 1×10^6 y 5×10^6 seguido por la recuperación a los 14 y 28 días después del implante para el análisis. Se utilizaron las células de los replicados 1-5. Las células se suspendieron en un gel de colágeno para facilitar la inyección (concentración: 0,1 mg/ml).

65 Histológicamente, los implantes recuperados demostraban que las células renales supervivientes continuaban expresando proteínas EPO, lo que se confirmó inmunohistológicamente utilizando anticuerpos específicos de EPO

(FIG. 14).

Estos resultados demuestran que las células renales productoras de EPO que crecían y se expandían en un cultivo expresaban establemente EPO *in vivo*. Por lo tanto, las células productoras de EPO se pueden utilizar como una opción de tratamiento para la anemia producida por la insuficiencia renal crónica.

Ejemplo 6. Análisis de la expresión de EPO con PCR en tiempo real. Se llevó a cabo una PCR en tiempo real para evaluar la expresión celular de EPO en células de rata en respuesta a condiciones de hipoxia.

Para ensayar el efecto del medio de cultivo, las células cultivadas en KSFM y DMEM se expusieron a condiciones de hipoxia (un 3 % de O₂). Las células renales primarias (replicado 0) se cultivaron hasta el 80 % de confluencia en placas de 10 cm. Se cultivaron tres placas de células con KSFM libre de suero o DMEM y se colocaron en una cámara hipóxica con un 3 % de O₂. Después de 24 h, se procesaron las muestras en cuanto al ARN total y síntesis de ADNc. Se hizo una PCR en tiempo real por triplicado, y se cuantificaron las muestras con respecto a la muestra normóxica. Los resultados se muestran en la FIG. 15.

La expresión de EPO en cultivo de riñón de rata se comparó con la PCR en tiempo real a lo largo de 24, 48 y 72 horas. Las células renales primarias (replicados 0 y 2) se cultivaron hasta el 80 % de confluencia en placas de 10 cm. Las células se cultivaron entonces en KSFM libre de suero y se colocaron en una cámara hipóxica con un 1 % de O₂. Después de 24, 48 o 72 horas, se procesaron las muestras en cuanto al ARN total y síntesis de ADNc. Se hizo la PCR en tiempo real por triplicado y se cuantificaron las muestras con respecto a la muestra normóxica. Los resultados se muestran en la FIG. 16.

En el ensayo con un tiempo de hasta 24 horas, las células renales primarias (replicado 0) se cultivaron hasta el 80 % de confluencia en placas de 10 cm. Las células se colocaron entonces en una cámara hipóxica al 1 % de O₂ durante hasta 24 horas. Las muestras se procesaron entonces en cuanto al ARN total y síntesis de ADNc. Se ejecutó una PCR en tiempo real por triplicado, y se cuantificaron las muestras con respecto a la muestra normóxica. Los resultados se muestran en la FIG. 17.

Ejemplo 7. Expansión de células renales humanas. También se demostró el cultivo y posibilidad de expansión de celular renales humanas primarias utilizando los medios y condiciones descritas anteriormente. Los cultivos de los replicados 2, 4, 7 y 9 se muestran en la FIG. 18. Se demostró que las células renales primarias humanas se pueden mantener a través de veinte doblajes (FIG. 19). Los cultivos de células renales humanas se caracterizaron en cuanto a la expresión de EPO y GLEPP1 (FIG. 20).

Ejemplo 8. Suministro de células renales humanas mediante inyección de colágeno. Se implantaron por vía subcutánea células renales humanas mezcladas en gel de colágeno en ratones atímicos como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 5. Se compararon concentraciones de colágeno de 1 mg/ml, 2 mg/ml, y 20 mg/ml. A 1 y 2 mg/ml, el volumen *in vivo* desaparecía después de la administración. A 20 mg/ml, el volumen de inyección *in vivo* se mantenía y se veía neovascularización (FIG. 21). Se confirmó histológicamente que se formaba tejido que expresaba EPO *in vivo* (FIG. 22).

Ejemplo 9. Selección de células productoras de EPO con clasificación celular magnética. Las células se seleccionaron por la producción de EPO utilizando clasificación celular magnética. Se aísla una suspensión celular única se aisló utilizando un método de preparación convencional. Después de la preparación de la suspensión celular única, se contó el número de células y se centrifugaron las muestras de células para obtener un aglomerado. Se bloquearon las células con un 10 % de suero de cabra (del animal del que se hace el anticuerpo secundario) durante 10 minutos. Se añadieron 1 o 2 ml de la solución de bloqueo. Después de 10 minutos de centrifugación, se resuspendieron las en el anticuerpo primario contra la EPO (se utilizó 1 ug del anticuerpo primario/ millón de células). Normalmente, el marcado durante 15 minutos a 4-8 °C es suficiente. Se lavaron las células dos veces para retirar cualquier anticuerpo primario no unido con 1-2 ml de tampón por cada 10⁷ células y se centrifugó a 300 x g durante 10 minutos. Después de dos lavados sucesivos, el aglomerado se resuspendió en 80 ul de PBS (0,5 % de BSA y 2 mM de EDTA, pH 7,2) por cada 10⁷ células. Se añadieron 20 ul de microperlas anti-conejo de cabra por cada 10⁷ células. Se mezcló bien y se incubó durante 15 minutos a 4-8 °C. Se lavaron las células dos veces añadiendo 1-2 ml de tampón por cada 10⁷ células y se centrifugó a 300 x g durante 10 minutos. Se pipeteó completamente el sobrenadante. Se resuspendió hasta 10⁸ células en 500 ul de tampón (Nota: para un número mayor de células, se escaló el volumen de tampón en consecuencia; para el agotamiento con columnas LD, se resuspendió el aglomerado celular en 500 ul de tampón para hasta 1,25 *10⁸ células). Se procedió a la separación celular magnética.

Nota: Trabaje rápido, mantenga las células frías y use soluciones pre-enfriadas. Esto evitará la limitación de los anticuerpos sobre la superficie celular y el marcado celular no específico. Los volúmenes para el marcado magnético que se dan a continuación son para hasta un total de 10⁷ células. Cuando se trabaja con menos de 10⁷ células, se utilizan los mismos volúmenes que se indican. Cuando se trabaja con un número de células más alto, se escalan todos los volúmenes de reactivos y los volúmenes totales en consecuencia (por ejemplo, para un total de 2 x 10⁷, se utiliza un volumen de dos veces de todos los volúmenes de reactivo indicados y volúmenes totales). El trabajo sobre

hielo puede necesitar tiempos de incubación mayores. Las altas temperaturas y/o tiempos de incubación más largos da lugar al marcado celular no específico.

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de una población aislada de células productoras de EPO, comprendiendo dicho método las etapas de:
- 5 proporcionar células renales diferenciadas que comprenden células intersticiales peritubulares; cultivar *in vitro* dichas células renales diferenciadas, en donde dichas células intersticiales peritubulares se cultivan en co-cultivo con otros tipos de células renales; y
- 10 hacer replicados de dichas células renales diferenciadas, en los que dichas células producen EPO después de dichos replicados; produciendo de esta manera una población aislada de células productoras de EPO.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente la etapa de seleccionar dichas células renales diferenciadas por la producción de EPO.
- 15 3. El método de la reivindicación 1, en el que dicha etapa de hacer replicados comprende el cultivo de las células renales diferenciadas en un medio que comprende insulina transferrina selenio (ITS).
4. El método de la reivindicación 1, en el que dicha población de células renales diferenciadas de dicha etapa de provisión comprende adicionalmente células endoteliales del riñón.
- 20 5. El método de la reivindicación 1, sujeto a la condición de que dicha población de células productoras de EPO no se han transfectado con un ADN exógeno que codifique un polipéptido.
- 25 6. El método de la reivindicación 1, en el que dicho replicado comprende el replicado de dichas células renales diferenciadas de 2 a 8 veces.
7. El método de la reivindicación 1, en el que dicho replicado comprende el replicado de dichas células renales diferenciadas de 2 a 5 veces.
- 30 8. El método de la reivindicación 2, en el que la etapa de seleccionar dichas células renales diferenciadas para la producción de EPO es por densidad y tamaño, comprendiendo opcionalmente el uso de gradientes de centrifuga.
9. El método de la reivindicación 1 en el que dichas células son humanas.
- 35 10. El método de la reivindicación 1, en el que dicha población produce EPO en condiciones normóxicas *in vitro* sin modificación con un agente químico exógeno o gen exógeno que estimule la producción de EPO.
- 40 11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho método comprende adicionalmente proporcionar la población aislada de células productoras de EPO en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. El método de la reivindicación 11, en el que dicho vehículo farmacéuticamente aceptable es adecuado para la inyección o el implante en un paciente.
- 45 13. El método de las reivindicaciones 11 o 12, en el que dicho vehículo farmacéuticamente aceptable comprende un armazón biodegradable.
14. El método de las reivindicaciones 11 o 12, en el que dicho vehículo farmacéuticamente aceptable es un gel.
- 50 15. El método de las reivindicaciones 11 o 12, en el que dicho vehículo farmacéuticamente aceptable es un gel de agar, un gel de colágeno, un gel de fibrina o un hidrogel.

Mecanismo de producción de eritropoyetina

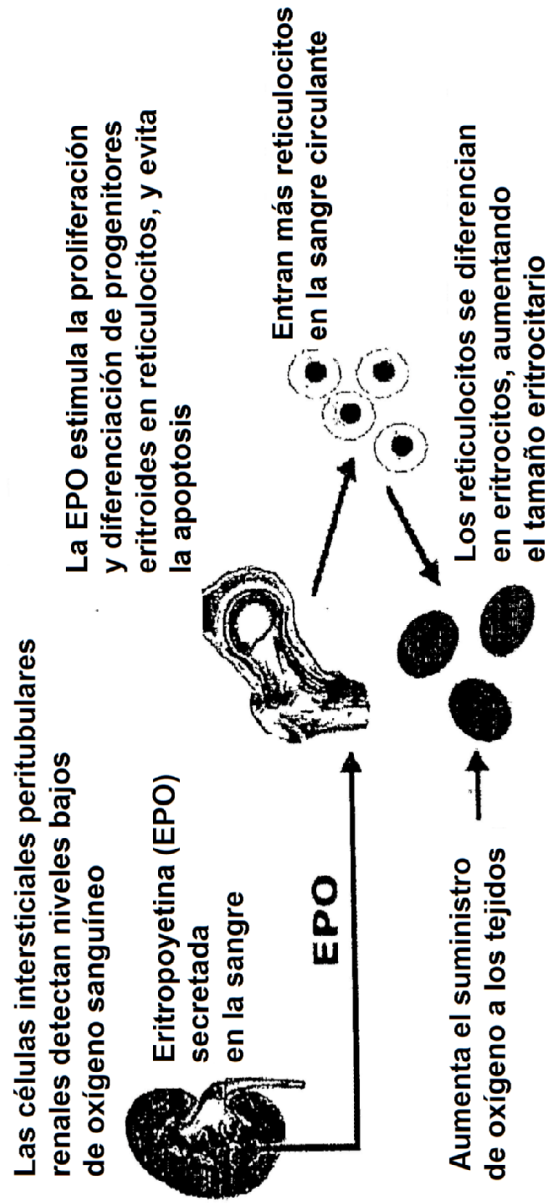


Figura 1

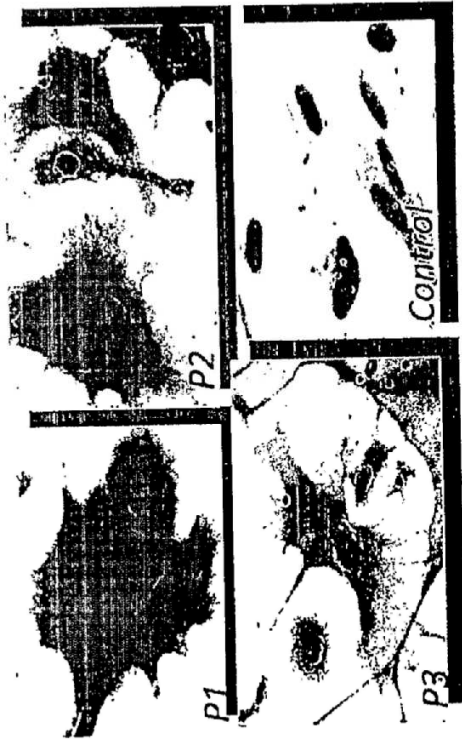


Figura 2



Figura 3

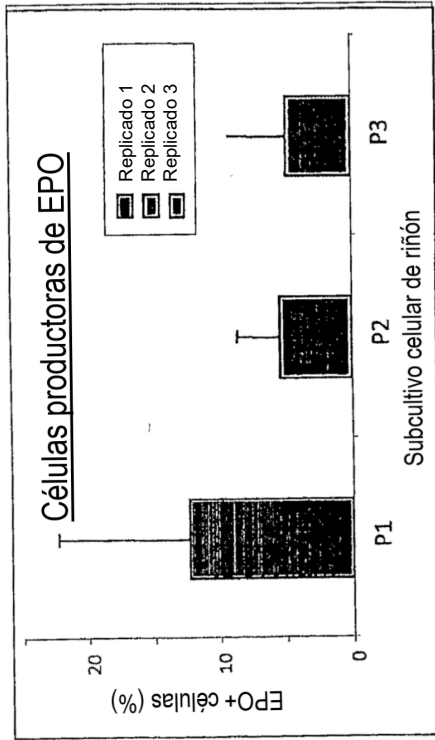


Figura 4

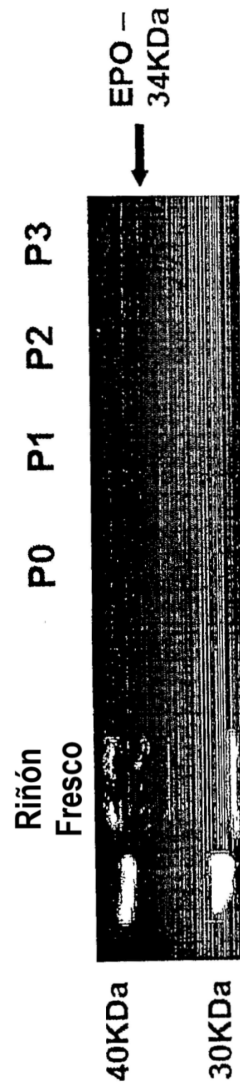
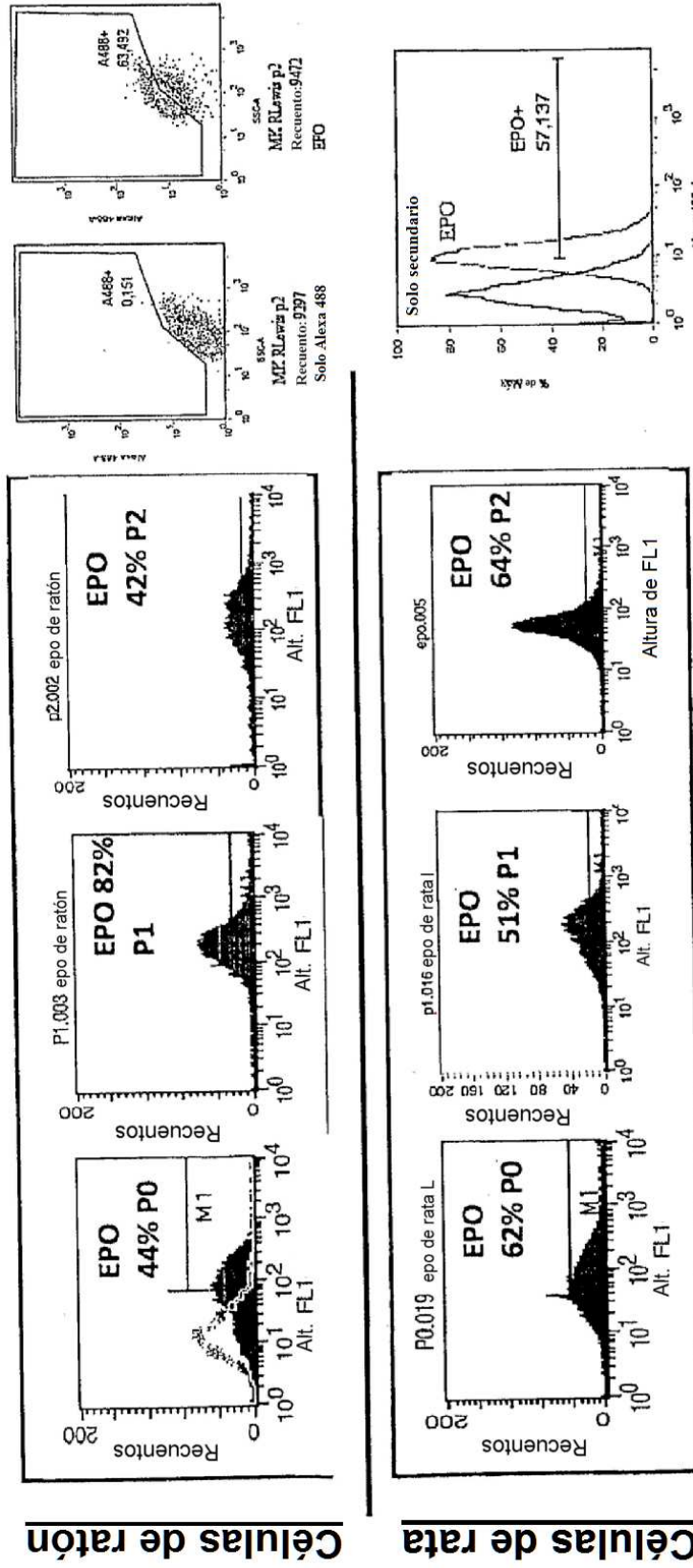


Figura 5



La población productora de EPO representa > 50% de la población desde el P0 → P2

Figura 6

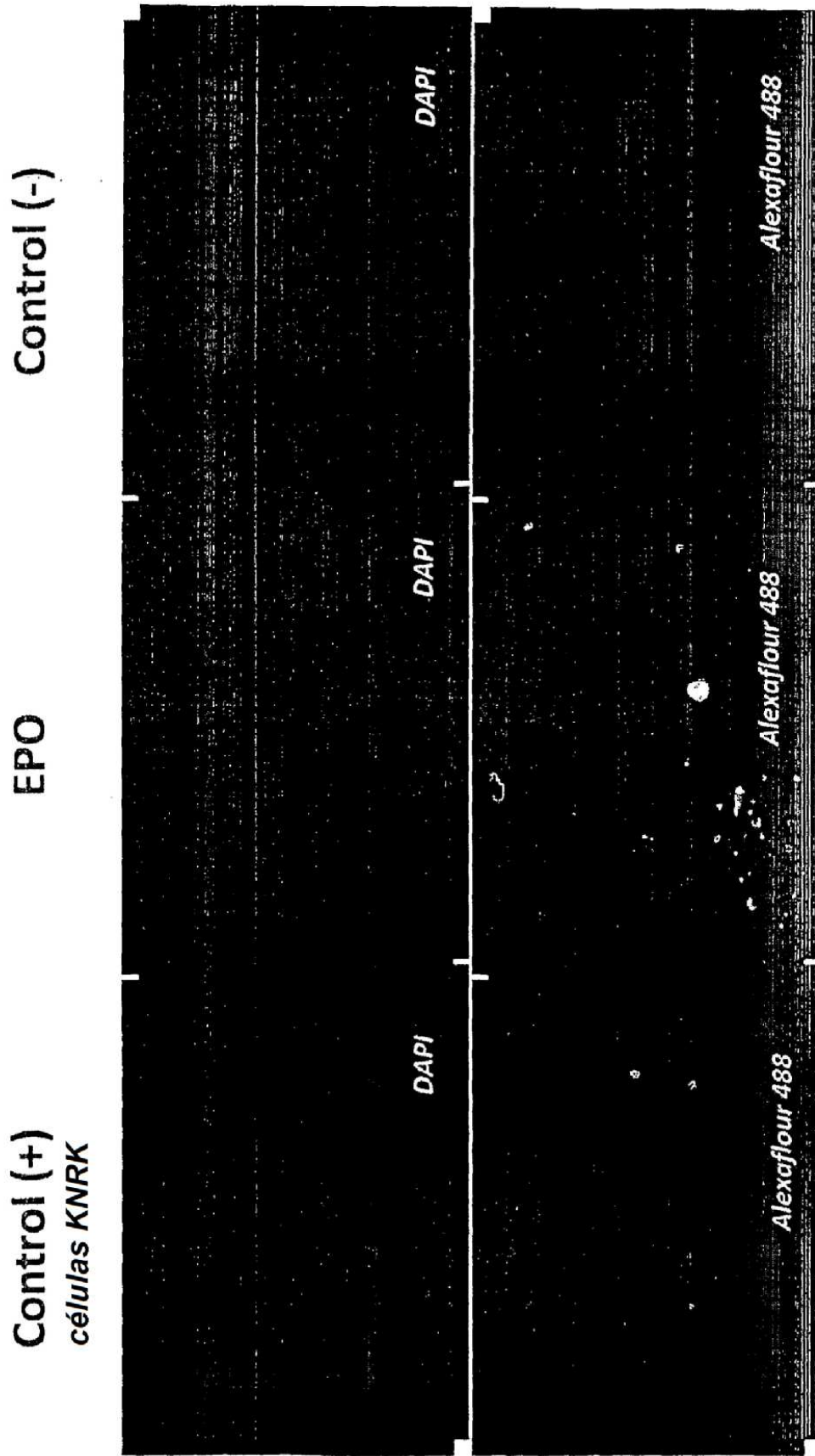


Figura 7A

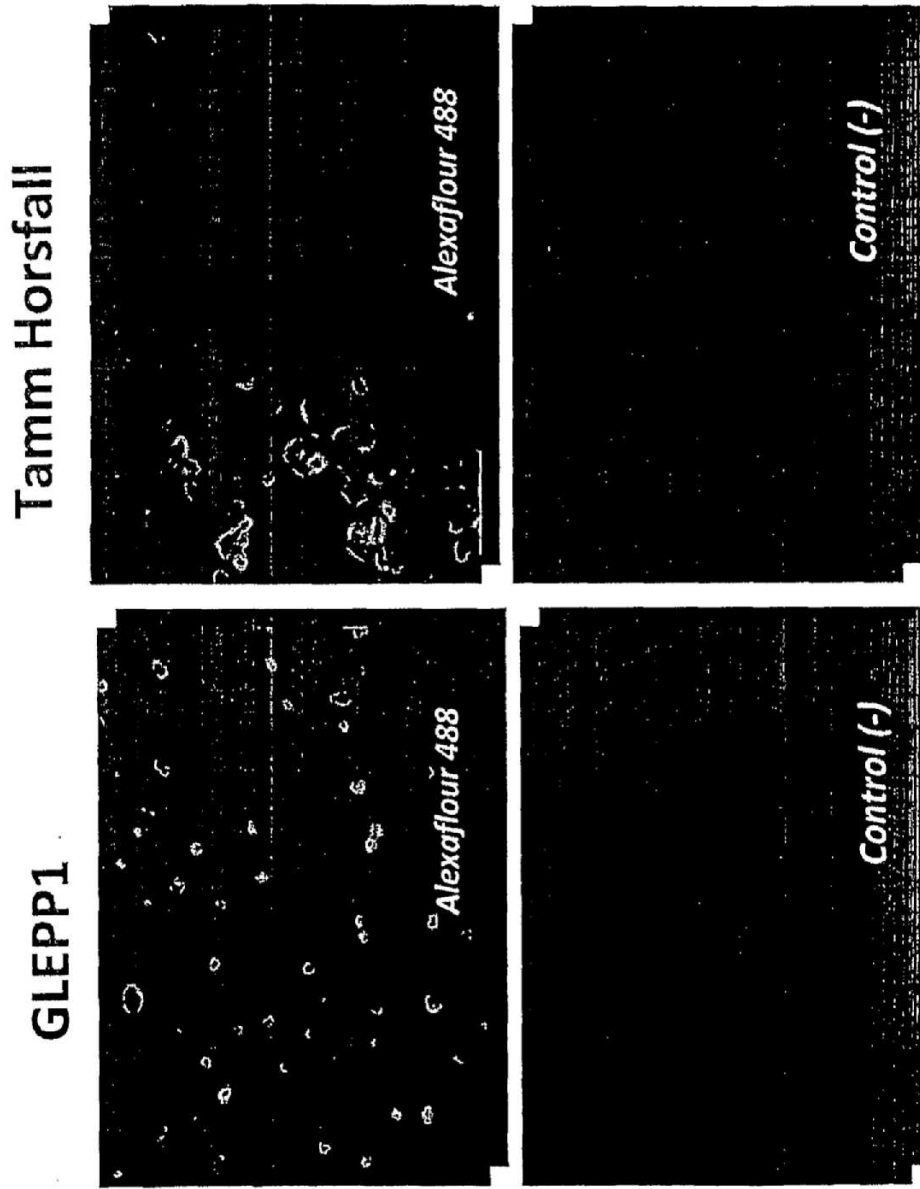


Figura 7B

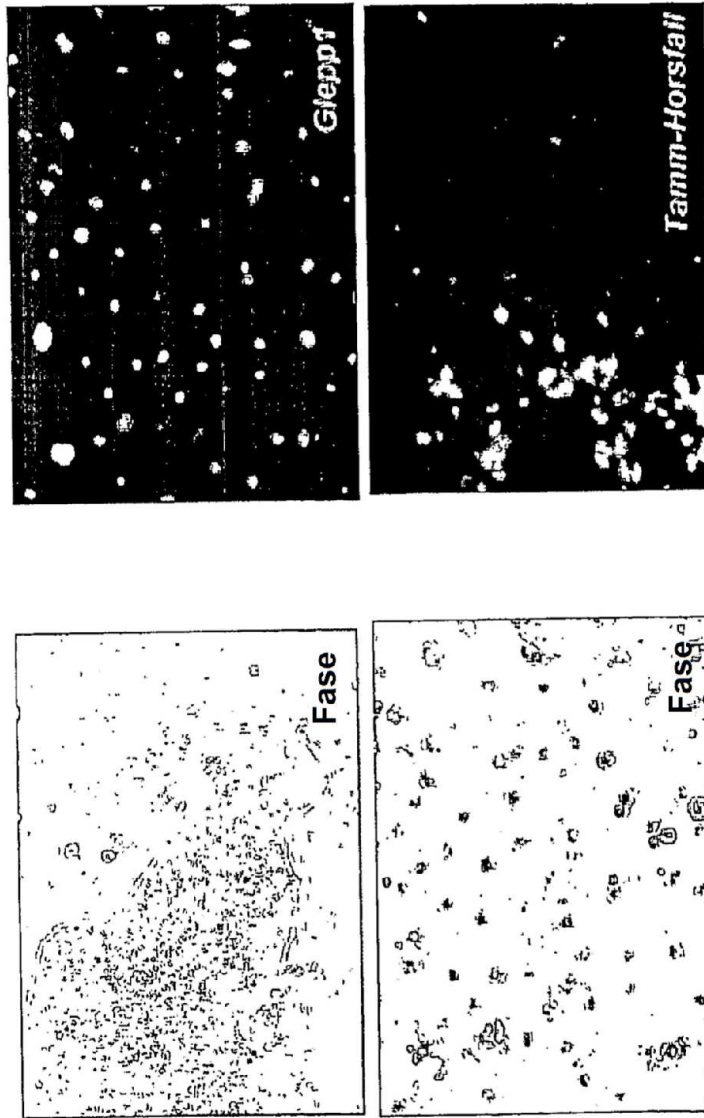


Figura 8

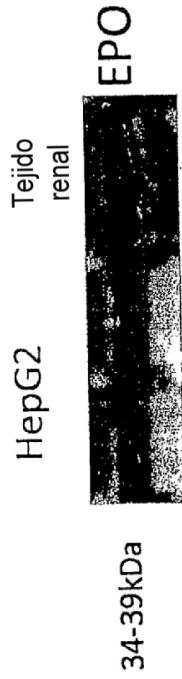


Figura 9

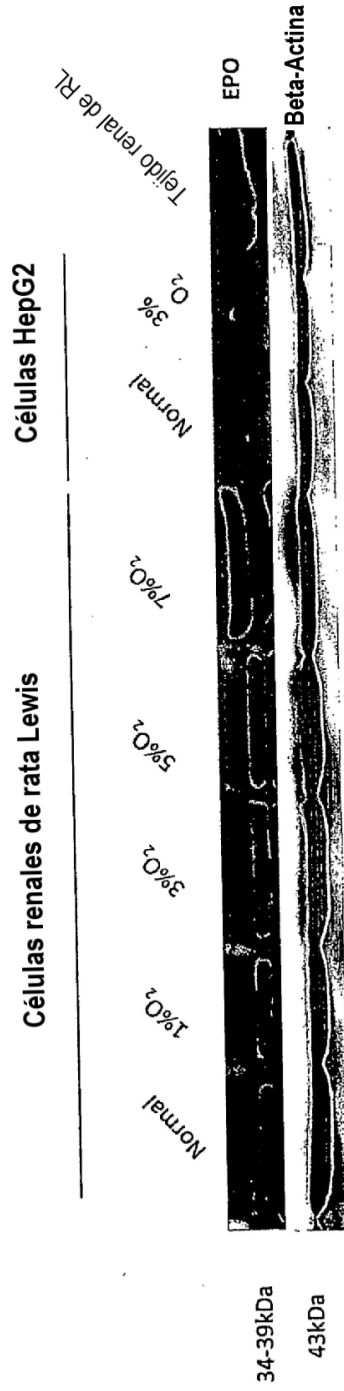


Figura 10

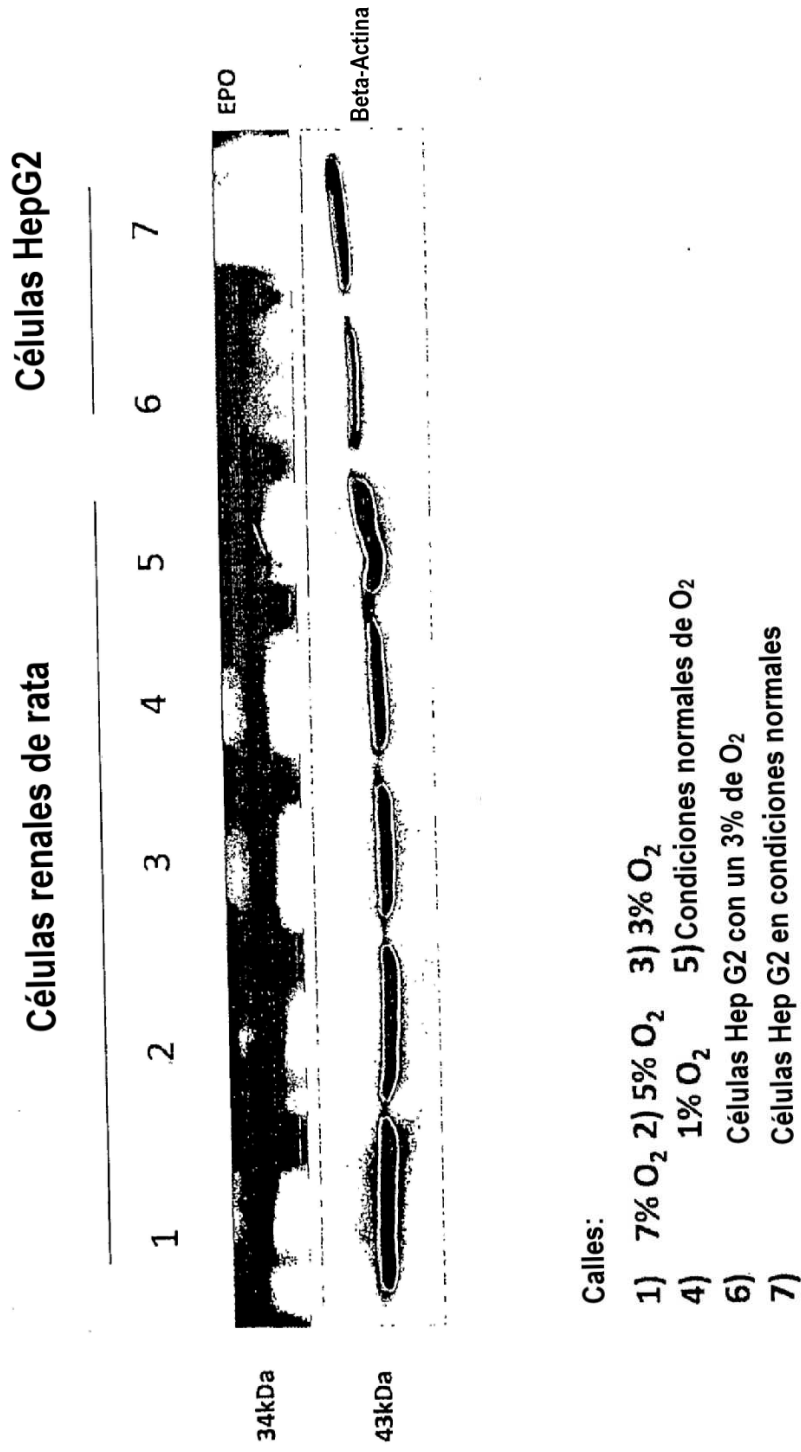


Figura 11

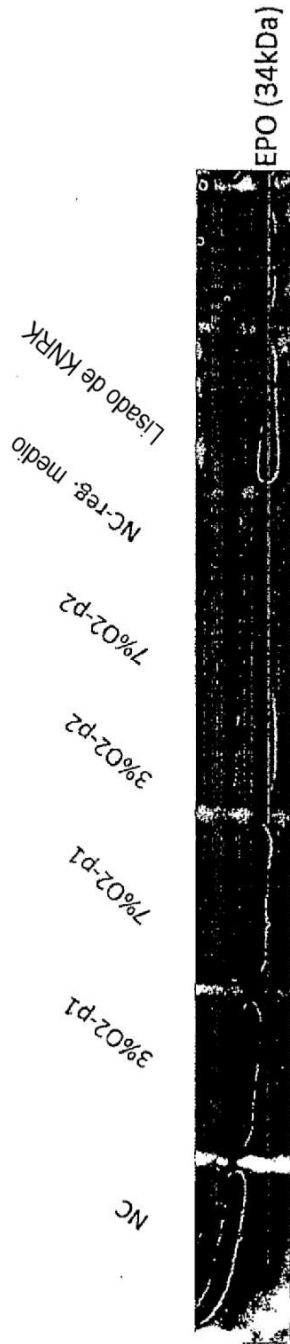


Figura 12

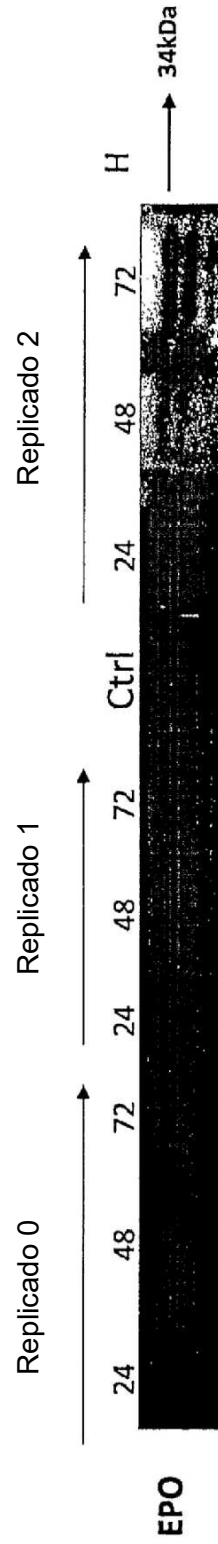


Figura 13

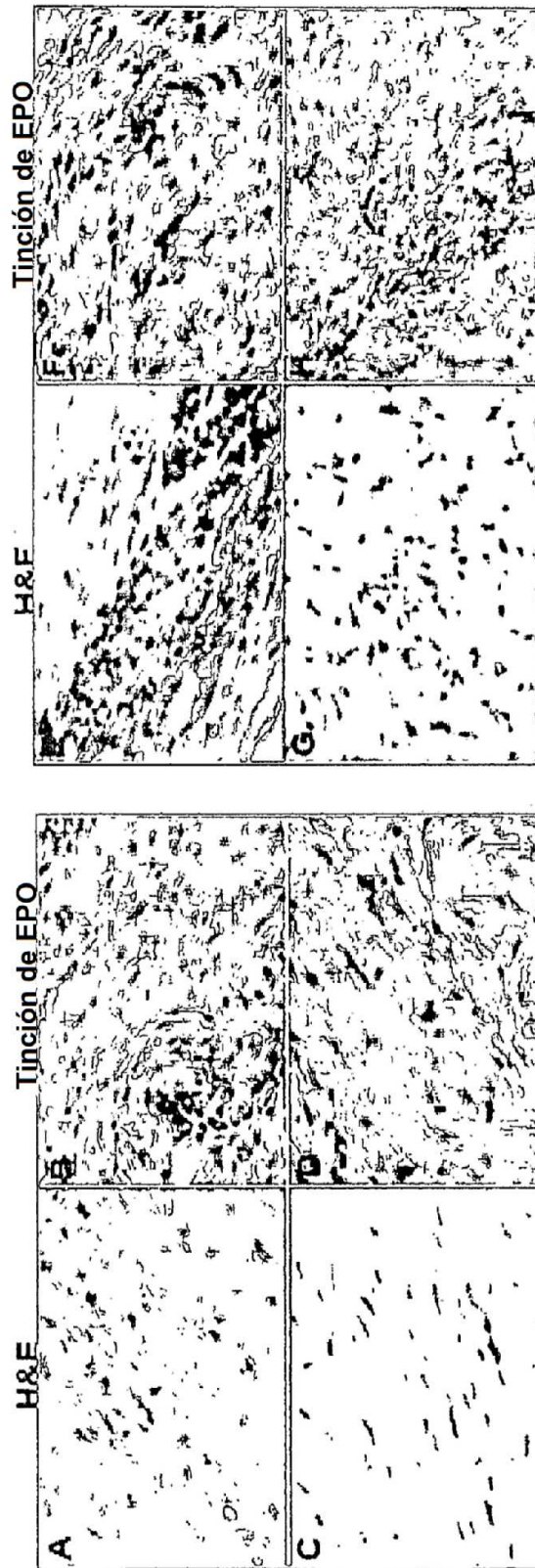


Figura 14

Expresión de EPO en la rata después de 24 h en la cámara hipóxica (3% de O2)

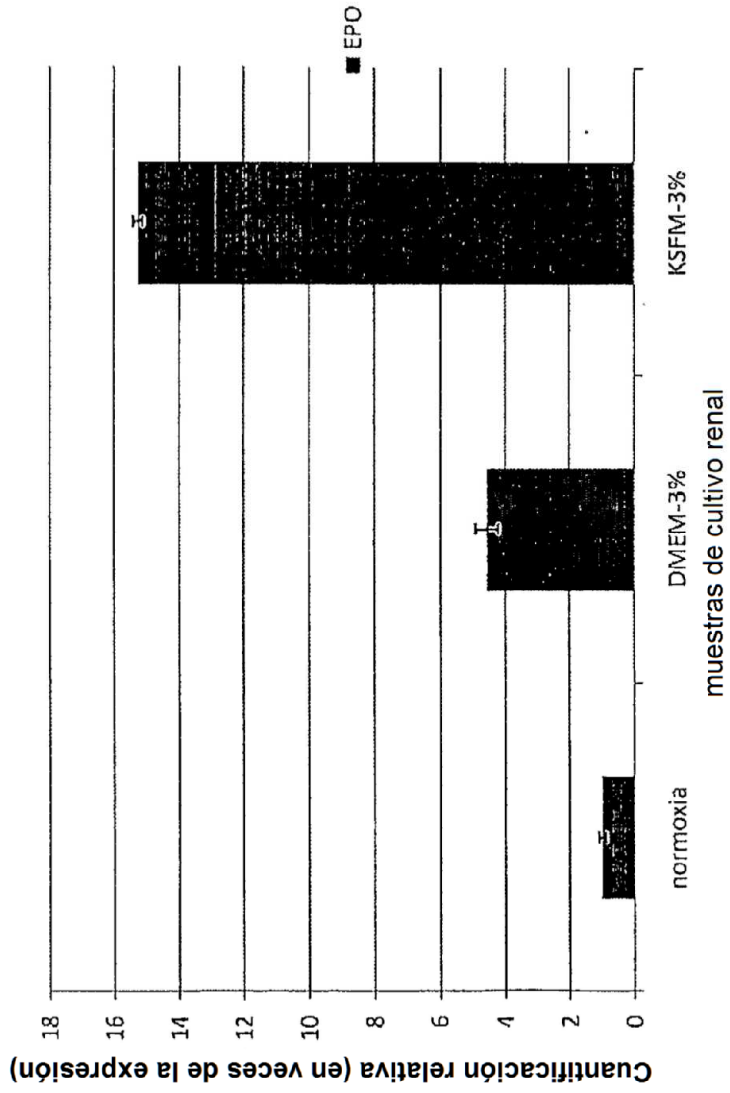


Figura 15

Expresión de EPO en cultivos de riñón de rata después de 1-3 días en una cámara hipóxica con un 1% de O₂

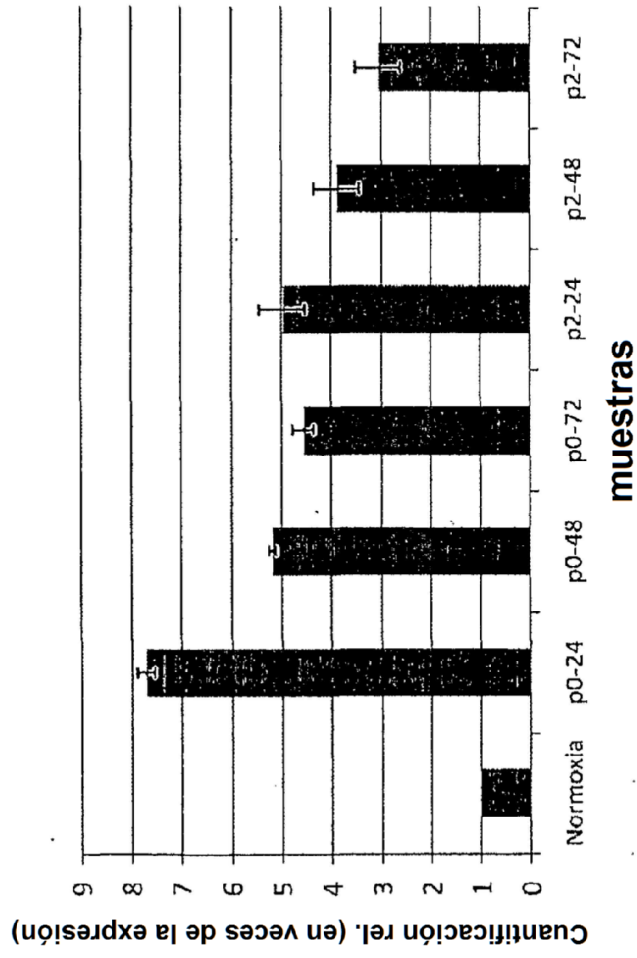


Figura 16

Células de rata (p0) situadas en una cámara hipóxica (1% de O2) durante 24 h

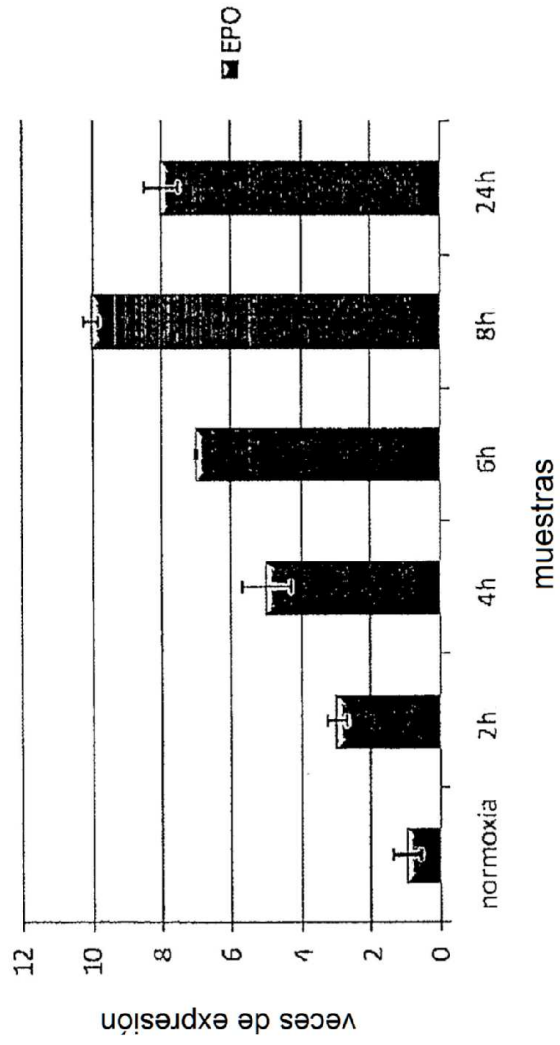


Figura 17

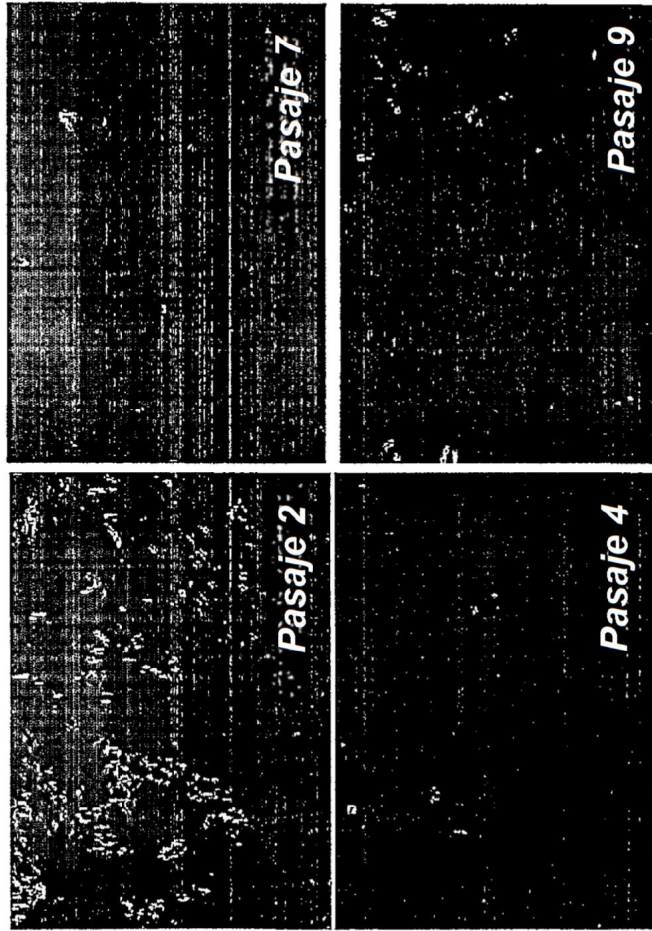


Figura 18

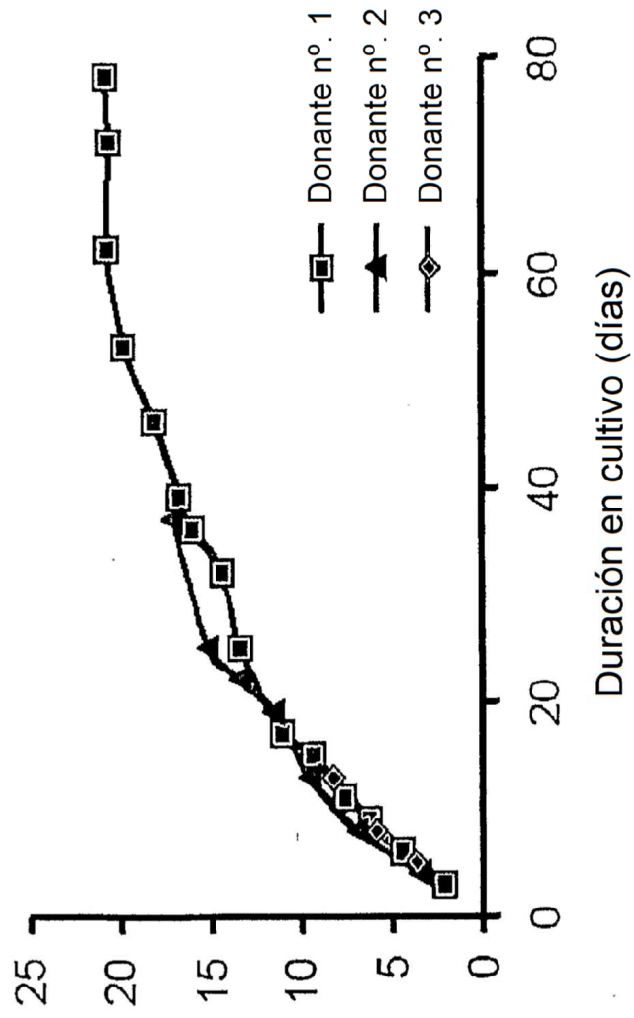


Figura 19

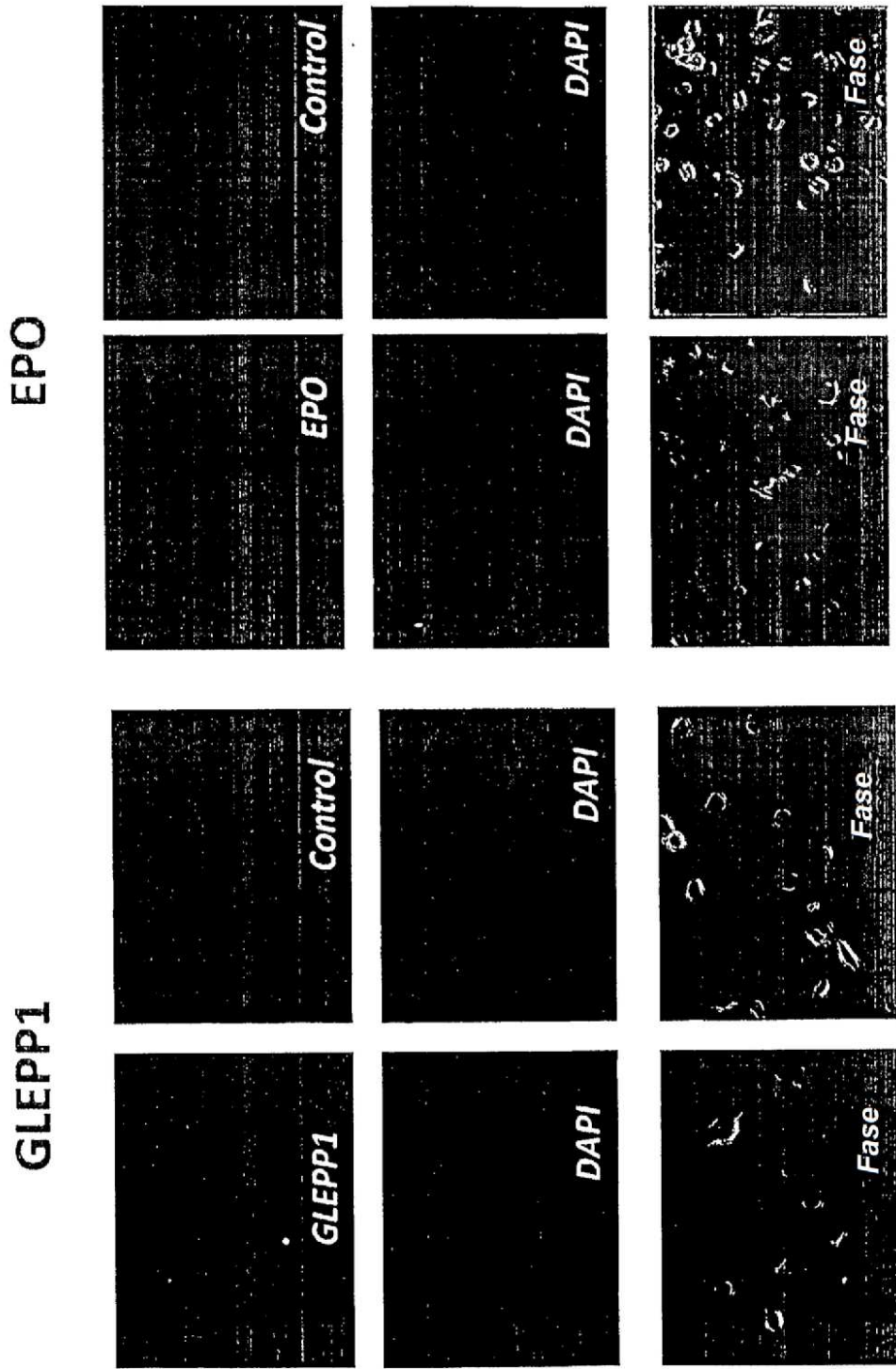


Figura 20

Post inyección (3 semanas)



Post inyección (tiempo 0)

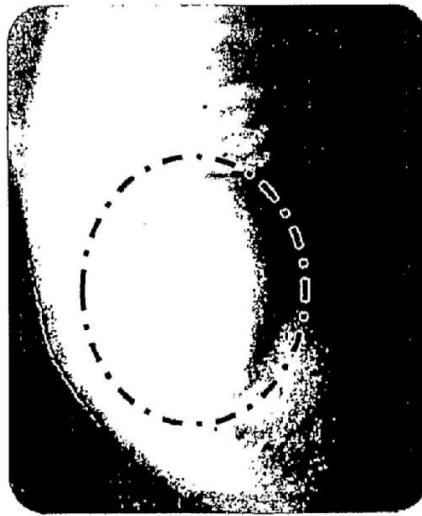


Figura 21

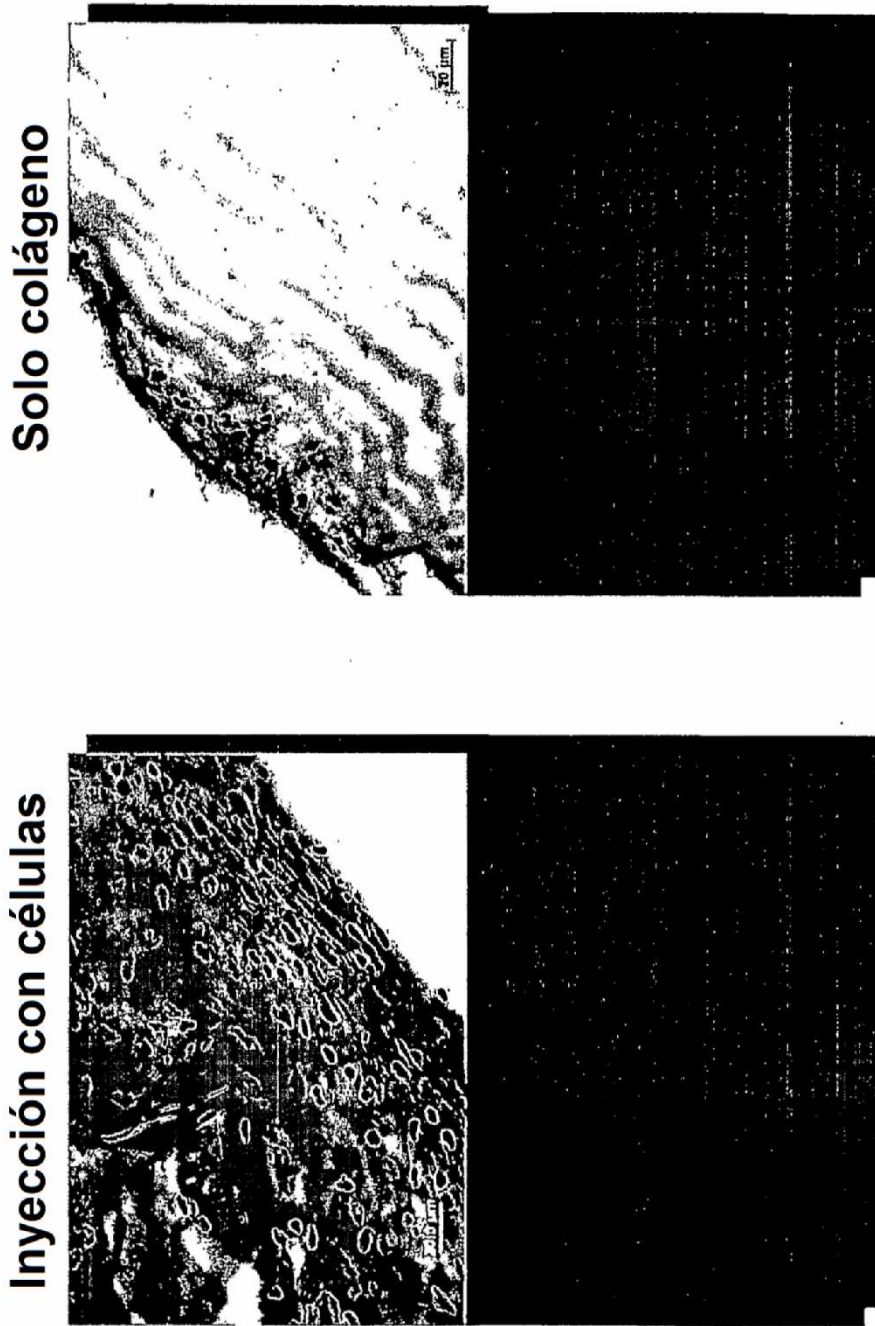


Figura 22