(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 744 979**

(51) Int. CI.:

C12N 5/071 (2010.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.10.2013 PCT/US2013/066707**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014 WO14066699**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.10.2013 E 13786132 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 2912165**

(54) Título: **Poblaciones de células renales y usos de las mismas**

(30) Prioridad:

24.10.2012 US 201261718150 P
11.09.2013 US 201361876616 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.02.2020

(73) Titular/es:

P.O. BOX 309 (100.0%)
Ugland House, South Church Street
George Town Grand Cayman KY1-1104, KY

(72) Inventor/es:

BASU, JOYDEEP;
GUTHRIE, KELLY;
JUSTEWICZ, DOMINIC;
BURNETTE, TERESA;
BRUCE, ANDREW;
KELLEY, RUSSELL, W. y
LUDLOW, JOHN, W.

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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 de células renales y usos de las mismas

Campo técnico

La presente divulgación generalmente se refiere a métodos para identificar una población celular enriquecida heterogénea obtenida a partir de riñón de mamífero. También se describen métodos para su uso en la preparación de una terapia de medicina regenerativa, y en el presente documento se proporcionan métodos para tratar la enfermedad renal mediante la administración de la población celular enriquecida heterogénea obtenida a partir de riñón en un sujeto mamífero.

Antecedentes de la invención

Los biomateriales a base de colágeno y gelatina se han empleado con éxito para varias aplicaciones de ingeniería tisular (Rohanizadeh *et al.* J Mater Sci Mater Med 2008; 19: 1173-1182; Takemoto *et al.* Tissue Eng Parte A 2008; 14: 1629-1638; Young *et al.* J Control Release 2005; 109: 256-274). Ambas macromoléculas se caracterizan por una excelente biocompatibilidad y baja antigenicidad (Cenni *et al.* J Biomater Sci Polym Ed 2000; 11: 685-699; Lee *et al.* Int J Pharm 2001; 221: 1-22; Waksman *et al.* J Immunol 1949; 63:427-433); sin embargo, dado que la gelatina se obtiene mediante la hidrólisis de colágeno, tiene ciertas ventajas sobre esta última: (a) está fácilmente disponible y es fácil de usar; (b) ofrece opciones relativas al peso molecular y al desarrollo (es decir, control sobre las propiedades físicas); y (c) es más flexible hacia la modificación química y más fácil de fabricar. Además, desde un punto de vista biológico, la gelatina mantiene propiedades de citocompatibilidad y adherencia celular similares al colágeno Engvall *et al.* Int J Cancer 1977; 20: 1-5; Kim *et al.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009; 108: e94-100).

Se ha informado de varios métodos para la reticulación de estas macromoléculas con el fin de retrasar su biodegradación para prolongar su tiempo de permanencia *in vivo* (en aplicaciones de ingeniería tisular) o para adaptar su capacidad de liberación de fármacos (cuando se usan como vehículos farmacológicos). Se han publicado numerosos métodos para la reticulación química o fotoquímica de colágeno o gelatina (Adhirajan *et al.* J Microencapsul 2007; 24: 647-659; Chang *et al.* Macromol Biosci 2007; 7: 500-507; Gagnieu *et al.* Biomed Mater Eng 2007; 17: 9-18; Kimura *et al.* J Biomater Sci Polym Ed 2010; 21: 463-476; Ma *et al.* J Biomed Mater Res A 2004; 71: 334-342; Vandelli *et al.* Int J Pharm 2001; 215: 175-184; Vandelli *et al.* J Control Release 2004; 96: 67-84). La mayoría de estos procedimientos tienen como objetivo reducir la susceptibilidad de estos biomateriales a la degradación enzimática y prolongar su tiempo de permanencia *in vivo* (Chang *et al.* mencionado anteriormente 2007; Ma *et al.* mencionado anteriormente 2004). Otros métodos de reticulación son dispositivos empleados para producir gelatina o biomateriales basados en colágeno adecuados como fármacos de liberación lenta, proteínas o vehículos de ácido nucleico (Kimura mencionado anteriormente 2010; Vandelli mencionado anteriormente 2004; Kommareddy *et al.* Nanomedicine 2007; 3: 32-42; Sehgal *et al.* Expert Opin Drug Deliv 2009; 6: 687-695; Sutter *et al.* J Control Release 2007; 119: 301-312). Una clase de agente de reticulación ampliamente utilizada para el colágeno y la gelatina, así como otros sistemas compatibles con la ingeniería tisular, son las carbodiimidas (Adhirajan mencionado anteriormente 2007; Olde Damink *et al.* Biomaterials 1996; 17: 765-773; Pieper *et al.* Biomaterials 2000; 21: 581-593; Cornwell *et al.* Clin Podiatr Med Surg 2009; 26: 507-523). Estas moléculas se conocen como reticuladores de longitud cero y actúan mediante la mediación de la formación de enlaces amida entre grupos funcionales carboxilo y amina primaria presentes en la especie que se va a reticular. Además, las carbodiimidas son menos citotóxicas en comparación con otros agentes de reticulación comunes (por ejemplo, glutaraldehído) (Lai *et al.* J Mater Sci Mater Med 2010; 21: 1899-1911). El glutaraldehído se usa como agente de reticulación en perlas de Cultispher™. El documento de patente de Estados Unidos N.º 6.991,652 de Burg describe compuestos de ingeniería tisular que contienen construcciones de soporte tridimensionales para células que se pueden administrar a un sujeto.

Las tecnologías de medicina regenerativa proporcionan opciones terapéuticas de próxima generación para la enfermedad renal crónica (CKD). Presnell *et al.,* documento WO/2010/056328 es Ilagan *et al.*, documento PCT/US2011/036347 describen células renales bioactivas aisladas, e incluyen poblaciones celulares tubulares y que producen eritropoyetina (EPO), y métodos para aislar y cultivar las mismas, así como métodos para tratar un sujeto que necesita con las poblaciones celulares.

Presnell *et al.* (Tissue Engineering, Parte C, Methods diciembre de 2008; Vol. 17, N.º 3, 2001) describe aislamiento, caracterización y expansión para poblaciones celulares renales primarias definidas de riñones normales y enfermos de roedores, caninos y seres humanos.

Kelly *et al.* (Am. J. Physiol. Renal. Physiol 299; F1026-F1039, 2010) evaluaron el efecto de las células renales, administradas por vía ortotópica mediante inyección intraparenquimatosa a los roedores 4-7 semanas después de que la CKD se estableciera mediante una reducción de 5/6 de la masa renal (NX) en dos etapas, con respecto a la regeneración de la función y la arquitectura del riñón de acuerdo con lo evaluado por marcadores fisiológicos, tisulares y moleculares.

Basu *et al.* (Cell Transplantation, Vol. 20, pp 1771-1790, 2011) investigan un mecanismo potencial por el que las

construcciones son adecuadas de aumento de neo-riñón podrían influir en una patología al evaluar el efecto de los medios condicionados en las rutas de señalización de TGF-β relacionadas con la progresión de la CKD asociada a fibrosis tubulointersticial. Observaron que el medio condicionado atenuaba la transición epitelial-mesenquimal inducida por TGF-β (EMT) *in vitro* en una línea de células tubulares proximales humanas (HK2).

El documento WO2012/064369 describe formulaciones terapéuticas que contienen células renales bioactivas.

El documento WO2011/143499 describe mezclas heterogéneas o fracciones de células renales bioactivas (BRC) y métodos para aislarlas y cultivarlas, así como métodos para tratar a un sujeto con necesidad de BRC y/o construcciones que contengan BRC formadas a partir de un armazón sembrado con las BRC como se describe en el documento WO2011/143499A.

Existe la necesidad de formulaciones terapéuticas que sean adecuadas para la administración de agentes activos, tal como por ejemplo, las células bioactivas en aplicaciones de ingeniería tisular y medicina regenerativa, a sujetos con necesidad.

El riñón es un órgano complejo que realiza muchas funciones para mantener la sangre limpia y químicamente equilibrada. Además de eliminar residuos, los riñones liberan tres hormonas importantes:

eritropoyetina, o EPO, que estimula la médula ósea para que produzca renina de los glóbulos rojos, que regula la presión sanguínea; y
calcitriol, la forma activa de la vitamina D, que ayuda a mantener el calcio de los huesos y el equilibrio químico normal del cuerpo.

Para realizar estas funciones, el riñón comprende numerosos tipos de células diferentes. Sin embargo, no todas las células renales son necesarias para una respuesta regenerativa y la identificación de la combinación de células útiles para provocar una respuesta regenerativa ha sido objeto de investigación. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de métodos que identifiquen una población celular renal heterogénea, es decir, las células bioactivas, que encuentre uso en las formulaciones terapéuticas que se desvelan en el presente documento.

Sumario de la invención

En el presente documento se desvela una población heterogénea de células renales de mamífero de tejido renal de mamífero. También se describen métodos para aislamiento y purificación de la población de células obtenidas a partir de riñón de mamífero. una población única de células obtenidas a partir de riñón de mamífero se caracteriza por sus características fenotípicas, por ejemplo, fenotipo de biomarcador. El fenotipo de expresión de biomarcador se retiene después de múltiples pases de la población de células obtenidas a partir de riñón de mamífero en cultivo y es adecuado para su uso en la preparación de una terapia regeneradora.

En el presente documento se describe una población seleccionada de una población de células renales humanas caracterizada por biomarcadores específicos y su uso.

La población seleccionada de células renales humanas permite el uso de números más pequeños de células que proporcionan un estímulo regenerador. Este número más pequeño es ventajoso porque reduce la posibilidad de sucesos inmunológicos adversos así como la provisión de un estímulo regenerador. La población de células renales seleccionadas no requiere una gran proporción de células madre para ser eficaz como un estímulo regenerador. La población de células renales seleccionada se puede recuperar a partir de un riñón enfermo.

En un aspecto, se proporcionan métodos para identificar una población heterogénea de células renales, comprendiendo dicho método las etapas de:

Aislar células de una muestra de riñón de mamífero;

Exponer dichas células aisladas a restos de detección etiquetados, en las que dicho resto de detección etiquetado se refiere a un biomarcador diferente y está etiquetado con una etiqueta diferente; en las que los biomarcadores detectados son GGT-1, una citoqueratina, VEGF y KIM-1; y

Determinar el porcentaje de células que expresan cada uno de dichos biomarcadores.

En una realización, la población heterogénea de células renales se caracteriza por su expresión fenotípica de biomarcadores. En ciertas realizaciones, las células renales se identifican con uno o más reactivos que permiten la detección de biomarcadores sobre/en la población heterogénea de células renales. La detección de los biomarcadores se puede llevar a cabo con cualquier método adecuado, por ejemplo, los basados en microscopía de inmunofluorescencia, citometría de flujo, citometría de barrido con fibra óptica, o citometría de barrido con láser.

En una realización, la población celular una población de células SRC que expresa dos o más biomarcadores

presentados en el listado de las Tablas 12.2 y 12.3. En una realización, los biomarcadores tienen niveles de expresión que se proporcionan en la Tabla 12.4. En una realización la población de células SRC tiene niveles de expresión para GGT-1 y CK18 superiores a un 18 % y un 80 %, respectivamente.

En el presente documento también se describen formulaciones inyectables, terapéuticas que contienen agentes activos, por ejemplo, las células bioactivas. En un caso, la formulación inyectable comprende células bioactivas y un biomaterial estabilizante celular sensible a la temperatura. En otro caso, el un biomaterial estabilizante celular sensible a la temperatura mantiene (i) un estado esencialmente sólido a aproximadamente 8 ºC o inferior y/o (ii) un estado esencialmente líquido a temperatura ambiente o superior. En otro caso, las células bioactivas comprenden células renales, como se describe en el presente documento. En otro caso, las células bioactivas se dispersan esencialmente de manera uniforme en todo el volumen del biomaterial estabilizante celular. En otros casos, el biomaterial en forma de un tiene un estado de transición de sólido con respecto a líquido entre aproximadamente 8 ºC y aproximadamente temperatura ambiente o superior. En un caso, el estado esencialmente sólido es un estado de gel. En otro caso, el biomaterial estabilizante celular comprende un hidrogel. En otro caso, el hidrogel comprende gelatina. En otros casos, la gelatina está presente en la formulación a aproximadamente 0,5 % a aproximadamente un 1 % (p/v). En un caso, la gelatina está presente en la formulación a aproximadamente un 0,75 % (p/v). En otro caso, la formulación además incluye un agente de viabilidad celular. En otro caso, el agente de viabilidad celular comprende un agente seleccionado entre el grupo que consiste en un antioxidante, un vehículo de oxígeno, un factor inmunomodulador, un factor de reclutamiento, un factor de unión celular, un agente antiinflamatorio, un inmunosupresor, un factor angiogénico, y un factor de curación de heridas. En algunos casos, el agente de viabilidad celular es un antioxidante. En un caso, el antioxidante es ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico. En otra realización, el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico está presente de aproximadamente 50 µM a aproximadamente 150 µM. En otra realización, el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico está presente a aproximadamente 100 µM. En algunos casos, el agente de viabilidad celular es un vehículo de oxígeno. En una realización, el vehículo de oxígeno es un perfluorocarbono. En otros casos, el agente de viabilidad celular es un agente inmunomodulador. En una realización, el agente de viabilidad celular es un inmunosupresor.

En el presente documento también se describen formulaciones inyectables, terapéuticas que contienen células renales bioactivas. En un caso, la formulación comprende células renales bioactivas, gelatina a aproximadamente un 0,75 % (p/v), y ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico a aproximadamente 100 µM, en el que la formulación tiene (i) un estado esencialmente sólido a aproximadamente 8 ºC o inferior, y (ii) un estado esencialmente líquido a temperatura ambiente o superior. En otro caso, las células renales bioactivas se dispersan esencialmente de manera uniforme en todo el volumen del biomaterial estabilizante celular. En otro caso, el biomaterial comprende un estado transicional de sólido con respecto a líquido entre aproximadamente 8 ºC y aproximadamente temperatura ambiente. En otros casos, el estado esencialmente sólido es un estado de gel. En algunos casos, la formulación además incluye un agente de viabilidad celular. Además en otro caso, el agente de viabilidad celular comprende un agente seleccionado entre el grupo que consiste en un antioxidante, un vehículo de oxígeno, un factor inmunomodulador, un factor de reclutamiento, un factor de unión celular, un agente antiinflamatorio, un factor angiogénico, y un factor de curación de heridas. En un caso, el agente de viabilidad celular es un vehículo de oxígeno. En otro caso, el vehículo de oxígeno es un perfluorocarbono. En otro caso, el agente de viabilidad celular es un agente inmunomodulador. En otros casos, el agente de viabilidad celular es un inmunosupresor.

La presente divulgación describe una formulación que además incluye perlas biocompatibles. En un caso, las perlas biocompatibles comprenden un biomaterial. En otro caso, las perlas están reticuladas. En otro caso, las perlas reticuladas tienen una susceptibilidad reducida con respecto a la degradación enzimática en comparación con las perlas biocompatibles no reticuladas. En otros casos, las perlas reticuladas son perlas reticuladas con carbodiimida. En un caso, la carbodiimida se selecciona entre el grupo que consiste en clorhidrato de 1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC), DCC-N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), y N,N'-Diisopropilcarbodiimida (DIPC). En otro caso, la carbodiimida es clorhidrato de 1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC). En otro caso, las perlas reticuladas comprenden un número reducido de aminas primarias libres en comparación con las perlas no reticuladas. En otros casos, el número de aminas primarias libres se puede detectar por vía espectrofotométrica a aproximadamente 355 nm. En algunos casos, las perlas se siembran con las células bioactivas. En un caso, las células bioactivas son células renales. En otro caso, la formulación además comprende perlas biocompatibles adicionales que comprenden un biomaterial sensible a la temperatura que mantiene (i) un estado esencialmente sólido a temperatura ambiente o inferior, y (ii) un estado esencialmente líquido a aproximadamente 37 ºC o superior. En otro caso, el biomaterial de las perlas comprende un estado transicional de sólido con respecto a líquido entre temperatura ambiente y aproximadamente 37 ºC. En otras realizaciones, el estado esencialmente sólido es un estado de gel. En un caso, el biomaterial de las perlas comprende un hidrogel. En otro caso, el hidrogel comprende gelatina. En otro caso, las perlas comprenden gelatina de aproximadamente un 5 % (p/v) a aproximadamente un 10 % (p/v). En algunos casos, las perlas biocompatibles adicionales son perlas espaciadoras. En otras realizaciones, las perlas espaciadoras no se siembran con células bioactivas.

En otra situación, las formulaciones de la presente divulgación contienen productos secretados con una población de células renales. En un caso, las formulaciones comprenden productos secretados con una población de células renales y/o células bioactivas. En otra realización, las células bioactivas son células renales. En otro caso, los productos comprenden uno o más de factores paracrinos, factores endocrinos, y factores yuxtacrinos. En otro caso, los productos

comprenden vesículas. En otros casos, las vesículas comprenden microvesículas. En un caso, las vesículas comprenden exosomas. En otro caso, las vesículas comprenden un producto secretado seleccionado entre el grupo que consiste en factores paracrinos, factores endocrinos, factores yuxtacrinos, y ARN.

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1** es un diagrama de flujo del proceso general de fabricación de NKA que se describe en el presente documento.
La **Figura 2A-D** es un diagrama de flujo que proporcionar detalles adicionales del proceso que se representa en la Figura 1 y que se describe en el presente documento.
La **Figura 3** es un gráfico que ejemplifica las variaciones en la duración del cultivo y en los rendimientos celulares de seis pacientes.
La **Figura 4** es una fotografía de la formación de bandas de SRC en un gradiente de densidad de OptiPrep® al 7 %. Se hace referencia al **Ejemplo 5**.
La **Figura 5** es un gráfico de barras que representa la expresión de marcadores de células renales en poblaciones de SRC humanas. Se hace referencia al **Ejemplo 12**.
La **Figura 6** es un gráfico de barras que representa la actividad enzimática de las SRC humanas. Se hace referencia al **Ejemplo 12**.
La **Figura 7A-D** representa una inyección de NKA en el riñón: (a) aguja insertada en la corteza del riñón, (b) administración de NKA, (c) múltiples puntos de administración en el riñón, y (d) implante final del NKA (a modo de ejemplo).

Descripción detallada de la invención

En el presente documento se desvelan formulaciones terapéuticas para agentes activos, tales como células bioactivas, así como métodos para preparar las mismas y métodos para tratar un sujeto con necesidad de las formulaciones. Las formulaciones de células bioactivas pueden ser adecuadas para mezclas heterogéneas o fracciones de células renales bioactivas (BRC). Las células renales bioactivas pueden ser células renales aisladas que incluyen células de riñón tubulares y que producen eritropoyetina (EPO). Las poblaciones de células BRC pueden incluir poblaciones de células tubulares enriquecidas y que producen eritropoyetina (EPO). Las BRC se pueden obtener a partir de o son las propias facciones de células renales de individuos sanos. Además, se proporcionan fracciones de células renales obtenidas a partir de un individuo enfermo que pueden carecer de ciertos componentes celulares pero se comparan to con las correspondientes fracciones de células renales de un individuo sano, aunque aún retienen propiedades terapéuticas. La presente divulgación también proporciona poblaciones celulares terapéuticamente activas que carecen de componentes celulares en comparación con un individuo sano, poblaciones celulares que se pueden, en una realización, aislar y expandir a partir de fuentes autólogas en diversas patologías.

Aunque en el presente documento se describen formulaciones de células bioactivas, la presente divulgación contempla formulaciones que contienen otros diversos agentes activos. Otros agentes activos adecuados incluyen, pero no se limitan a, agregados celulares, biomateriales acelulares, producto secretados de células bioactivas, agentes terapéuticos de molécula grande y pequeña, así como combinaciones de los mismos. Por ejemplo, un tipo de células bioactivas se puede combinar con microvehículos de base de biomaterial con o sin moléculas terapéuticas u otro tipo de células bioactivas, las células no unidas se pueden combinar con partículas acelulares.

1. Definiciones

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que normalmente entiende alguien con una experiencia habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Principles of Tissue Engineering, 3ª Ed. (Editado por R Lanza, R Langer, y J Vacanti), 2007 proporciona a alguien con experiencia en la materia una guía general para muchos de los términos usados en la presente solicitud. Alguien con experiencia en la materia reconocerá muchos métodos materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento, que se podrían usar en la práctica de la presente invención. De hecho, la presente invención no se limita en modo alguno los métodos y materiales que se describen.

El término "población celular", como se usa en el presente documento, se refiere a un número de células obtenidas por aislamiento directamente a partir de la fuente tisular adecuada, normalmente de un mamífero. La población celular aislada se puede cultivar posteriormente *in vitro*. Las personas con una experiencia habitual en la materia observarán que diversos métodos para aislamiento y cultivo de poblaciones celulares y varios números de células en una población celular son adecuados para su uso como se describe en el presente documento. Una población celular puede ser una población de células heterogéneas, no fraccionadas obtenida a partir de un órgano o tejido, por ejemplo, el riñón. Por ejemplo, una población celular heterogénea se puede aislar a partir de una biopsia del tejido o de un tejido de órgano completo. Como alternativa, la población celular heterogénea se puede obtener a partir de cultivos *in vitro* de células de mamífero, establecidos a partir de biopsias de tejido o tejido de órgano completo. Una población celular heterogénea no fraccionada también se puede denominar población celular no enriquecida. En un caso, las poblaciones celulares contienen células bioactivas.

El término "órgano nativo" hará referencia al órgano de un sujeto vivo. El sujeto puede estar sano o enfermo. Un sujeto enfermo puede tener una enfermedad asociada con ese órgano en particular.

El término "riñón nativo" hará referencia al riñón de un sujeto vivo. El sujeto puede estar sano o enfermo. Un sujeto enfermo puede tener una enfermedad renal.

El término "efecto regenerador" hará referencia a un efecto que proporciona un beneficio a un órgano nativo, tal como el riñón. El efecto puede incluir, pero no se limita a, una reducción del grado de lesión con respecto a un órgano nativo o una mejora de, restauración de, o estabilización de una función de un órgano nativo. La lesión renal puede estar en forma de fibrosis, inflamación, hipertrofia glomerular, etc., y en relación con una enfermedad asociada con el órgano nativo en el sujeto.

El término "combinación", como se usa en el presente documento, se refiere a una combinación de dos o más poblaciones celulares enriquecidas, aisladas obtenidas a partir de una población de células heterogéneas, no fraccionadas. De acuerdo con ciertas realizaciones, las poblaciones celulares son poblaciones de células renales.

Una población o preparación de células "enriquecidas" se refiere a una población de células obtenidas a partir de una población celular de órgano de partida (por ejemplo, una población de células heterogéneas, no fraccionadas) que contiene un porcentaje mayor de un tipo de célula específico que el porcentaje de ese tipo celular en la población de partida. Por ejemplo, una población de células de riñón de partida se puede enriquecer para una primera, una segunda, una tercera, una cuarta, una quinta, etc., población celular de interés. Como se usa en el presente documento, los términos "población celular", "preparación celular" y "prototipo celular" se usan indistintamente.

En una situación, el término población celular "enriquecida", como se usa en el presente documento, se refiere a una población de células obtenidas a partir de una población celular de órgano de partida (por ejemplo, una suspensión celular de una biopsia de riñón o células de riñón de mamífero cultivadas) que contiene un porcentaje de células capaces de producir EPO que es mayor que el porcentaje de células capaces de producir EPO en la población de partida. Por ejemplo, el término "B4" es una población de células obtenidas a partir de una población de células de riñón de partida que contiene un porcentaje más elevado de células que producen EPO, las células glomerulares, y células vasculares en comparación con la población de partida. Las poblaciones celulares pueden tener enriquecimiento de uno o más tipos celulares y agotamiento de uno o más tipos celulares. Por ejemplo, una población celular que produce EPO enriquecida puede estar enriquecida con fibroblastos intersticiales y presentar agotamiento de células tubulares y células epiteliales de conductos de recogida con respecto a los fibroblastos intersticiales y células tubulares en una población celular no enriquecida, es decir, la población celular de partida a partir de la que se obtiene la población celular enriquecida. En todos los casos en los que se mencionan poblaciones enriquecidas con EPO o "B4", las poblaciones celulares enriquecidas son poblaciones de células heterogéneas que contienen células que producen EPO de una forma regulada por oxígeno, como se demuestra mediante la expresión de EPO modificable con oxígeno a partir del gen nativo endógeno de EPO.

En otra situación, una población de células renales enriquecida, que contiene un porcentaje más elevado de un tipo de célula específica, por ejemplo, las células vasculares, glomerulares, o endocrinas, que el porcentaje de ese tipo de célula en la población de partida, también puede carecer obtener eficiencia de uno o más tipos de células específicas, por ejemplo, las células vasculares, glomerulares, o endocrinas, en comparación con una población de células de riñón de partida obtenidas a partir de un individuo o sujeto sano. Por ejemplo, el término "B4'", o cebado de B4", en una situación, es una población de células obtenidas a partir de una población de células de riñón de partida que carece o que tiene deficiencia de uno o más tipos celulares, por ejemplo, vasculares, glomerulares o endocrinas, dependiendo de la patología de la muestra de ensayo de partida, en comparación con un individuo sano. En un caso, la población de células B4' se obtiene a partir de un sujeto que tiene enfermedad renal crónica. En un ejemplo, la población de células B4' se obtiene a partir de objeto que tiene glomeruloesclerosis segmentaria focal (FSGS). En otro caso, la población de células B4' se obtiene a partir de un sujeto que tiene glomerulonefritis autoinmune. En otra situación, B4' es una población de células obtenidas a partir de una población celular de partida que incluye todos los tipos de células, por ejemplo, las células vasculares, glomerulares, o endocrinas, que posteriormente presenta agotamiento o deficiencia de uno o más tipos de células, por ejemplo, las células vasculares, glomerulares, o endocrinas. Además en otra situación, B4' es una población de células obtenidas a partir de una población celular de partida que incluye todos los tipos de células, por ejemplo, las células vasculares, glomerulares, o endocrinas, en la que uno o más tipos de células específicas por ejemplo, las células vasculares, glomerulares, o endocrinas, posteriormente se enriquece. Por ejemplo, en un caso, una población de células B4' puede presentar enriquecimiento de células vasculares el agotamiento de células glomerulares y/o endocrinas. En otro caso, una población de células B4' puede presentar enriquecimiento de células glomerulares pero agotamiento de células vasculares y/o endocrinas. En otro caso, una población de células B4' puede presentar enriquecimiento de células endocrinas pero agotamiento de células vasculares y/o glomerulares. En otro caso, una población de células B4' puede presentar enriquecimiento de células vasculares y endocrinas pero agotamiento de células glomerulares. En casos preferentes, la población de células B4', sola o combinada con otra población de células enriquecidas, por ejemplo, B2 y/o B3, retiene propiedades terapéuticas. Una población de células B4', por ejemplo, es la que se describe en el presente documento en los Ejemplos, por ejemplo, los Ejemplos 11-13.

En otra situación, una población de células enriquecidas también puede hacer referencia a una población de células obtenidas a partir de una población de células de riñón de partida como se ha discutido anteriormente que contiene un porcentaje de células que expresan uno o más marcadores vasculares, glomerulares y del túbulo proximal con algunas células que producen EPO que es mayor que el porcentaje de células que expresan uno o más marcadores vasculares, glomerulares y del túbulo proximal con algunas células que producen EPO en la población de partida. Por ejemplo, el término "B3" se refiere a una población de células obtenidas a partir de una población de células de riñón de partida que contiene un porcentaje más elevado de células del túbulo proximal así como células vasculares y glomerulares en comparación con la población de partida. En un caso, la población de células B3 contiene un porcentaje más elevado de células del túbulo proximal en comparación con la población de partida pero un porcentaje menor de células del túbulo proximal en comparación con la población de células B2. En otro caso, la población de células B3 contiene un porcentaje más elevado de marcado desde células vasculares y glomerulares con algunas células que producen EPO en comparación con la población de partida pero un porcentaje menor de marcado desde células vasculares y glomerulares con algunas células que producen EPO en comparación con la población de células B4.

En otra situación, una población de células enriquecidas también puede hacer referencia a una población de células obtenidas a partir de una población de células de riñón de partida como se ha discutido anteriormente que contiene un porcentaje de células que expresan uno o más marcadores de células tubulares que es mayor que el porcentaje de células que expresan uno o más marcadores de células tubulares en la población de partida. Por ejemplo, el término "B2" se refiere a una población de células obtenidas a partir de una población de células de riñón de partida que contiene un porcentaje más elevado de células tubulares en comparación con la población de partida. Además, una población celular enriquecida con células que expresan uno o más marcadores de células tubulares (o "B2") puede contener algunas células epiteliales del sistema de conductos de recogida. Aunque la población celular enriquecida con células que expresan uno o más marcadores de células tubulares (o "B2") presenta un agotamiento relativo de células que producen EPO, las células glomerulares, y células vasculares, la población enriquecida puede contener un porcentaje más pequeño de estas células (que producen EPO, glomerulares, y vasculares) en comparación con la población de partida. En general, una población celular heterogénea presenta agotamiento de uno o más tipos de células de modo que en la población celular agotada presenta una proporción menor del tipo o tipos de células con respecto a la proporción del tipo o tipos de células contenidas en la población celular heterogénea antes del agotamiento. Los tipos celulares pueden estar agotados son cualquier tipo de célula renal. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los tipos celulares que pueden estar agotados incluyen células con granularidad grande del sistema de conductos de recogida y tubular que tienen una densidad < aproximadamente 1,045 g/ml, denominadas "B1". En otras ciertas realizaciones, los tipos de células que pueden presentar agotamiento incluyen células de residuos y pequeñas de baja granularidad y viabilidad que tienen una densidad > aproximadamente 1,095 g/ml, denominadas "B5". En algunas realizaciones, la población de células enriquecidas con células tubulares presenta un acortamiento relativo de las siguientes células: células "B1", "B5", las células que expresan EPO que se pueden modificar con oxígeno, las células glomerulares, y células vasculares.

El término condiciones de cultivo "hipóxicas", como se usa en el presente documento, se refiere a condiciones de cultivo en las que las células se someten a una reducción de los niveles de oxígeno disponibles en el sistema de cultivo con respecto a las condiciones de cultivo convencionales en las que las células se cultivan en niveles de oxígeno atmosférico (aproximadamente un 21 %). En el presente documento las condiciones no hipóxicas se denominan condiciones normales o normóxicas.

El término "que se puede modificar con oxígeno", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de las células para modular la expresión genética (hacia arriba o hacia abajo) basándose en la cantidad de oxigeno disponible para las células. "Inducible por hipoxia" se refiere a la regulación positiva de la expresión genética como respuesta a una reducción de la tensión de oxígeno (independientemente de tensión de oxígeno de inducción previa o de partida).

El término "biomaterial", como se usa en el presente documento, se refiere a un material biocompatible natural o sintético que es adecuado para su introducción en tejidos vivos. Un biomaterial natural es un material que se forma o que se origina en un sistema vivo. Los biomateriales sintéticos son materiales que no se forman ni se originan en un sistema vivo. Los biomateriales que se desvelan en el presente documento pueden ser una combinación de materiales biocompatibles naturales y sintéticos. Como se usa en el presente documento, los biomateriales incluyen, por ejemplo, matrices y armazones poliméricos. Las personas con una experiencia habitual en la materia observarán que el biomaterial o biomateriales se pueden configurar en varias formas, por ejemplo, como espuma porosa, geles, líquidos, perlas, sólidos, y pueden ser uno o más materiales biocompatibles naturales o sintéticos. En un caso, el biomaterial es la forma líquida de una solución que es capaz de convertirse en un hidrogel.

El término "liberación modificada" o los términos equivalentes "liberación controlada", "liberación retardada", o "liberación lenta" se refieren a formulaciones que liberan un agente activo, como células bioactivas, a lo largo del tiempo o en más de un punto en el tiempo después de su administración a un individuo. La liberación modificada de un agente activo, que puede ocurrir en un intervalo de tiempos deseados, por ejemplo, minutos, horas, días, semanas, o más, dependiendo de la formulación, contrasta con las formulaciones convencionales en las que esencialmente la unidad de dosificación completa está disponible inmediatamente después de la administración. Para aplicaciones de

ingeniería tisular y medicina regenerativa, las formulaciones preferentes de liberación modificada pueden la liberación de un agente activo en múltiples puntos de tiempo después de la administración local (por ejemplo, administración de un agente activo directamente hasta un órgano sólido). Por ejemplo, una formulación de liberación modificada de células bioactivas podría proporcionar una liberación inicial de células inmediatamente en el momento de la administración y una segunda liberación posterior de células en un momento posterior. El tiempo de retraso para la segunda liberación de un agente activo puede ser minutos, horas, o días después de la administración inicial. En general, el periodo de tiempo para el retraso de la liberación corresponde al periodo de tiempo que tarda un vehículo de biomaterial del agente activo en perder su integridad estructural. La liberación retrasada de un agente activo comienza cuando dicha integridad comienza a degradarse y se completa cuando la integridad falla por completo. Las personas con una experiencia habitual en la materia observarán otros mecanismos adecuados de liberación.

El término "anemia", como se usa en el presente documento, se refiere a un déficit en el número de glóbulos rojos y/o niveles de hemoglobina debido a la producción inadecuada de la proteína EPO funcional por las células que producen EPO de un sujeto, y/o liberación inadecuada de la proteína EPO en la circulación sistémica, y/o la incapacidad de los eritroblastos en la médula ósea para responder a la proteína EPO. Un sujeto con anemia es incapaz de mantener la homeostasis eritroide. En general, la anemia se puede producir con una disminución o pérdida de la función renal (por ejemplo, insuficiencia renal crónica), anemia asociada con deficiencia relativa de EPO, anemia asociada con insuficiencia cardiaca congestiva, anemia asociada con terapia supresora mieloide como quimioterapia o terapia antiviral (por ejemplo, AZT), anemia asociada con cánceres no mieloides, anemia asociada con infecciones virales como el VIH y anemia de enfermedades crónicas tales como enfermedades autoinmunes (por ejemplo, artritis reumatoide), enfermedad hepática e insuficiencia sistémica multiorgánica.

El término "deficiencia de EPO" se refiere a cualquier afección o trastorno que se puede tratar con un agonista de receptores de eritropoyetina (por ejemplo, análogos de EPO recombinante o EPO), incluyendo la anemia.

El término "enfermedad relacionada con los órganos", como se usa en el presente documento, se refiere a trastornos asociados con cualquier etapa o grado de insuficiencia orgánica aguda o crónica que da como resultado una pérdida de la capacidad del órgano para realizar su función.

El término "enfermedad renal", como se usa en el presente documento, se refiere a trastornos asociados con cualquier etapa o grado de insuficiencia renal aguda o crónica que da como resultado una pérdida de la capacidad del riñón para realizar la función de filtración de sangre y eliminación de exceso de líquido, electrolitos y desechos de la sangre. La enfermedad renal también incluye disfunciones endocrinas tales como anemia (deficiencia de eritropoyetina) y desequilibrio mineral (deficiencia de vitamina D). La enfermedad renal se puede originar en el riñón o puede ser secundaria a varias afecciones, que incluyen (pero no se limitan a) insuficiencia cardiaca, hipertensión, diabetes, enfermedad autoinmune o enfermedad hepática. La enfermedad renal puede ser una afección de insuficiencia renal crónica que se desarrolla después de una lesión aguda en el riñón. Por ejemplo, la lesión del riñón por isquemia y/o exposición a sustancias tóxicas puede causar insuficiencia renal aguda; la recuperación incompleta después de una lesión renal aguda puede conducir al desarrollo de insuficiencia renal crónica.

El término "tratamiento" se refiere tanto a un tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas para la enfermedad renal, anemia, deficiencia de EPO, deficiencia de transporte tubular, o deficiencia de filtración glomerular en las que el objeto es revertir, prevenir o ralentizar (disminuir) el trastorno diana. Los individuos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya tienen una enfermedad renal, anemia, deficiencia de EPO, deficiencia de transporte tubular, o deficiencia de filtración glomerular, así como aquellos propensos a tener una enfermedad renal, anemia, deficiencia de EPO, deficiencia de transporte tubular, o deficiencia de filtración glomerular o aquellos en los que se debe prevenir la enfermedad renal, anemia, deficiencia de EPO, deficiencia de transporte tubular, o deficiencia de filtración glomerular. El término "tratamiento" como se usa en el presente documento incluye la estabilización y/o la mejora de la función renal.

El término "contacto *in vivo*", como se usa en el presente documento, se refiere a un contacto directo *in vivo* entre productos secretados por una población de células enriquecidas y un órgano nativo. Por ejemplo, los productos secretados por una población de células renales enriquecidas (o una combinación o constructo que contiene células renales/fracciones de células renales) pueden entrar en contacto *in vivo* con un riñón nativo. El contacto directo *in vivo* puede ser de naturaleza paracrina, endocrina, o yuxtacrina. Los productos secretados pueden ser una población heterogénea de diferentes productos que se describen en el presente documento.

El término "ácido ribonucleico" o "ARN", como se usa en el presente documento, se refiere a una cadena de unidades de nucleótidos en la que cada unidad está formada por una base nitrogenada, un azúcar ribosa y un fosfato. El ARN puede estar en forma monocatenaria o bicatenaria. El ARN puede ser parte, estar dentro de, o asociado con una vesícula. La vesícula puede ser un exosoma. El ARN incluye, pero no se limita a, ARNm, ARNr, ARN pequeño, ARNsn, ARNsno, microARN (miARN), ARN de interferencia pequeño (ARNsi) y ARN no codificante. El ARN es preferentemente ARN humano.

El término "constructo" se refiere a una o más poblaciones celulares depositadas sobre o en una superficie de un armazón o matriz formada por uno o más materiales biocompatibles sintéticos o naturales. La una o más poblaciones

celulares se pueden revestir, depositar, gustar, unir, sembrado atrapar en un biomaterial formado por uno o más biomateriales, polímeros, proteínas o péptidos biocompatibles sintéticos o naturales. La una o más poblaciones celulares se pueden combinar con un biomaterial o armazón o matriz *in vitro* o *in vivo*. En general, el uno o más materiales biocompatibles usados para formar el armazón/ biomaterial se seleccionan para dirigir, facilitar o permitir la formación de una organización multicelular, tridimensional, de al menos uno de las poblaciones celulares depositadas sobre el mismo. El uno o más biomateriales usados para generar el constructo también se pueden seleccionar para dirigir, facilitar, permitir la dispersión y/o la integración del constructo o los componentes celulares del constructo con el tejido del hospedador endógeno, o para dirigir, facilitar o permitir supervivencia, injerto, tolerancia, o rendimiento funcional del constructo o componentes celulares del constructo.

El término "marcador" o "biomarcador" se refiere generalmente a un ADN, ARN, proteína, carbohidrato, marcador molecular a base de glicolípidos, cuya expresión o presencia en una población celular cultivada se puede detectar mediante métodos convencionales (o métodos que se desvelan en el presente documento) y es coherente con uno o más células en la población celular cultivada que es un tipo particular de célula. Dichos biomarcadores incluyen, pero no se limitan a, los genes que se presentan en las Tablas X e Y. El marcador puede ser un polipéptido expresado por la célula o una ubicación física identificable en un cromosoma, como un gen, un sitio de reconocimiento de endonucleasa de restricción o un ácido nucleico que codifica un polipéptido (por ejemplo, un ARNm) expresado por la célula nativa. El marcador puede ser una región expresada de un gen denominado "marcador de expresión génica", o algún segmento de ADN que no tenga una función de codificación conocida. Los biomarcadores pueden ser productos obtenidos a partir de células, por ejemplo, secretados.

Los términos "firma de biomarcador", "firma", "firma de expresión de biomarcador" o "firma de expresión" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a una o una combinación de biomarcadores cuya expresión es un indicador del tipo o tipos de células, por ejemplo, epiteliales, tubulares, etc., que comprenden una población celular, por ejemplo, las células renales bioactivas. La firma del biomarcador puede servir como un indicador de la idoneidad de la población celular para su uso en los métodos y productos establecidos en este documento. En algunos casos, la firma del biomarcador es una "firma genética". El término "firma genética" se usa indistintamente con "firma de expresión génica" y se refiere a una combinación de polinucleótidos cuya expresión es un indicador del tipo de célula, por ejemplo, epitelial, tubular, etc. En algunas realizaciones, la firma del biomarcador es una "firma proteica". El término "firma de proteína" se usa indistintamente con "firma de expresión de proteína" y se refiere a una combinación de polipéptidos cuya expresión es un indicador del tipo de célula, por ejemplo, epitelial, tubular, etc.

Los términos "nivel de expresión" o "nivel expresivo" se usan indistintamente y generalmente se refieren a la cantidad de un polinucleótido o un producto de aminoácido o proteína en una muestra biológica, o el porcentaje de células que expresan el polinucleótido o un producto de aminoácido o proteína. "Expresar" o "Expresión" y sus variantes gramaticales se refieren a la presencia de un polinucleótido o un producto o proteína de aminoácidos en una cantidad detectable en una muestra biológica. Por ejemplo, se puede decir que una proteína que es detectable (por encima de los valores de fondo o de control) expresa la proteína. De forma análoga si una parte de células en una muestra expresa la proteína, se puede decir que la muestra expresa la proteína. Como alternativa, se puede decir que la muestra tiene un nivel de expresión relacionado con el porcentaje de células que expresan la proteína, por ejemplo, si un 60 % de las células en una muestra expresan la proteína, entonces el nivel de expresión es de un 60 %.

Los términos "gen expresado diferencialmente", "expresión génica diferencia" y sus sinónimos, que se usan indistintamente, se refieren a un gen cuya expresión se activa a un nivel superior o inferior en una primera célula o población celular, en relación con su expresión en una segunda célula o población celular. Los términos también incluyen genes cuya expresión se activa a un nivel superior o inferior en diferentes etapas a lo largo del tiempo durante el pase de la primera o segunda célula en cultivo. También se entiende que un gen expresado diferencialmente puede activarse o inhibirse a nivel de ácido nucleico o de proteína, o puede estar sujeto a un corto y empalme alternativo para dar como resultado un producto polipeptídico diferente. Las diferencias de ese tipo se pueden poner en evidencia mediante un cambio en los niveles de ARNm, expresión superficial, secreción u otro reparto de un polipéptido, por ejemplo. La expresión génica diferencial puede incluir una comparación de la expresión entre dos o más genes o sus productos génicos, o una comparación de las proporciones de la expresión entre dos o más genes o sus productos génicos, o incluso una comparación de dos productos procesados de manera diferente del mismo gen, que difieren entre la primera célula y la segunda célula. La expresión diferencial incluye diferencias cuantitativas, así como cualitativas, en el patrón de expresión temporal o celular en un gen o sus productos de expresión entre, por ejemplo, la primera célula y la segunda célula. Para los fines de la presente divulgación, se considera que la "expresión génica diferencial" está presente cuando hay una diferencia entre la expresión de un gen dado en la primera célula y la segunda célula. La expresión diferencial de un marcador puede ser en células de un paciente antes de la administración de una población, combinación, o constructo celular (la primera célula) en relación con la expresión en células del paciente después de la administración (la segunda célula).

Los términos "inhibir", "regular de forma negativa", "subexpresar" y "reducir" se usan indistintamente y hacen referencia a que la expresión de un gen, nivel de moléculas de ARN o moléculas de ARN equivalentes que codifican una o más proteínas o subunidades proteicas, o la actividad de una o más proteínas o subunidades proteicas, se reducen en relación con uno o más controles, tales como, por ejemplo, uno o más controles positivos y/o negativos. La subexpresión puede ser en células de un paciente antes de la administración de una población, combinación o

construcciones celulares con respecto a las células del paciente después de la administración.

El término "regulación positiva" o "sobreexpresión" se usa para hacer referencia a que la expresión de un gen, un nivel de moléculas de ARN o moléculas de ARN equivalentes que codifican una o más proteínas o subunidades de proteínas, o la actividad de una o más proteínas o subunidades proteicas están elevadas en relación con uno o más controles, como, por ejemplo, uno o más controles positivos y/o negativos. La sobreexpresión puede ser en células de un paciente después de la administración de una población, combinación o constructo celular en relación con las células del paciente antes de la administración.

El término "sujeto" hará referencia a cualquier sujeto humano individual, incluyendo un paciente, elegible para tratamiento, que experimente o haya experimentado uno o más signos, síntomas u otros indicadores de una enfermedad relacionada con los órganos, tal como enfermedad renal, anemia, o deficiencia de EPO. Dichos sujetos incluyen, pero no se limitan a, sujetos que han sido diagnosticados recientemente o previamente diagnosticados y ahora experimentan una recurrencia o recaída, o están en riesgo de una enfermedad renal, anemia, o deficiencia de EPO, sin importar la causa. El sujeto puede haber sido tratado previamente para una enfermedad renal, anemia, o deficiencia de EPO, o pueden haber sido tratado.

El término "paciente" se refiere a cualquier animal individual, más preferentemente un mamífero (incluyendo animales no humanos tales como, por ejemplo, perros, gatos, caballos, conejos, animales de zoológico, vacas, cerdos, ovejas y primates no humanos) para los que se desea tratamiento. Más preferentemente, en el presente documento el paciente es un ser humano.

El término "muestra" o "muestra de paciente" o "muestra biológica" generalmente a la referencia a cualquier muestra biológica obtenida a partir de un sujeto o paciente, fluido corporal, tejido corporal, línea celular, cultivo de tejido u otra fuente. El término incluye biopsias de tejido como, por ejemplo, biopsias renales. El término incluye células cultivadas tales como, por ejemplo, las células de riñón de mamífero cultivadas. Los métodos para obtener biopsias de tejidos y células cultivadas de mamíferos se conocen bien en la técnica. Si el término "muestra" se usa solo, hará referencia a que la "muestra" es una "muestra biológica" o "muestra del paciente", es decir, los términos se usan indistintamente.

El término "muestra de ensayo" se refiere a una muestra de un sujeto que ha sido tratado con un método que se desvela en el presente documento. La muestra de ensayo se puede originar a partir de varias fuentes en el sujeto mamífero, que incluyen, pero no se limitan a, sangre, semen, suero, orina, médula ósea, mucosa, tejido, etc.

El término "control" o "muestra de control" se refiere a un control negativo o positivo en el que se espera que un resultado negativo o positivo ayude a correlacionar un resultado en la muestra de ensayo. Los controles que son adecuados incluyen, pero no se limita, una muestra que se sabe que exhibe indicadores característicos de la homeostasis eritroide normal, una muestra que se sabe que exhibe indicadores característicos de anemia, una muestra obtenida de un sujeto que se sabe que no es anémico, y una muestra obtenida de un sujeto se sabe que es anémico. Los controles adicionales adecuados para su uso en los métodos proporcionados en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, muestras obtenidas a partir de sujetos que han sido tratados con agentes farmacológicos conocidos por modular la eritropoyesis (por ejemplo, análogos de EPO o EPO recombinante). Además, el control puede ser una muestra obtenida a partir de un sujeto antes de ser tratado con un método descrito en el presente documento. Un control adecuado adicional puede ser una muestra de ensayo obtenida a partir de un sujeto que se sabe que tiene cualquier tipo o etapa de enfermedad renal, y una muestra de un sujeto que se sabe que no tiene ningún tipo o etapa de enfermedad renal. Un control puede ser un control emparejado sano normal. Los expertos en la materia observarán otros controles adecuados para su uso en el presente documento.

"Pronóstico de regeneración", "pronóstico regenerativo", o "pronóstico para regeneración" generalmente se refiere a un pronóstico o predicción del curso regenerativo probable o resultado de la administración o implantación de una población, combinación o constructo celular que se describe en el presente documento. Para un pronóstico de regeneración, el pronóstico o predicción se pueden informar mediante uno o más de los siguientes: mejora de un órgano funcional (por ejemplo, el riñón) después de la implantación o administración, desarrollo de un riñón funcional después de la implantación o administración, desarrollo de mejoría o capacidad de la función renal después de la implantación o administración, y expresión de ciertos marcadores por el riñón nativo después de la implantación o administración

"Órgano regenerado" se refiere a un órgano nativo después de la implantación o administración de una población, combinación, o constructo celular como se describe en el presente documento. El órgano regenerado se caracteriza por varios indicadores que incluyen, pero no se limitan a, desarrollo de la función o capacidad en el órgano nativo, mejora de la función o la capacidad en el órgano nativo, y la expresión de ciertos marcadores en el órgano nativo. Las personas con una experiencia habitual en la materia observarán que otros indicadores pueden ser adecuados para caracterizar un órgano regenerado.

"Riñón regenerado" se refiere a un riñón nativo después de la implantación o administración de una población, combinación, o constructo celular como se describe en el presente documento. El riñón regenerado se caracteriza por varios indicadores que incluyen, pero no se limitan a, desarrollo de la función o capacidad en el riñón nativo, mejora de la función o la capacidad en el riñón nativo, y la expresión de ciertos marcadores en el riñón nativo. Las personas

con una experiencia habitual en la materia observarán que otros indicadores pueden ser adecuados para caracterizar un riñón regenerado.

El término "agregado celular" o "esferoide" se refiere a un agregado o conjunto de células cultivados para permitir el crecimiento 3D a diferencia del crecimiento como una monocapa. Se observa que el término "esferoide" no implica que el agregado sea una esfera geométrica. El agregado puede estar altamente organizado con una morfología bien definida o puede ser una masa no organizada; puede incluir un solo tipo de célula o más de un tipo de células. Las células pueden ser aisladas primarias, o una línea de células permanentes, o una combinación de las dos. En esta definición se incluyen cultivos organoides y organotípicos.

El término "temperatura ambiente" se refiere a la temperatura a la que las formulaciones de la presente divulgación se administrarán a un sujeto. En general, la temperatura ambiente es la temperatura de un entorno de temperatura controlada. La temperatura ambiente varía de aproximadamente 18 ºC a aproximadamente 30 ºC. En una realización, la temperatura ambiente es aproximadamente 18 ºC, aproximadamente 19 ºC, aproximadamente 20 ºC, aproximadamente 21 ºC, aproximadamente 22 ºC, aproximadamente 23 ºC, aproximadamente 24 ºC, aproximadamente 25 ºC, aproximadamente 26 ºC, aproximadamente 27 ºC, aproximadamente 28 ºC, aproximadamente 29 ºC, o aproximadamente 30 ºC.

El término "etiqueta" cuando se usa en el presente documento se refiere a un compuesto o composición que se conjuga o fusiona directamente o indirectamente a un reactivo tal como una sonda de ácido nucleico o un anticuerpo y facilita la detección del reactivo para que esté conjugado o fusionado. La propia etiqueta puede ser detectable (por ejemplo, etiquetas de radioisótopos o etiquetas fluorescentes) o, en el caso de una etiqueta enzimática, puede catalizar la alteración química de un compuesto de sustrato o composición que es detectable. El término pretende incluir el etiquetado directo de una sonda o anticuerpo mediante el acoplamiento (es decir, unión física) una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como el etiquetado indirecto de la sonda o anticuerpo por reactividad con otro reactivo que está directamente etiquetado. Los ejemplos de etiquetado indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario mediante un anticuerpo secundario etiquetado con fluorescencia y el etiquetado final de una sonda de ADN con biotina de modo que pueda detectarse con estreptavidina etiquetada con fluorescencia.

El término "detección" incluye cualquier medio de detección, incluyendo la detección directa e indirecta.

Un "kit" es cualquier fabricación (por ejemplo, un paquete o contenedor) que comprende al menos un reactivo, por ejemplo, un medicamento para el tratamiento de una enfermedad renal, o una sonda para detectar específicamente un gen o proteína biomarcador como se desvela en el presente documento. La fabricación se promueve, distribuye o comercializa como unidad para llevar a cabo los métodos que se desvelan en el presente documento.

2. Poblaciones celulares

Las formulaciones de la presente divulgación pueden contener poblaciones heterogéneas, aisladas de células renales, y combinación es de las mismas, enriquecidas con componentes bioactivos específicos o tipos celulares y/o con agotamiento de componentes específicos inactivos o no deseados o tipos de células para uso en el tratamiento de enfermedades renales, es decir, que proporcionan estabilización y/o mejora y/o regeneración de la función renal, que se han descrito anteriormente en Presnell *et al.,* documento U.S. 2011-0117162 e Ilagan *et al.* PCT/US2011/036347. Las formulaciones pueden contener fracciones de células renales aisladas que carecen de componentes celulares en comparación con un individuo sano que todavía retienen propiedades terapéuticas, es decir, proporcionan estabilización y/o mejora y/o regeneración de la función renal. Las poblaciones celulares, fracciones celulares, y/o combinaciones de células que se describen en el presente documento se pueden obtener a partir de individuos sanos, y vivos con una enfermedad renal, o sujetos como se describe en el presente documento.

La presente divulgación describe formulaciones que son adecuadas para su uso con varias poblaciones de células bioactivas que incluyen, pero no se limitan a, población o poblaciones de células aisladas, fracción o fracciones celulares, combinación o combinaciones, población o poblaciones de células enriquecidas, agregado o agregados celulares, y cualquier combinación de los mismos. En una realización, las poblaciones de células bioactivas son células renales bioactivas.

Poblaciones celulares bioactivas

La presente divulgación describe formulaciones terapéuticas adecuadas para poblaciones de células bioactivas que se van a administrar a órganos o tejidos diana en un sujeto con necesidad. Una población celular bioactiva generalmente se refiere a una población celular que tiene potencialmente propia les terapéuticas después de su administración a un sujeto. Por ejemplo, después de su administración a un sujeto con necesidad, una población de células renales bioactivas puede proporcionar estabilización y/o mejora y/o regeneración de la función renal en el sujeto. Las propias terapéuticas pueden incluir un efecto regenerador.

Las poblaciones de células bioactivas incluyen, pero no se limitan a, las células madre (por ejemplo, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes, unipotentes) tales como células madre embrionarias, las células madre amnióticas, las células madre adultas (por ejemplo, hematopoyéticas, mamarias, intestinales, mesenquimales, placentarias, pulmón,

médula ósea, sangre, cordón umbilical, endotelial, pulpa dental, adiposo, neural, olfatorio, cresta neural, testicular), las células madre pluripotentes inducidas; células modificadas genéticamente; así como poblaciones celulares o explantes de tejidos obtenidos a partir de cualquier fuente del cuerpo. Las formulaciones que se describen en el presente documento también se pueden usar con poblaciones celulares obtenidas a partir de tejido adiposo renal como se describe en Basu *et al.,* documento PCT/US11/39859 presentado el 9 de junio de 2011; y con las células de músculo liso obtenidas a partir de tejido adiposo. Y es a partir de sangre periférica que se describen en Ludlow *et al.*, documento U.S. 2010-0131075 y Ludlow *et al.,* documento PCT/US11/35058 presentado el 3 de mayo de 2011; o células de músculo urotelial o liso obtenidas a partir de la vejiga como se describe en el documento de Patente de Estados Unidos N.º U.S. 6.576,019 de Atala. Las poblaciones de células bioactivas pueden ser de naturaleza aislada, enriquecida, purificada, homogénea o heterogénea. Las personas con una experiencia habitual en la materia observarán otras poblaciones de células bioactivas que son adecuadas para su uso en las formulaciones de la presente divulgación.

En un caso, la fuente de células es la misma que el órgano o tejido diana deseado. Por ejemplo, las células renales pueden provenir del riñón para su uso en una formulación que se va a administrar al riñón. En otro caso, la fuente de las células no es la misma que el órgano o tejido diana previsto. Por ejemplo, las células que expresan eritropoyetina pueden provenir del adiposo renal para su uso en una formulación para su administración al riñón.

La presente divulgación describe formulaciones que contienen ciertas subfracciones de una población heterogénea de células renales, con enriquecimiento de componentes bioactivos y agotamiento de componentes inactivos o no deseados que proporcionan resultados terapéuticos y regeneradores superiores que la población de partida. Por ejemplo, las células renales bioactivas que se describen en el presente documento, por ejemplo, B2, B4, y B3, que presentan agotamiento de componentes inactivos o no deseados, por ejemplo, B1 y B5, solas o combinadas, pueden ser parte de una formulación que se va a usar para la estabilización y/o mejora y/o regeneración de la función renal.

En otra situación, las formulaciones contienen una subfracción específica, B4, con agotamiento o con deficiencia de uno o más tipos de células, por ejemplo, vasculares, endocrinas, endoteliales, es decir, B4', que retienen propiedades terapéuticas, por ejemplo, estabilización y/o mejora y/o regeneración de la función renal, solas o cuando se mezclan con otras subfracciones bioactivas, por ejemplo, B2 y/o B3. En un caso preferente, la población de células bioactivas es B2. En ciertos casos, la población de células B2 se combina con B4 o B4'. En otros casos, la población de células B2 se combina con B3. En otros casos, la población de células B2 se combina tanto con B3 como con B4, o componentes celulares específicos de B3 y/o B4.

La población de células B2 se caracteriza por la expresión de un marcador de células tubulares seleccionado entre el grupo que consiste en uno o más de los siguientes: megalina, cubilina, ácido hialurónico sintasa 2 (HAS2), vitamina D3 25-Hidroxilasa (CYP2D25), N-cadherina (Ncad), E-cadherina (Ecad), Acuaporina-1 (Aqp1), Acuaporina-2 (Aqp2), RAB17, miembro de la familia de oncogenes RAS (Rab17), proteína 3 de unión a GATA (Gata3), regulador 4 de transporte iónico que contiene el dominio FXYD (Fxyd4), familia 9 de vehículo de soluto (intercambiador de sodio/hidrógeno), miembro 4 (Slc9a4), familia de la aldehído deshidrogenasa 3, miembro B1 (Aldh3b1), familia de la aldehído deshidrogenasa 1, miembro A3 (Aldhla3), y Calpaína-8 (Capn8), y el marcador de conductos de recogida Acuaporina-4 (Aqp4). B2 es más grande y más granulado que B3 y/o B4 y, por lo tanto, tiene una densidad de flotación entre aproximadamente 1,045 g/ml y aproximadamente 1,063 g/ml (roedor), entre aproximadamente 1,045 g/ml y 1,052 g/ml (ser humano), y entre aproximadamente 1,045 g/ml y aproximadamente 1,058 g/ml (canino).

La población de células B3 se caracteriza por la expresión de marcadores vasculares, glomerulares y del túbulo proximal con algunas células que producen EPO, siendo de un tamaño y granularidad intermedios en comparación con B2 y B4, y, por lo tanto, tiene una densidad de flotación entre aproximadamente 1,063 g/ml y aproximadamente 1,073 g/ml (roedor), entre aproximadamente 1,052 g/ml y aproximadamente 1,063 g/ml (ser humano), y entre aproximadamente 1,058 g/ml y aproximadamente 1,063 g/ml (canino). B3 se caracteriza por la expresión de marcadores seleccionados entre el grupo que consiste en uno o más de los siguientes: acuaporina 7 (Aqp7), regulador 2 de transporte iónico que contiene dominio FXYD (Fxyd2), familia 17 de vehículo de soluto (fosfato de sodio), miembro 3 (slc17a3), familia 3 de vehículo de soluto, miembro 1 (Slc3a1), claudina 2 (Cldn2), peptidasa aspártica napsina A (Napsa), familia 2 de vehículo de soluto (transportador de glucosa facilitado), miembro 2 (Slc2a2), alanil (membrana) aminopeptidasa (Anpep), proteína transmembrana 27 (Tmem27), miembro 2 de la familia de cadena media de la acil-CoA sintetasa (Acsm2), glutatión peroxidasa 3 (Gpx3), fructosa-1,6- bifosfatasa 1 (Fbp1), y alanina-glioxilato aminotransferasa 2 (Agxt2). B3 también se caracteriza por el marcador de expresión vascular Molécula de adhesión de células endoteliales de plaquetas (Pecam) y el marcador de expresión glomerular podocina (Podn).

La población de células B4 se caracteriza por la expresión de un conjunto de marcadores vasculares que contiene uno o más de los siguientes: PECAM, VEGF, KDR, HIF1a, CD31, CD146; un conjunto de marcadores vasculares que contiene uno o más de los siguientes: Podocina (Podn), y Nefrina (Neph); y una población enriquecida con EPO que se puede modificar con oxígeno en comparación con células sin fraccionar (UNFX), B2 y B3. B4 también se caracteriza por la expresión de uno o más de los siguientes marcadores: receptor 4 de quimioquina (motivo C-X-C) (Cxcr4), receptor de endotelina de tipo B (Ednrb), colágeno, tipo V, alfa 2 (Col5a2), cadherina 5 (Cdh5), activador de plasminógeno, tejido (Plat), angiopoyetina 2 (Angpt2), receptor de proteína de dominio de inserción de quinasa (Kdr), proteína secretada, ácido, rico en cisteína (osteonectina) (Sparc), serglicina (Srgn), inhibidor de metalopeptidasa TIMP

3 (Timp3), tumor de Wilms 1 (Wt1), familia de sitio de integración MMTV de tipo sin alas, miembro 4 (Wnt4), regulador 4 de la señalización de la proteína G (Rgs4), molécula de adhesión de células endoteliales de plaquetas (Pecam), y Eritropoyetina (Epo). B4 también se caracteriza por células más pequeñas, menos granuladas en comparación con cualquiera de B2 o B3, con una densidad de flotación entre aproximadamente 1,073 g/ml y aproximadamente 1,091 g/ml (roedor), entre aproximadamente 1,063 g/ml y aproximadamente 1,091 g/ml (ser humano y canino).

Se define que la población de células B4' tiene una densidad de flotación entre 1,063 g/ml y 1,091 g/ml y expresa uno o más de los siguientes marcadores: PECAM, vEGF, KDR, HIF1a, podocina, nefrina, EPO, CK7, CK8/18/19. En un caso, la población de células B4' se caracteriza por la expresión de un conjunto de marcadores vasculares que contienen uno o más de los siguientes: PECAM, vEGF, KDR, HIF1a, CD31, CD146. En otro caso, la población de células B4' se caracteriza por la expresión de una EPO marcadora endocrina. En un caso, la población de células B4' se caracteriza por la expresión de un conjunto de marcadores vasculares que contiene uno o más de los siguientes: Podocina (Podn), y Nefrina (Neph). En ciertos casos, la población de células B4' se caracteriza por la expresión de un conjunto de marcadores vasculares que contienen uno o más de los siguientes: PECAM, vEGF, KDR, HIFla y por la expresión de una EPO marcadora endocrina. En otro caso, B4' también se caracteriza por células más pequeñas, menos granuladas en comparación con cualquiera de B2 o B3, con una densidad de flotación entre aproximadamente 1,073 g/ml y aproximadamente 1,091 g/ml (roedor), entre aproximadamente 1,063 g/ml y aproximadamente 1,091 g/ml (ser humano y canino).

La presente divulgación describe formulaciones que contienen una población aislada y enriquecida de células renales B4' humanas que comprende al menos una de células que producen eritropoyetina (EPO), las células vasculares, y que células glomerulares que tienen una densidad entre 1,063 g/ml y 1,091 g/ml. En un caso, la población de células B4' se caracteriza por la expresión de un marcador vascular. En ciertos casos, la población de células B4' no se caracteriza por la expresión de un marcador glomerular. En algunos casos, la población de células B4' es capaz de expresión de eritropoyetina que se puede modificar con oxígeno (EPO).

En un caso, la formulación contiene la población de células B4' pero no incluye una población de células B2 que comprende células tubulares que tienen una densidad entre 1,045 g/ml y 1,052 g/ml. En otro caso, la formulación de población de células B4' no incluye una población de células B1 que comprende células granulares grandes del conducto de recogida y el sistema tubular que tienen una densidad < 1,045 g/ml. En otra realización más, la formulación de población de células B4' no incluye una población de células B5 que comprende residuos y células pequeñas de baja granularidad y viabilidad con una densidad > 1,091 g/ml.

En un caso, la formulación que contiene población de células B4' no incluye una población de células B2 que comprende células tubulares que tienen una densidad entre 1,045 g/ml y 1,052 g/ml; a población de células B1 que comprende células granulares grandes del conducto de recogida y el sistema tubular que tienen una densidad < 1,045 g/ml; y una población de células B5 que comprende residuos y células pequeñas de baja granularidad y viabilidad con una densidad > 1,091 g/ml. En algunas realizaciones, la población de células B4' sepa de obtener a partir de un sujeto que tiene una enfermera renal.

La presente divulgación describe formulaciones que contienen combinaciones de células renales humanas que comprende una primera población celular, B2, una población aislada y enriquecida de células tubulares que tienen una densidad entre 1,045 g/ml y 1,052 g/ml, y una segunda población celular, B4', que comprende células que producen eritropoyetina (EPO) y células vasculares pero agotamiento de células glomerulares que tienen una densidad entre aproximadamente 1,063 g/ml y 1,091 g/ml, en las que la combinación no incluye una población de células B1 que comprende células granulares grandes del conducto de recogida y el sistema tubular que tienen una densidad < 1,045 g/ml, o una población de células B5 que comprende residuos y células pequeñas de baja granularidad y viabilidad con una densidad > 1,091 g/ml. En cierto caso, la población de células B4' se caracteriza por la expresión de un marcador vascular. En una realización, la población de células B4' no se caracteriza por la expresión de un marcador glomerular. En ciertos casos, B2 además comprende células epiteliales de los conductos de recogida. En una realización, la formulación contiene una combinación de células que es capaz de absorción de albúmina mediada por receptor. En otro caso, la combinación de células es capaz de expresión de eritropoyetina que se puede modificar con oxígeno (EPO). En un caso, la combinación contiene células que expresan HAS-2 capaces de producir y/o estimular la producción de especies de ácido hialurónico (HA) tanto *in vitro* como *in vivo*. en todas las realizaciones, la primera y segunda poblaciones celulares se pueden obtener a partir de tejido de riñón o células de riñón cultivadas (Basu *et al.* Lipids in Health and Disease, 2011,10: 171).

En un caso, la formulación contiene una combinación que es capaz de proporcionar un estímulo regenerador después de su administración *in vivo*. En otros casos, la combinación es capaz de reducir la disminución de, estabilización, o mejora de filtración glomerular, resorción tubular, producción de orina, y/o función endocrina después de su administración *in vivo*. En un caso, la población de células B4' se obtiene a partir de un sujeto que tiene una enfermedad renal.

La presente divulgación describe formulaciones que contienen una población de células renales humanas B4' aisladas o enriquecidas que comprende al menos uno de células que producen eritropoyetina (EPO), las células vasculares, y células glomerulares que tienen una densidad entre 1,063 g/ml y 1,091 g/ml. En un caso, la población de células B4'

se caracteriza por la expresión de un marcador vascular. En ciertos casos, la población de células B4' no se caracteriza por la expresión de un marcador glomerular. El marcador glomerular que no se expresa puede ser podocina. En algunos casos, la población de células B4' es capaz de expresión de eritropoyetina que se puede modificar con oxígeno (EPO).

En un caso, la formulación que contiene población de células B4' no incluye una población de células B2 que comprende células tubulares que tienen una densidad entre 1,045 g/ml y 1,052 g/ml. En otro caso, la formulación de población de células B4' no incluye una población de células B1 que comprende células granulares grandes del conducto de recogida y el sistema tubular que tienen una densidad < 1,045 g/ml. Además en otro caso, la formulación de población de células B4' no incluye una población de células B5 que comprende residuos y células pequeñas de baja granularidad y viabilidad con una densidad > 1,091 g/ml.

En un caso, la formulación que contiene población de células B4' no incluye una población de células B2 que comprende células tubulares que tienen una densidad entre 1,045 g/ml y 1,052 g/ml; a población de células B1 que comprende células granulares grandes del conducto de recogida y el sistema tubular que tienen una densidad < 1,045 g/ml; y una población de células B5 que comprende residuos y células pequeñas de baja granularidad y viabilidad con una densidad > 1,091 g/ml. En algunos casos, la población de células B4' se puede obtener a partir de un sujeto que tiene una enfermedad renal.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona formulaciones que contienen una combinación de células renales humanas que comprende una primera población celular, B2, una población aislada y enriquecida de células tubulares que tienen una densidad entre 1,045 g/ml y 1,052 g/ml, y una segunda población celular, B4', que comprende células que producen eritropoyetina (EPO) y células vasculares pero agotamiento de células glomerulares que tienen una densidad entre aproximadamente 1,063 g/ml y 1,091 g/ml, en las que la combinación no incluye una población de células B1 que comprende células granulares grandes del conducto de recogida y el sistema tubular que tienen una densidad < 1,045 g/ml, o una población de células B5 que comprende residuos y células pequeñas de baja granularidad y viabilidad con una densidad > 1,091 g/ml. En cierta realización, la población de células B4' se caracteriza por la expresión de un marcador vascular. En un caso, la población de células B4' no se caracteriza por la expresión de un marcador glomerular. En ciertas realizaciones, B2 además comprende células epiteliales de los conductos de recogida. En un caso, la combinación de células es capaz de absorción de albúmina mediada por receptores. En otro caso, la combinación de células es capaz de expresión de eritropoyetina que se puede modificar con oxígeno (EPO). En un caso, la combinación contiene células que expresan HAS-2 capaces de producir y/o estimular la producción de especies de ácido hialurónico (HA) tanto *in vitro* como *in vivo*. En todos los casos, la primera y segunda poblaciones celulares se pueden obtener a partir de tejido de riñón o células de riñón cultivadas.

En otra situación, la presente divulgación proporciona formulaciones que contienen una población heterogénea de células renales que comprende una combinación de fracciones celulares o poblaciones de células enriquecidas (por ejemplo, B1, B2, B3, B4 (o B4'), y B5). En un caso, la combinación tiene una densidad de flotación entre aproximadamente 1,045 g/ml y aproximadamente 1,091 g/ml. En otro caso, la combinación tiene una densidad de flotación entre menos de aproximadamente 1,045 g/ml y aproximadamente 1,099 g/ml o aproximadamente 1,100 g/ml. En otro caso, la combinación tiene una densidad de flotación tal como se determina mediante separación en un gradiente de densidad, por ejemplo, mediante centrifugación. En otra realización más, la combinación de fracciones celulares contiene B2, B3, y B4 (o B4') con agotamiento de B1 y/o B5. En algunos casos, la combinación de fracciones celulares contiene B2, B3, B4 (o B4'), y B5 pero tiene agotamiento de B1. Una vez que B1 y/o B5 se han agotado, la combinación se puede cultivar posteriormente *in vitro* antes de la preparación de una formulación que comprende la combinación de fracciones de células B2, B3, y B4 (o B4').

Los inventores de la presente divulgación han descubierto de forma sorprendente que el cultivo *in vitro* de una combinación de B2, B3, B4, y B5 con agotamiento de B1 da como resultado del agotamiento de B5. En un caso, B5 se agota después de al menos uno, dos, tres, cuatro, o cinco pases. En otro caso, la combinación de la fracción de células B2, B3, B4, y B5 que se pasa en las condiciones que se describen en el presente documento proporciona una proporción celular pasada que tiene B5 a un porcentaje que es inferior a aproximadamente un 5 %, inferior a aproximadamente un 4 %, inferior a aproximadamente un 3 %, inferior a aproximadamente un 2 %, inferior a aproximadamente un 1 %, o inferior a aproximadamente un 0,5 % de la población celular pasada.

En otro caso, B4' es una parte de la combinación de fracciones celulares. En otro caso, el agotamiento de B5 en el cultivo *in vitro* se produce en condiciones hipóxicas.

En un caso, la formulación contiene una combinación que es capaz de proporcionar un estímulo regenerador después de su administración *in vivo*. En otros casos, la combinación es capaz de reducir la disminución de, estabilización, o mejora de filtración glomerular, resorción tubular, producción de orina, y/o función endocrina después de su administración *in vivo*. En un caso, la población de células B4' se obtiene a partir de un sujeto que tiene una enfermedad renal.

En un caso preferente, la formulación contiene una combinación que comprende B2 en combinación con B3 y/o B4. En otro caso preferente, la combinación comprende B2 en combinación con B3 y/o B4'. En otros casos preferentes, la

combinación consiste o consiste básicamente en (i) B2 en combinación con B3 y/o B4; o (ii) B2 en combinación con B3 y/o B4'.

Las combinaciones que contienen una población de células B4' pueden contener poblaciones de células B2 y/o B3 que también se obtienen a partir de un sujeto no sano. El sujeto no sano puede ser el mismo sujeto a partir del cual se obtuvo la fracción de B4'. A diferencia de la población de células B4', las poblaciones de células B2 y B3 obtenidas a partir de sujetos no sanos por lo general no tienen deficiencia de uno o más tipos de células específicas en comparación con una población de células de riñón de partida obtenidas a partir de un individuo sano.

Como se describe en Presnell *et al.,* documento WO/2010/056328, se ha encontrado que las preparaciones de células B2 y B4 son capaces de expresar especies de ácido hialurónico (HA) de peso molecular más elevado tanto *in vitro* como *in vivo*, a través de las acciones de la ácido hialurónico sintasa-2 (HAS-2) – un marcador que está enriquecido más específicamente en la población de células B2. El tratamiento con B2 en un modelo de 5/6 Nx mostró que reducía la fibrosis, de forma simultánea con una expresión fuerte de la expresión de HAS-2 *in vivo* y la producción esperada de HA de alto peso molecular dentro del tejido tratado. De manera notable, el modelo de 5/6 Nx dejado sin tratar dio como resultado fibrosis con una detección limitada de HAS-2 y una escasa producción de HA de alto peso molecular. Sin desear quedar ligado a la teoría, se plantea la hipótesis de que estas especies antiinflamatorias de HA de alto peso molecular producidas predominantemente por B2 (y hasta cierto punto por B4) actúan de forma más enérgica con las preparaciones celulares en la reducción de la fibrosis renal y para ayudar a la regeneración renal. Por lo tanto, la presente divulgación incluye formulaciones que contienen las células renales bioactivas que se describen en el presente documento en combinación con un biomaterial que comprende ácido hialurónico. En la presente divulgación también se contempla la provisión de un componente del estímulo regenerador de biomaterial mediante la producción directa o estimulación de la producción de células implantadas.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona formulaciones que contienen poblaciones heterogéneas, aisladas de células renales que producen EPO para uso en el tratamiento de enfermedad renal, anemia y/o deficiencia de EPO en un sujeto con necesidad. En un caso, las poblaciones celulares se obtienen a partir de una biopsia de riñón. En otro caso, las poblaciones celulares se obtienen a partir de tejido de riñón completo. En otro caso, las poblaciones celulares se obtienen a partir de cultivos *in vitro* de células de riñón de mamífero, establecidos a partir de biopsias de riñón o tejido de riñón completo. En todos los casos, estas poblaciones son poblaciones celulares no fraccionadas, también denominadas en el presente documento poblaciones celulares no enriquecidas.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona formulaciones que contienen poblaciones aisladas de células de riñón que producen eritropoyetina (EPO) que además se enriquecen de modo que la proporción de células que producen EPO en la subpoblación enriquecida sea mayor con respecto a la proporción de células que producen EPO en la población de células de partida o iniciales. En un caso, la fracción de células enriquecidas que producen EPO contiene una proporción más elevada de fibroblastos intersticiales y una proporción más baja de células tubulares con respecto a los fibroblastos intersticiales y las células tubulares contenidas en la población inicial no enriquecida. En ciertos casos, la fracción de células enriquecidas que producen EPO contiene una proporción más elevada de células glomerulares y células vasculares y una proporción más baja de células de conductos de recogida con respecto a las células glomerulares, las células vasculares y células de conductos de recogida contenidas en la población inicial no enriquecida. En tales casos, estas poblaciones se denominan en el presente documento población de células "B4".

La presente divulgación describe formulaciones que contienen una población de células de riñón que producen EPO que se combina con una o más poblaciones de células de riñón adicionales. En un caso, la población celular que produce EPO es una primera población celular enriquecida con células que producen EPO, por ejemplo, B4. En otro caso, la población celular que produce EPO es una primera población celular que no está enriquecida con células que producen EPO, por ejemplo, B2. En otro caso, la primera población celular se combina con una segunda población de células de riñón. En algunos casos, la segunda población celular está enriquecida con células tubulares, lo que se puede demostrar por la presencia de un fenotipo de células tubulares. En otro caso, el fenotipo de células tubulares se puede indicar por la presencia de un marcador de células tubulares. En otro caso, el fenotipo de células tubulares se puede indicar por la presencia de uno o más marcadores de células tubulares. Los marcadores de células tubulares incluyen, pero no se limitan a, megalina, cubilina, ácido hialurónico sintasa 2 (HAS2), vitamina D3 25-Hidroxilasa (CYP2D25), N-cadherina (Ncad), E-cadherina (Ecad), Acuaporina-1 (Aqp1), Acuaporina-2 (Aqp2), RAB17, miembro de la familia de oncogenes RAS (Rab17), proteína 3 de unión a GATA (Gata3), regulador 4 de transporte iónico que contiene el dominio FXYD (Fxyd4), familia 9 de vehículo de soluto (intercambiador de sodio/hidrógeno), miembro 4 (Slc9a4), familia de la aldehído deshidrogenasa 3, miembro B1 (Aldh3b1), familia de la aldehído deshidrogenasa 1, miembro A3 (Aldhla3), y Calpaína-8 (Capn8). En otro caso la primera población celular se combina con al menos uno de varios tipos de células renales que incluyen, pero no se limitan a, las células obtenidas a partir de intersticios, las células tubulares, las células obtenidas a partir de conductos de recogida, las células obtenidas a partir de glomérulos, y/o pero las obtenidas a partir de sangre o vasculatura.

Las formulaciones de la presente divulgación pueden incluir poblaciones de células renales que producen EPO que contienen B4 o B4' en forma de una combinación con B2 y/o B3, o en forma de una población de células enriquecidas, por ejemplo, B2 + B3 + B4/B4'.

En una situación, la formulación contiene poblaciones de células renales que producen EPO que se caracterizan por la expresión de EPO y la capacidad de biorrespuesta al oxígeno, de modo que una reducción de la tensión de oxígeno del sistema de cultivo da como resultado una inducción de la expresión de EPO. En una realización, las poblaciones de células que producen EPO están enriquecidas con células que producen EPO. En un caso, la expresión de EPO se induce cuando la población celular se cultivan condiciones en las que las células se someten a una reducción de los niveles de oxígeno disponibles en el sistema de cultivo en comparación con una población celular cultivada a niveles atmosféricos normales (~21 %) de oxígeno disponible. En un caso, las células que producen EPO cultivadas en condiciones de oxígeno más bajas expresan niveles más elevados de EPO con respecto a las células que producen EPO cultivadas en condiciones de oxígeno anormales. En general, el cultivo de las células a niveles reducidos de oxígeno disponible (también denominadas condiciones de cultivo hipóxicas) se refiere que el nivel de oxígeno reducido se reduce con respecto al cultivo de las células a niveles atmosféricos normales de oxígeno disponible (también denominadas condiciones de cultivo normales o normóxicas). En un caso, las condiciones de cultivo hipóxicas incluyen el cultivo de células a aproximadamente inferior a un 1 % de oxígeno, aproximadamente inferior a un 2 % de oxígeno, aproximadamente inferior a un 3 % de oxígeno, aproximadamente inferior a un 4 % de oxígeno, o aproximadamente inferior a un 5 % de oxígeno. En otro caso, las condiciones de cultivo normales o normóxicas incluyen el cultivo de células a aproximadamente un 10 % de oxígeno, aproximadamente un 12 % de oxígeno, aproximadamente un 13 % de oxígeno, aproximadamente un 14 % de oxígeno, aproximadamente un 15 % de oxígeno, aproximadamente un 16 % de oxígeno, aproximadamente un 17 % de oxígeno, aproximadamente un 18 % de oxígeno, aproximadamente un 19 % de oxígeno, aproximadamente un 20 % de oxígeno, o aproximadamente un 21 % de oxígeno.

En otro caso, la inducción o el aumento de la expresión de EPO se obtiene y se puede observar cultivando células a aproximadamente menos de un 5 % de oxígeno disponible y comparando los niveles de expresión de EPO con respecto a células cultivadas en oxígeno atmosférico (aproximadamente un 21 %). En otro caso, la inducción de EPO se obtienen un cultivo de células capaces de expresar EPO mediante el método que incluye una primera fase de cultivo en la que el cultivo de las células se cultiva en oxígeno atmosférico (aproximadamente un 21 %) durante un cierto periodo de tiempo y una segunda fase de cultivo en la que los niveles de oxígeno se reducen y las mismas células se cultivan a aproximadamente menos de a un 5 % de oxígeno disponible. En otro caso, la expresión de EPO que es sensible a las condiciones hipóxicas está regulada por HIF1α. Las personas con una experiencia habitual en la materia observarán que para las células que se describen en el presente documento se pueden usar otras condiciones de cultivo de manipulación con oxígeno conocidas en la técnica.

En una situación, la formulación contiene poblaciones enriquecidas de células de mamífero que producen EPO caracterizadas por capacidad de biorrespuesta (por ejemplo, expresión de EPO) en condiciones de perfusión. En un caso, las condiciones de perfusión incluyen flujo de fluido transitorio, intermitente, o continua (perfusión). En un caso, la expresión de EPO se induce por vía mecánica cuando el medio en el que las células se cultivan se hace circular o se agita de forma intermitente o continua de un modo tal que las fuerzas dinámicas se transfieren a las células a través del flujo. En un caso, las células sometidas a un flujo de suyo transitorio, intermitente, o continuo se cultivan de un modo tal que están presentes como estructuras tridimensionales en o sobre un material que proporciona un marco y/o espacio para que se formen estructuras tridimensionales de ese tipo. En un caso, las células se cultivan sobre perlas porosas y se someten a un flujo de subir intermitente o continua por medio de una plataforma de agitación, plataforma orbital, o matraz de centrifugación. En otro caso, las células se cultivan en armazones tridimensionales y se colocan en un dispositivo mediante la cual el armazón permanece estacionario y el fluido fluye direccionalmente a través de o atravesando el armazón. Las personas con una experiencia habitual en la materia observarán que para las células que se describen en el presente documento se pueden usar otras condiciones de cultivo de perfusión conocidas en la técnica.

Agregados celulares

En otra situación, las formulaciones de la presente divulgación contienen agregados celulares o esferoides. En un caso, el agregado celular comprende una población de células bioactivas que se describe en el presente documento. En otro caso, el agregado celular comprende células renales bioactivas tal como, por ejemplo, combinaciones de células renales, poblaciones de células renales enriquecidas, y combinaciones de fracciones de células renales.

En ciertos casos, las células renales bioactivas de la divulgación se pueden cultivar en formatos 3D como se describe además en el presente documento. En algunos casos, el término "organoide" se refiere a una acumulación de células, con un fenotipo y/o función, coherente con riñón nativo. En algunos casos, los organoides comprenden poblaciones de células mixtas, de diversos linajes, que por lo general se encuentran *in vivo* en un tejido dado. En algunos casos, los organoides de la presente divulgación se forman *in vitro*, mediante cualquier medio, de modo que las células de la divulgación forman agregados, que a su vez pueden formar esferoides, organoides, o una combinación de los mismos. Los agregados, esferoides u organoides de ese tipo, en algunos casos, suponen una estructura coherente con un órgano en particular. En algunos casos, los agregados, esferoides u organoides de ese tipo, expresan marcadores de superficie, que por lo general son expresados por células del órgano en particular. En algunos casos, los agregados, esferoides u organoides de ese tipo, producen compuestos o materiales, que por lo general son expresados por células del órgano en particular. En ciertos casos, las células la divulgación se pueden cultivar sobre sustratos naturales, por ejemplo, gelatina. En otros casos, las células de la divulgación se pueden cultivar sobre sustratos sintéticos, por

ejemplo, PGLA.

Poblaciones celulares inactivas

As que se describe en el presente documento, ciertas subfracciones de una población heterogénea de células renales, con enriquecimiento de componentes bioactivos y con agotamiento de componentes inactivos o no deseados, proporcionan resultados terapéuticos y regeneradores superiores que la población de partida. En casos preferentes, las formulaciones que se proporcionan en la presente divulgación contienen poblaciones celulares que tienen agotamiento de poblaciones de células B1 y/o B5. Por ejemplo, las siguientes pueden tener agotamiento de B1 y/o B5: combinaciones de dos o más de B2, B3, y B4 (o B4'); una población de células enriquecidas de B2, B3, y B4 (o B4').

La población de células B1 comprende células grandes, granulares del sistema de conductos de recogida y tubulares, con las células de la población teniendo una densidad de flotación inferior a un aproximadamente 1,045 g/m. La población de células B5 está formada por residuos y células pequeñas de una granularidad y viabilidad bajas que tienen una densidad de flotación superior a aproximadamente 1,091 g/ml.

Métodos para aislamiento y cultivo de poblaciones celulares

En una situación, las formulaciones de la presente divulgación contienen poblaciones celulares que se han aislado y/o cultivado a partir de tejido renal. Los métodos que se describen en el presente documento para separar y aislar los componentes celulares renales, por ejemplo, poblaciones de células enriquecidas que se usarán en las formulaciones para uso terapéutico, incluyen el tratamiento de enfermedad renal, anemia, deficiencia de EPO, deficiencia de transporte tubular, y deficiencia de filtración glomerular. En un caso, las poblaciones celulares se aíslan de tejido de riñón recién digerido, es decir, digerido podía mecánica o enzimática o a partir de cultivos heterogéneos *in vitro* de células de riñón de mamífero.

Las formulaciones pueden contener mezclas heterogéneas de células renales que se han cultivado en condiciones de cultivo hipóxicas antes de la separación en un gradiente de densidad que proporciona un aumento de la distribución y composición mejoradas de las células en fracciones tanto B4, incluyendo B4', como B2 y/o B3. El enriquecimiento de células dependientes de oxígeno en B4 de B2 se observó para células renales aisladas de riñones tanto enfermos como no enfermos. Sin querer limitarse a la teoría, esto se puede deber a uno o más de los siguientes fenómenos: 1) supervivencia, muerte o proliferación selectivas de componentes celulares específicos durante el periodo de cultivo hipóxico; 2) alteraciones de la granularidad y/o tamaño celulares como respuesta al cultivo hipóxico, efectuando de ese modo alteraciones en la densidad de flotación y posterior localización durante la separación del gradiente de densidad; y 3) alteraciones en la expresión del gen/proteína celular como respuesta al periodo de cultivo hipóxico, dando como resultado características diferenciales de las células dentro de cualquier fracción dada del gradiente. Por lo tanto, en una realización, las formulaciones contienen poblaciones celulares enriquecidas con células tubulares, por ejemplo, B2, que son resistentes a la hipoxia.

Las técnicas a modo de ejemplo para separación y aislamiento de las poblaciones celulares incluyen separación en un gradiente de densidad basándose en la gravedad específica diferencial de diferentes tipos de células contenidos dentro de la población de interés. La gravedad específica de cualquier tipo de célula dada se puede ver influenciado por el grado de granularidad dentro de las células, el volumen intracelular de agua y otros factores. En una situación, la presente divulgación describe condiciones de gradiente óptimas para el aislamiento de preparaciones celulares, por ejemplo, B2 y B4, incluyendo B4', a través de múltiples especies, que incluyen, pero no se limitan a, ser humano, canino, y roedor. En un caso preferente, un gradiente de densidad se usa para obtener una nueva población enriquecida de fracción de células tubulares, es decir, población de células B2, obtenidas a partir de una población heterogénea de células renales. En un caso, un gradiente de densidad se usa para obtener una nueva población enriquecida de células que producen fracción de EPO, es decir, población de células B4, obtenidas a partir de la población heterogénea de células renales. En otros casos, un gradiente de densidad se usa para obtener subpoblaciones enriquecidas de células tubulares, las células glomerulares, y células endoteliales del riñón. En un caso, tanto las células que producen EPO como las células tubulares se separan de los glóbulos rojos y residuos celulares. En un caso, las células que producen EPO, glomerulares, y vasculares se separan de otros tipos de células y de los glóbulos rojos y residuos celulares, mientras que una subpoblación de células tubulares y células de los conductos de recogida se separan de forma simultánea de otros tipos de células y de glóbulos rojos y residuos celulares. En otro caso, las células endocrinas, glomerulares, y/o vasculares se separan de otros tipos de células y de glóbulos rojos y residuos celulares, mientras que una subpoblación de células tubulares y células de los conductos de recogida se separan de forma simultánea de otros tipos de células y de los glóbulos rojos de residuos celulares.

En una situación, las formulaciones de la presente divulgación contienen poblaciones celulares generadas por el uso, en parte, del medio del gradiente de densidad OPTIPREP® (Axis-Shield), que comprende un 60 % de compuesto iodixanol yodado no iónico en agua, basándose en ciertas características fundamentales que se describen a continuación. Un experto en la materia, sin embargo, reconocerá que se puede usar cualquier gradiente de densidad otro medio, por ejemplo, separación inmunológica usando marcadores de superficie celular conocidos en la técnica, que comprenden las actrices necesarias para el aislamiento de las poblaciones celulares de la presente divulgación.

También alguien con experiencia en la materia debería reconocer que las mismas características celulares que contribuyen a la separación de subpoblaciones celulares a través de gradiente de densidad (tamaño y granularidad) se pueden aprovechar para separar las subpoblaciones celulares a través de citometría de flujo (dispersión directa = una reflexión de tamaño vía citometría de flujo, y dispersión lateral = un reflejo de granularidad). Es importante destacar que el medio de gradiente de densidad debe tener baja toxicidad hacia las células específicas de interés. Aunque el medio gradiente de densidad debería tener una baja toxicidad hacia las células de interés específicas, la presente divulgación contempla el uso de medios de gradiente que desempeña un papel en el proceso de selección de las células de interés. Sin desear limitarse a la teoría, parece que las poblaciones celulares que se describen en el presente documento recuperadas por el gradiente que comprende yodixanol son resistentes al yodixanol, ya que hay una pérdida apreciable de células entre las etapas de carga y recuperación, lo que sugiere que la exposición al yodixanol en las condiciones del gradiente conduce a la eliminación de ciertas células. Las células que aparecen en las bandas específicas después del gradiente de yodixanol son resistentes a cualquier efecto adverso de exposición al yodixanol y/o al gradiente de densidad. Por lo general, también se contempla el uso de medios de contraste adicionales que son nefrotoxinas leves a moderadas en el aislamiento y/o la selección de las poblaciones celulares para las formulaciones que se describen en el presente documento. Además, el medio de gradiente de densidad tampoco debe unirse a las proteínas en el plasma humano o influir de forma negativa en las funciones fundamentales de las células de interés.

En otra situación, la presente divulgación proporciona formulaciones que contienen poblaciones celulares que presentan enriquecimiento y/o agotamiento de tipos de células renales usando clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). En un caso, los tipos de células renales se pueden enriquecer y/o agotar usando BD FACSAria™ o equivalente.

En otra situación, las formulaciones contienen poblaciones celulares que presentan enriquecimiento y/o agotamiento de tipos de células renales usando clasificación celular magnética. En una realización, los tipos de células renales se pueden enriquecer y/o agotar usando el sistema autoMACS® de Miltenyi o equivalente.

En otra situación, las formulaciones pueden incluir poblaciones de células renales que se han sometido a cultivo tridimensional. En una situación, los métodos de cultivo de las poblaciones celulares se realizan mediante perfusión continua. En un caso, las poblaciones celulares cultivadas mediante cultivo tridimensional y perfusión continua demuestran una mayor celularidad e interconectividad cuando se comparan con poblaciones celulares cultivadas de forma estática. En otro caso, las poblaciones celulares cultivadas mediante cultivo tridimensional y perfusión continua demuestran una mayor expresión de EPO, así como un aumento de la expresión de genes asociados a los túbulos renales tales como e-cadherina cuando se comparan con cultivos estáticos de las poblaciones celulares de ese tipo. Además en otro caso, las poblaciones celulares cultivadas mediante perfusión continua de muestra niveles más elevados de consumo de glucosa y glutamina cuando se comparan con poblaciones celulares cultivadas de forma estática.

Como se describe en el presente documento, las condiciones de oxígeno bajo o hipóxicas se pueden usar en los métodos para preparar las poblaciones celulares para las formulaciones que se proporcionan en el presente documento. Sin embargo, los métodos para preparar poblaciones celulares se pueden usar sin la etapa de acondicionamiento con bajo contenido de oxígeno. En un caso, se pueden usar condiciones normóxicas.

Las personas con una experiencia habitual en la materia observarán que para las células que se describen en el presente documento se pueden usar otros métodos de aislamiento y cultivo conocidos en la técnica.

3. Biomateriales

Se puede combinar varios biomateriales con un agente activo para proporcionar las formulaciones terapéuticas de la presente divulgación. Los biomateriales pueden tener cualquier forma adecuada (por ejemplo, perlas) o forma (por ejemplo, líquido, gel, etc.). Como se describe en Bertram *et al.,* solicitud publicada de Estados Unidos N.º 20070276507, las matrices o armazones poliméricos se pueden conformar en cualquier cantidad de configuraciones deseables para satisfacer cualquier cantidad de restricciones generales, geometría o espacio del sistema. En un caso, las matrices o armazones de la presente divulgación pueden ser tridimensionales y conformados para ajustarse a las dimensiones y formas de un órgano o estructura de tejido. Por ejemplo, en el uso del armazón polimérico para el tratamiento de enfermedades renales, anemia, deficiencia de EPO, deficiencia de transporte tubular, o deficiencia de filtración glomerular, se puede usar una matriz tridimensional (3-D). Se puede usar varios armazones tridimensionales de formas diferentes. Naturalmente, la matriz polimérica se puede conformar en diferentes tamaños y formas para adaptarse a pacientes de diferentes tamaños. La matriz polimérica también se puede configurar de otras maneras para adaptarse a las necesidades especiales del paciente. En otro caso, la matriz o armazón polimérico puede ser un armazón polimérico poroso biocompatible. Los armazones pueden estar formados por varios materiales sintéticos o de origen natural que incluyen, pero no se limitan a, ácido poliláctico de celdas abiertas (OPLA®), celulosa éter, celulosa, éster celulósico, polietileno fluorado, fenólico, poli-4-metilpenteno, poliacrilonitrilo, poliamida, poliamidaimida, poliacrilato, polibenzoxazol, policarbonato, policianoariléter, poliéster, poliestercarbonato, poliéter, poliétercetona, poliéterimida, poliétercetona, poliétersulfona, polietileno, polifluoroolefina, poliimida, poliolefina, polioxadiazol, óxido de polifenileno, sulfuro de polifenileno, polipropileno, poliestireno, polisulfuro, polisulfona, politetrafluoroetileno, politioéter,

politriazol, poliuretano, polivinilo, fluoruro de polivinilideno, celulosa regenerada, silicona, ureaformaldehído, colágenos, gelatina, alginato, lamininas, fibronectina, seda, elastina, alginato, ácido hialurónico, agarosa, o copolímeros o mezclas físicas de los mismos. Las configuraciones de armazón pueden variar desde suspensiones líquidas hasta armazones porosos blandos hasta armazones porosos rígidos que mantienen la forma. En un caso, la configuración es la forma líquida de una solución que es capaz de convertirse en un hidrogel.

Los hidrogeles se pueden formar a partir de varios materiales poliméricos y son útiles en varias aplicaciones biomédicas. Los hidrogeles se pueden describir físicamente como redes tridimensionales de polímeros hidrófilos. Dependiendo del tipo de hidrogel, contienen porcentajes variables de agua, pero en conjunto no se disuelven en agua. A pesar de su alto contenido de agua, los hidrogeles son capaces de unir adicionalmente grandes volúmenes de líquido debido a la presencia de restos hidrófilos. Los hidrogeles se hinchan ampliamente sin cambiar su estructura gelatinosa. Las características físicas básicas del hidrogel se pueden modificar de forma específica, de acuerdo con las propiedades de los polímeros usados y los equipos especiales adicionales del producto.

Preferentemente, el hidrogel está hecho de un polímero, un material obtenido a partir de material biológico, un material obtenido de forma sintética o combinaciones de los mismos, que es biológicamente inerte y fisiológicamente compatible con los tejidos de mamíferos. De forma adecuada del material de hidrogel no induce una respuesta inflamatoria. Los ejemplos de otros materiales que se pueden usar para formar un hidrogel incluyen (a) alginatos modificados, (b) polisacáridos (por ejemplo, goma de gelano y carragenanos) que gelifican por exposición a cationes monovalentes, (c) polisacáridos (por ejemplo, ácido hialurónico) que son líquidos muy viscosos o tixotrópicos y forman un gel a lo largo del tiempo por la lenta evolución de la estructura, (d) gelatina o colágeno, y (e) precursores de hidrogel polimérico (por ejemplo, copolímeros de bloques de polietileno óxido-polipropilenglicol y proteínas). El documento de patente de Estados Unidos N.º 6.224.893 B1 proporciona una descripción detallada de los diversos polímeros, y las propiedades químicas de polímeros de ese tipo, que son adecuados para la fabricación de hidrogeles.

Las características del armazón o biomaterial pueden permitir que las células se unan e interactúen con el armazón o el material biomaterial, y/o pueden proporcionar espacios porosos en los que las células pueden quedar atrapadas. En un caso, los armazones porosos o biomateriales permiten la adición o deposición de una o más poblaciones o combinaciones de células de un biomaterial configurado como armazón poroso (por ejemplo, mediante la unión de las células) y/o dentro de los poros del armazón (por ejemplo, por atrapamiento de las células). En otro caso, los armazones o biomateriales permiten o promueven las interacciones célula:célula y/o célula:biomaterial dentro del armazón para formar construcciones como se describe en el presente documento.

En un caso, el biomaterial está formado por ácido hialurónico (HA) en forma de hidrogel, que contiene moléculas de HA que varían en tamaño desde 5,1 kDA hasta > 2 x 10^6 kDa. En otra realización, el biomaterial está formado por ácido hialurónico en forma de espuma porosa, que también contiene moléculas de HA que varían en tamaño desde 5,1 kDA hasta > 2 x 10^6 kDa. En otro caso más, el biomaterial está formado por una espuma a base de ácido poliláctico (PLA), que tiene una estructura de celdas abiertas y un tamaño de poro de aproximadamente 50 micrómetros a aproximadamente 300 micrómetros. En otra realización más, las poblaciones celulares específicas, preferentemente B2 pero también B4, proporcionan directamente y/o estimulan la síntesis del ácido hialurónico de alto peso molecular a través de la ácido hialurónico sintasa-2 (HAS-2), especialmente después de su implantación intrarrenal.

Los biomateriales que se describen en el presente documento también se pueden diseñar o adaptar para responder a ciertas condiciones externas, por ejemplo, *in vitro* o *in vivo*. En un caso, los biomateriales son sensibles a la temperatura (por ejemplo, ya sea *in vitro* o *in vivo*). En otro caso, los biomateriales se adaptan para responder a la exposición a la degradación enzimática (por ejemplo, ya sea *in vitro* o *in vivo*). La respuesta de los biomateriales a las condiciones externas se puede ajustar como se describe en el presente documento. La sensibilidad a la temperatura de la formulación descrita se puede variar ajustando el porcentaje de biomaterial en la formulación. Por ejemplo, el porcentaje de gelatina en una solución se puede ajustar para modular la sensibilidad a la temperatura de la gelatina en la formulación final (por ejemplo, líquido, gel, perlas, etc.). Como alternativa, los biomateriales pueden estar químicamente reticulados para proporcionar una mayor resistencia a la degradación enzimática. Por ejemplo, se puede usar un agente de reticulación de carbodiimida para reticular químicamente perlas de gelatina, proporcionando de ese modo una susceptibilidad reducida a las enzimas endógenas.

En una situación, la respuesta del biomaterial a condiciones externas se refiere a la pérdida de integridad estructural del biomaterial. Aunque la sensibilidad a la temperatura y la resistencia a la degradación enzimática se han proporcionado anteriormente, existen otros mecanismos que pueden provocar la pérdida de integridad del material en diferentes biomateriales. Estos mecanismos pueden incluir, pero no se limitan a, termodinámica (por ejemplo, una transición de fases tal como fusión, difusión (por ejemplo, difusión de un agente de reticulación iónico desde un biomaterial en el tejido circundante)), química, enzimática, pH (por ejemplo, liposomas sensibles al pH), ultrasonido y fotolábil (penetración de luz). El mecanismo exacto por el que el biomaterial pierde integridad estructural variará, pero por lo general el mecanismo se activará en el momento de la implantación o después de la implantación.

Las personas con una experiencia habitual en la materia observarán que otros tipos de materiales sintéticos o de origen natural conocidos en la técnica se pueden usar para formar armazones como se describe en el presente documento.

En una situación, las construcciones como se describe en el presente documento están hechas a partir de los armazones o biomateriales que se han mencionado anteriormente.

4. Construcciones

En una situación, la divulgación describe formulaciones que contienen construcciones implantables que tienen una o más de las poblaciones celulares que se describe en el presente documento para el tratamiento de enfermedades renales, anemia, o deficiencia de EPO en un sujeto con necesidad. En un caso, el constructo está formado a partir de un material biocompatible o biomaterial, armazón o matriz formados por uno o más materiales biocompatibles sintéticos o de origen natural y una o más poblaciones celulares o combinaciones de células que se describen en el presente documento depositadas sobre o embebidas en una superficie de la armazón mediante unión y/o a tratamiento. En ciertos casos, el constructo está formado por un biomaterial y una o más poblaciones celulares o combinaciones de células que se describen en el presente documento revestidas con, depositadas sobre, depositadas en, unidas, atrapadas en, embebidas en, sembradas, o combinadas con el componente o componentes de biomaterial. Cualquiera de las poblaciones celulares que se describen en el presente documento, incluyendo las poblaciones de células enriquecidas o combinaciones de las mismas, se pueden usar en combinación con una matriz para formar un constructo.

En una situación, la formulación contiene construcciones formadas a partir de biomateriales diseñados o adaptados para responder a las condiciones externas como se describe en el presente documento. como resultado, la naturaleza de la asociación de la población celular con el biomaterial en un constructo cambiará dependiendo de las condiciones externas. Por ejemplo, una asociación de la población celular con un biomaterial sensible a la temperatura varía con la temperatura. En un caso, el constructo contiene una población celular y biomaterial que tiene un estado esencialmente sólido a aproximadamente 8 ºC o inferior y un estado esencialmente líquido aproximadamente a temperatura ambiente o superior, en el que la población celular se suspende en el biomaterial a aproximadamente 8 ºC o inferior.

Sin embargo, la población celular está esencialmente libre para moverse a través del volumen del biomaterial aproximadamente a temperatura ambiente o superior. Tener la población celular suspendida en la fase esencialmente sólida a una temperatura más baja proporciona ventajas de estabilidad para las células, tal como para las células dependientes de anclaje, en comparación con células en un fluido. Además, tener las células suspendidas en el estado esencialmente sólido proporciona uno o más de los siguientes beneficios: i) previene la sedimentación de las células, ii) permite que las células permanezcan ancladas al biomaterial en un estado suspendido; iii) permite que las células permanezcan dispersadas de forma más uniforme a través del volumen del biomaterial; iv) previene la formación de agregados celulares; y v) proporciona una protección mejor para las células durante el almacenamiento y el transporte de la formulación. Una formulación que puede mantener carteristas de ese tipo que conducen a la administración a un sujeto desventajosa al menos por qué la salud general de las células en la formulación será mejor y se administraron una dosificación más uniforme y coherente de las células.

En otro caso, la población de células depositadas o componente celular del constructo es una primera población de células de riñón enriquecidas con células que se pueden modificar con oxígeno que producen EPO. En otro caso, la primera población de células de riñón contiene células glomerulares y vasculares además de las células que se pueden modificar con oxígeno que producen EPO. En un caso, la primera población de células de riñón es una población de células B4'. En otro caso, la población de células depositadas o componente o componentes celulares del constructo incluye tanto la primera población de células renales enriquecida como una segunda población de células renales. En algunos casos, la segunda población celular no está enriquecida con células que producen EPO que se pueden modificar con oxígeno. En otro caso, la segunda población celular está enriquecida con células de túbulos renales. En otro caso, la segunda población celular está enriquecida con células de túbulos renales y contiene células epiteliales de los conductos de recogida. En otros casos, las células de túbulos renales se caracterizan por la expresión de uno o más marcadores de células tubulares que pueden incluir, pero no se limitan a, megalina, cubilina, ácido hialurónico sintasa 2 (HAS2), vitamina D3 25-Hidroxilasa (CYP2D25), N-cadherina (Ncad), E-cadherina (Ecad), Acuaporina-1 (Aqp1), Acuaporina-2 (Aqp2), RAB17, miembro de la familia de oncogenes RAS (Rab17), proteína 3 de unión a GATA (Gata3), regulador 4 de transporte iónico que contiene el dominio FXYD (Fxyd4), familia 9 de vehículo de soluto (intercambiador de sodio/hidrógeno), miembro 4 (Slc9a4), aldehído de-hidrógenoase 3 family, miembro B1 (Aldh3b1), familia de la aldehído deshidrogenasa 1, miembro A3 (Aldhla3), y Calpaína-8 (Capn8).

En un caso, las poblaciones celulares depositadas sobre o combinadas con biomateriales o armazones para formar construcciones se obtienen a partir de diversas fuentes, tales como fuentes autólogas. Las fuentes no autólogas cambios son adecuadas para su uso, incluyendo, pero no limitándose a, fuentes alogénicas, o singénicas (autogénicas o isogénicas).

Las personas con una experiencia habitual en la materia observarán que existen varios métodos adecuados para depositar o de otro modo combinar poblaciones celulares con biomateriales para formar un constructo.

En una situación, las construcciones son adecuadas para su uso en los métodos de uso que se describe en el presente

documento. En un caso, las construcciones son adecuadas para su administración a un sujeto con necesidad de tratamiento para una enfermedad renal de una etiología, anemia, o deficiencia de EPO de cualquier etiología. En otros casos, las construcciones son adecuadas para su administración a un sujeto con necesidad de una mejora o restablecimiento de la homeostasis eritroide. En otro caso, las construcciones son adecuadas para su administración a un sujeto con necesidad de mejora de la función renal.

Además en otra situación, la presente divulgación describe un constructo para su implantación en un sujeto con necesidad de una mejora de la función renal que comprende: a) un biomaterial que comprende uno o más polímeros sintéticos biocompatibles o proteínas o péptidos de origen natural; y b) una combinación de células renales de mamífero obtenidas a partir de un sujeto que tiene una enfermedad renal que comprende una primera población celular, B2, una población aislada y enriquecida de células tubulares que tienen una densidad entre 1,045 g/ml y 1,052 g/ml y una segunda población celular, B4', que comprende células que producen eritropoyetina (EPO) y células vasculares pero agotamiento de células glomerulares que tienen una densidad entre 1,063 g/ml y 1,091 g/ml, revestidas con, depositadas sobre o en, atrapadas en, suspendidas en, embebidas en y/o de otro modo combinadas con el biomaterial. En ciertos casos, la combinación no incluye una población de células B1 que comprende células granulares grandes del conducto de recogida y el sistema tubular que tienen una densidad < 1,045 g/ml, o una población de células B5 que comprende residuos y células pequeñas de baja granularidad y viabilidad con una densidad > 1,091 g/ml.

En un caso, el constructo incluye una población de células B4' que se caracteriza por la expresión de un marcador vascular. En algunos casos, la población de células B4' no se caracteriza por la expresión de un marcador glomerular. En ciertos casos, la combinación es capaz de expresión de eritropoyetina que se puede modificar con oxígeno (EPO). En todos los casos, la combinación se puede obtener a partir de tejido de riñón de mamífero o células de riñón cultivadas.

En un caso, el constructo incluye un biomaterial configurado como un biomaterial poroso tridimensional (3-D) adecuado para atrapamiento y/o unión de la combinación. En otro caso, el constructo incluye un biomaterial configurado como un gel líquido o semi líquido adecuado para embeber, unir, suspender, o revestir células de mamífero. Además en otro caso, el constructo incluye un biomaterial configurado que comprende una especie predominantemente de ácido hialurónico (HA) de alto peso molecular en forma de hidrogel. En otro caso, el constructo incluye un biomaterial formado por una especie predominantemente de ácido hialurónico de alto peso molecular en forma de espuma porosa. Además en otro caso, el constructo incluye un biomaterial formado por una espuma de base de ácido poli-láctico que tiene poros entre aproximadamente 50 micrómetros y aproximadamente 300 micrómetros. Además en otro caso, el constructo incluye una o más poblaciones celulares que se pueden obtener a partir de una muestra de riñón que es autóloga para el sujeto con necesidad de una mejora de la función renal. En ciertos casos, la muestra es una biopsia de riñón. En algunos casos, el sujeto tiene una enfermedad renal. Además en otros casos, la población celular se obtiene a partir de una muestra de riñón no autóloga. En un caso, el constructo proporciona homeostasis eritroide.

5. Caracterización fenotípica de células renales

Las células aisladas en cualquier etapa del proceso se ponen caracterizar por su fenotipo. En un caso, las células son una población heterogénea de células renales que se ha enriquecido. Además en un caso, la población heterogénea de células renales enriquecida se ha cultivado en condiciones hipóxicas durante al menos 24 horas. En otro caso, la población heterogénea de células renales enriquecida ha sido sometida a un gradiente de densidad.

La presencia (por ejemplo, expresión) y/o nivel/cantidad de varios biomarcadores en una muestra se puede analizar mediante una serie de metodologías, muchas de las cuales se conocen en la técnica y son entendidas por el experto en la materia, incluyen, pero no se limitan a, inmunohistoquímico ("IHC"), análisis de transferencia de Western, inmunoprecipitación, ensayos de unión molecular, ELISA, ELIFA, clasificación de células activadas por fluorescencia ("FACS"), MassARRAY, proteómica, ensayos de actividad enzimática bioquímica, hibridación *in situ*, análisis de Southern, análisis de Northern, secuenciación del genoma completo, reacción en cadena de la polimerasa ("PCR") incluyendo PCR cuantitativa en tiempo real ("qRT-PCR") y otros métodos de detección de tipo amplificación, como, por ejemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA y similares), ARN-Sec, FISH, análisis de micromatrices, formación de perfiles de expresión génica, y/o análisis en serie de la expresión génica ("SAGE"), así como cualquiera de la amplia variedad de ensayos que se pueden realizar mediante análisis de proteínas, genes, y/o matriz tisular. Los protocolos habituales para evaluar el estado de los genes y los productos genéticos se encuentran, por ejemplo en Ausubel *et al.,* eds., 1995, Current Protocols In Molecular Biology, Unidades 2 (transferencia de Northern), 4 (transferencia de Southern), 15 (Inmunotransferencia) y 18 (análisis de PCR). También se pueden usar inmunoensayos multiplexados tal como los disponibles en Rules Based Medicine o Meso Scale Discovery.

En una situación, se describe un método para detectar la presencia de dos o más biomarcadores en una muestra heterogénea de células renales, comprendiendo el método poner en contacto la muestra con un anticuerpo dirigido a un biomarcador en condiciones permisivas para la unión del anticuerpo a su ligando afín (es decir, biomarcador), y detectar la presencia del anticuerpo unido, por ejemplo, detectando si se forma un complejo entre el anticuerpo y el biomarcador. En algunos casos, la detección de la presencia de uno o más biomarcadores es por inmunohistoquímica

En ciertos casos, cualquiera de los anticuerpos proporcionados en el presente documento es útil para detectar la presencia de un biomarcador en una muestra heterogénea de células renales. El término "detectar" como se usa en el presente documento abarca la detección cuantitativa o cualitativa. En ciertas realizaciones, una muestra biológica comprende una muestra de SRC.

En ciertos casos, las células renales heterogéneas se identifican con uno o más reactivos que permiten la detección de un biomarcador seleccionado entre AQP1, AQP2, AQP4, Calbindina, Calponina, CD117, CD133, CD146, CD24, CD31 (PECAM-1), CD54 (ICAM-1), CD73, CK18, CK19, CK40 a 67, CK7, CK8, CK8/18, CK8/18/19, Conexina 43, Cubilina, CXCR4 (Fusina), DBA, E-cadherina (CD324), EPO (eritropoyetina), GGT1, GLEPP1 (proteína 1epitelial glomerular), Haptoglobulina, Itgb1 (Integrina β1), KIM-1/TIM-1 (molécula 1 de lesión renal /molécula que contiene inmunoglobulina de linfocitos T y mucina), MAP-2 (proteína 2 asociada a microtúbulos), Megalina, N-cadherina, Nefrina, NKCC (cotransportadores de Na-K-Cl), OAT-1 (transportador 1 de aniones orgánicos), Osteopontina, Pancadherina, PCLP1 (molécula 1 de tipo podocalixina), Podocina, SMA (alfa-actina del músculo liso), Sinaptopodina, THP (proteína de tamm-horsfall), Vimentina, y αGST-1 (alfa glutatión S-transferasa). En ciertas realizaciones, un biomarcador se detecta con anticuerpos monoclonales o policlonales.

En un caso, una etiqueta detectable comprende un átomo radiactivo para formar un radioconjugado. Varios isótopos radiactivos están disponibles para la producción de radioconjugados. Los ejemplos incluyen 211At, 131I, 125I, 90Y, 186Re, 188Re, 153Sm, 212Bi, 32P, 212Pb e isótopos radiactivos de Lu. Cuando el radioconjugado se usa para la detección, puede ser un átomo radiactivo para estudios de centellografía, por ejemplo 99Tc-m (isómero nuclear metaestable) o 123I, o una etiqueta de rotación para formación de imágenes por resonancia magnética nuclear (RMN) (también conocida como formación de imágenes por resonancia magnética, mri), tal como yodo-123, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro.

En caso de que en un ensayo se use más de una etiqueta detectable (incluyendo un colorante), es preferente que las etiquetas detectables se seleccionen de manera que cada etiqueta se pueda detectar sin interferencia sustancial con respecto a ninguna otra señal detectable presente en la muestra. Por ejemplo, las etiquetas detectables (incluyendo un colorante) pueden ser moléculas fluorescentes diferentes que muestran diferentes colores en la condición de detección.

La detección se puede llevar a cabo mediante cualquier método adecuado, por ejemplo, los basados en microscopía de inmunofluorescencia, citometría de flujo, citometría de barrido con fibra óptica, o citometría de barrido con láser.

En algunos casos, la expresión de un biomarcador en una célula se determina evaluando el ARNm en una célula. Los métodos para la evaluación de los ARNm en células se conocen bien e incluyen, por ejemplo, ensayos de hibridación usando sondas de ADN complementarias (hibridación tal como *in situ* usando ribosondas etiquetadas específicas para uno o más genes, transferencia de Northern y técnicas relacionadas) y diversos ácidos nucleicos ensayos de amplificación (tal como RT-PCR usando cebadores complementarios específicos para uno o más de los genes, y otros métodos de detección de tipo de amplificación, tales como, por ejemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA y similares). En algunos casos, la expresión de un biomarcador en una muestra de ensayo se compara con una muestra de referencia. Por ejemplo, la muestra de ensayo puede ser una muestra de tejido enfermo y la muestra de referencia puede ser de tejido normal.

Las muestras de mamíferos se pueden analizar convenientemente para detectar los ARNm mediante análisis de Northern, transferencia puntual o PCR. Además, dichos métodos pueden incluir una o más etapas que permiten determinar los niveles de ARNm diana en una muestra biológica (por ejemplo, al examinar de forma simultánea los niveles de una secuencia de ARNm de control comparativo de un gen "constitutivo" como un miembro de la familia de actina). Opcionalmente, se puede determinar la secuencia del ADNc diana amplificado.

Los métodos opcionales incluyen protocolos que examinan o detectan los ARNm, tal como ARNm diana, en un tejido o muestra celular mediante tecnologías de micromatrices. El uso de micromatrices de ácido nucleico, las muestras de ARNm de ensayo y control de las muestras de ensayo y control se transcriben inversamente y se etiquetan para generar sondas de ADNc. Las sondas se hibridan a continuación con una matriz de ácidos nucleicos inmovilizados en un soporte sólido. La matriz está configurada de tal manera que se conoce la secuencia y la posición de cada miembro de la matriz. Por ejemplo, una selección de genes cuya expresión se correlaciona con una población celular capaz de provocar una respuesta regenerativa se puede agrupar en un soporte sólido. La hibridación de una sonda etiquetada con un miembro de matriz particular indica que la muestra de la que se obtiene la sonda expresa ese gen.

De acuerdo con algunos casos, la presencia y/o nivel/cantidad se mide observando los niveles de expresión de proteínas de un gen mencionado anteriormente. En ciertos casos, el método comprende poner en contacto la muestra biológica con anticuerpos frente a un biomarcador que se describe en el presente documento en condiciones permisivas para la unión del biomarcador, y detectar si se forma un complejo entre los anticuerpos y el biomarcador.

En ciertos casos, la presencia y/o nivel/cantidad de proteínas biomarcadoras en una muestra se examinan usando protocolos de IHC y de tinción. Se ha demostrado que la tinción con IHC de células es un método confiable para determinar o detectar la presencia de proteínas en una muestra. En un nivel de situación el biomarcador se determina

mediante un método que comprende: (a) realizar el análisis IHC de una muestra (tal como una muestra de células renales) con un anticuerpo; y b) determinar el nivel de un biomarcador en la muestra. En algunos casos, la intensidad de tinción con IHC se determina con respecto a un valor de referencia.

La IHC se puede llevar a cabo en combinación con técnicas adicionales tales como tinción morfológica y/o hibridación fluorescente *in situ*. Hay dos métodos generales de IHC disponibles; ensayos directos e indirectos. De acuerdo con el primer ensayo, la unión del anticuerpo al antígeno diana se determina directamente. Este ensayo directo usa un reactivo etiquetado, tal como una etiqueta fluorescente o un anticuerpo primario marcado con enzima, que se puede visualizar sin interacción adicional del anticuerpo. En un ensayo indirecto habitual, el anticuerpo primario no conjugado se une al antígeno y a continuación un anticuerpo secundario etiquetado se une al anticuerpo primario. Cuando el anticuerpo secundario se conjuga con un marcador enzimático, se añade un sustrato cromogénico o fluorogénico para proporcionar la visualización del antígeno. La amplificación de la señal se produce porque varios anticuerpos secundarios pueden reaccionar con diferentes epítopos en el anticuerpo primario.

El anticuerpo primario y/o secundario usado para IHC generalmente se etiquetará con un resto detectable. Existen numerosas etiquetas disponibles que se pueden agrupar generalmente en las siguientes categorías: (a) Radioisótopos, como 35S, 14C, 125I, 3H, y 131I; (b) partículas de oro coloidales; (c) etiquetas fluorescentes que incluyen, pero no se limitan a, quelatos de tierras raras (quelatos de europio), rojo Texas, rodamina, fluoresceína, dansilo, lisamina, umbeliferona, ficoeritina, ficocianina, o fluoróforos disponibles en el mercado tal como SPECTRUM ORANGE7 y SPECTRUM GREEN7 y/o derivados de uno cualquiera o más de los mencionados anteriormente; (d) varias etiquetas de enzima-sustrato están disponibles y el documento de Patente de Estados Unidos N.º 4.275.149 proporciona una revisión de algunas de estas. Los ejemplos de etiquetas enzimáticas incluyen luciferasas (por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana; patente de Estados Unidos N.º 4.737.456), luciferina, 2,3-dihidroftalazinadionas, malato deshidrogenasa, ureasa, peroxidasa tal como peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas (por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), oxidasas heterocíclicas (tal como uricasa y xantina oxidasa), lactoperoxidasa, microperoxidasa, y similares.

Los ejemplos de combinaciones de enzima-sustrato que incluyen, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante (HRP) con hidrogenoperoxidasa como sustrato; fosfatasa alcalina (AP) con fosfato de para-Nitrofenilo como sustrato cromogénico; y β-D-galactosidasa (β-D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil-β-D-galactosidasa) o sustrato fluorogénico (por ejemplo, 4-metilumbeliferil-β-D-galactosidasa). Para una revisión general de estos, véanse los documentos de patente de Estados Unidos N.^{os} 4.275.149 y 4.318.980.

En un método a modo de ejemplo, la muestra se puede poner en contacto con un anticuerpo específico para el biomarcador en condiciones suficientes para que se forme un complejo de anticuerpo-biomarcador, y a continuación detectar el complejo. La presencia del biomarcador se puede detectar de varias maneras, tal como mediante transferencia de Western y procedimientos de ELISA para analizar una gran diversidad de tejidos y muestras, incluyendo plasma o suero. Hay disponibilidad de una amplia gama de técnicas de inmunoensayo que usan dicho formato de ensayo, véanse, por ejemplo, los documentos de patente de Estados Unidos N.^{os} 4.016.043, 4.424.279 y 4.018.653. Estos incluyen ensayos de un solo sitio y de dos sitios o "sándwich" de los tipos no competitivos, así como en los ensayos de unión competitiva tradicionales. Estos ensayos también incluyen la unión directa de un anticuerpo etiquetado para un biomarcador diana.

La presencia y/o nivel/cantidad de un biomarcador seleccionado en un tejido o muestra celular también se puede examinar por medio de ensayos funcionales o basados en la actividad. Por ejemplo, si el biomarcador es una enzima, se pueden llevar a cabo ensayos conocidos en la técnica para determinar o detectar la presencia de la actividad enzimática dada en el tejido o muestra celular.

En ciertos casos, las muestras están normalizadas para ambas diferencias en la cantidad del biomarcador sometido a ensayo y variabilidad en la calidad de las muestras usadas, y variabilidad entre realizaciones de ensayos. Una normalización de ese tipo se puede conseguir mediante la detección e incorporación del nivel de ciertos biomarcadores de normalización, incluyendo los genes constitutivos conocidos, tal como ACTB. Como alternativa, la normalización se puede basar en la señal media o mediana de todos los genes analizados o en un gran subconjunto de los mismos (enfoque de normalización global). En una base de gen a gen, la cantidad normalizada medida de un ARNm o proteína tumoral del sujeto se compara con la cantidad encontrada en un conjunto de referencia. Los niveles de expresión normalizados para cada ARNm o proteína por tumor sometido ensayo por sujeto se pueden expresar como un porcentaje del nivel de expresión medido en el conjunto de referencia. La presencia y/o nivel/cantidad de expresión medida en una muestra de sujeto particular que se va a analizar entrará en algún percentil dentro de este intervalo, que se puede determinar mediante métodos bien conocidos en la técnica.

En algunos casos, la citoqueratina se selecciona entre CK8, CK18, CK19 y combinaciones de las mismas. En ciertos casos, la citoqueratina es CK8, CK18, CK19, CK8/CK18, CK8/CK19, CK18/CK19 o CK8/CK18/CK19, en las que la "/" se refiere a una combinación de las citoqueratinas adyacentes a las mismas. En todos los casos, la citoqueratina tiene un nivel de expresión superior a aproximadamente un 80 %, aproximadamente un 85 %, aproximadamente un 90 %, o aproximadamente un 95 %.

En algunos casos, la GGT es GGT-1. En todos los casos la GGT tiene un nivel de expresión superior a aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 15 %, aproximadamente un 18 %, aproximadamente un 20 %, aproximadamente un 25 %, aproximadamente un 30 %, aproximadamente un 35 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 45 %, aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 55 %, o aproximadamente un 60 %.

6. Métodos de uso

Las formulaciones de la presente divulgación se pueden administrar para el tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, las células bioactivas se pueden administrar a un órgano nativo como parte de una formulación que se describe en el presente documento. En un caso, las células bioactivas se deben obtener a partir del órgano nativo Que es el objeto de la administración o de una fuente que no es el órgano nativo diana.

La presente divulgación describe métodos para el tratamiento de una enfermedad renal, anemia, o deficiencia de EPO en un sujeto con necesidad con las formulaciones que contiene poblaciones de células renales y combinaciones de células renales como se describe en el presente documento. En un caso, el método comprende Administrara el sujeto una formulación que contiene una composición que incluye una primera población de células de riñón enriquecida con células que producen EPO. En otro caso, la primera población celular está enriquecida con células que producen EPO, las células glomerulares, y células vasculares. En un caso, la primera población de células de riñón es una población de células B4'. En otro caso, la composición puede incluir además una o más poblaciones de células renales adicionales. En un caso, la población celular adicional es una segunda población celular no enriquecida con células que producen EPO. En otro caso, la población celular adicional es una segunda población celular no enriquecida con células que producen EPO, las células glomerulares, o células vasculares. En otro caso, la composición también incluye una población de células de riñón o combinación de células renales depositadas sobre, embebidas en, revestidas con, suspendidas en, o atrapadas en un biomaterial para formar un constructo implantable, como se describe en el presente documento, para el tratamiento de una enfermedad o trastorno que se describe en el presente documento. En un caso, las poblaciones celulares se usan solas o en combinación con otras células o biomateriales, por ejemplo, hidrogeles, armazones porosos, o péptidos o proteínas nativos o sintéticos, para estimular la regeneración en patologías agudas o crónicas.

El tratamiento eficaz de una enfermedad renal en los métodos que se desvelan en el presente documento se puede observar a través de diversos indicadores de eritropoyesis y/o función renal. En un caso, los indicadores de homeostasis eritroide incluyen, pero no se limitan a, hematocrito (HCT), hemoglobina (HB), hemoglobina corpuscular media (MCH), recuento de glóbulos rojos (RBC), número de reticulocitos, % de reticulocitos, volumen corpuscular medio (MCV), y ancho de distribución de glóbulos rojos (RDW). En otro caso, los indicadores de función renal incluyen, pero no se limitan a, albúmina en suero, proporción de albúmina con respecto a globulina (proporción A/G), fósforo en suero, sodio en suero, tamaño del riñón (medible por ultrasonido), calcio en suero, proporción de calcio:fosforoso, potasio en suero, proteinuria, creatinina urinaria, creatinina en suero, urea nitrogenada en sangre (BUN), niveles de colesterol, niveles de triglicéridos y tasa de filtración glomerular (GFR). Además, varios indicadores de salud general y bienestar incluyen, pero no se limitan a, aumento o pérdida de peso, supervivencia, presión arterial (presión arterial sistémica media, presión arterial diastólica, presión arterial sistólica) y rendimiento de resistencia física.

En otro caso, un tratamiento eficaz con una formulación bioactiva de células renales se pone en evidencia por la estabilización de uno o más indicadores de la función renal. La estabilización de la función renal se demuestra mediante la observación de un cambio en un indicador en un sujeto tratado con un método que se describe en el presente documento en comparación con el mismo indicador en un sujeto que no ha sido tratado con el método que se escribe en el presente documento. Como alternativa, la estabilización de la función renal se puede demostrar mediante la observación de un cambio en un indicador en un sujeto tratado con un método en el presente documento en comparación con el mismo indicador en el mismo sujeto antes del tratamiento. El cambio en el primer indicador puede ser un aumento o una disminución del valor. En un caso, el tratamiento proporcionado por la presente divulgación puede incluir la estabilización de los niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN) en un sujeto en el que los niveles de BUN observados en el sujeto son más bajos en comparación con un sujeto con una patología similar que no ha sido tratado con los métodos de la presente divulgación. En otro caso, el tratamiento puede incluir la estabilización de los niveles de creatinina en suero en un sujeto en el que los niveles de creatinina en suero observados en el sujeto son más bajos en comparación con un sujeto con una patología similar que no ha sido tratado con los métodos de la presente divulgación. En otro caso, el tratamiento puede incluir la estabilización de los niveles de hematocrito (HCT) en un sujeto en el que los niveles de HCT observados en el sujeto son más altos en comparación con un sujeto con una patología similar que no ha sido tratado por los métodos de la presente divulgación. En otro caso, el tratamiento puede incluir la estabilización de los niveles de glóbulos rojos (RBC) en un sujeto en el que los niveles de RBC observados en el sujeto son más altos en comparación con un sujeto con una patología similar que no ha sido tratado con los métodos de la presente divulgación. Las personas con una experiencia habitual en la materia observarán que uno o más indicadores adicionales que se describen en el presente documento o que se conocen en la técnica se pueden medir para determinar el tratamiento eficaz de una enfermedad renal en el sujeto.

La presente divulgación describe formulaciones para su uso en métodos para proporcionar homeostasis eritroide en un sujeto. En un caso, el método incluye la etapa de (a) administrar al sujeto una formulación que contiene una

población de células renales, por ejemplo, B2 o B4', o combinación de células renales, por ejemplo, B2/B4' y/o B2/B3, o una población de células renales enriquecida, como se describe en el presente documento; y (b) determinar, en una muestra biológica del sujeto, que el nivel de un indicador de eritropoyesis es diferente con respecto al nivel de indicador encontrado, en el que la diferencia en el nivel de indicador (i) indica que el sujeto responde a la etapa de administración (a), o (ii) es indicativo de homeostasis eritroide en el sujeto. En otro caso, el método incluye la etapa de (a) administrar al sujeto una formulación que comprende una población de células renales o combinación de células renales como se describe en el presente documento; y (b) determinar, en una muestra biológica del sujeto, el nivel de un indicador de eritropoyesis es diferente con respecto al nivel de indicador en un control, en el que la diferencia en el nivel de indicador (i) indica que el sujeto responde a la etapa de administración (s), o (ii) es indicativo de homeostasis eritroide en el sujeto. En otro caso, el método incluye la etapa de (a) proporcionar un biomaterial o armazón polimérico biocompatible; (b) depositar una población de células renales o combinación de células renales de la presente divulgación sobre o dentro del biomaterial o armazón de una manera que se describe en el presente documento para formar un constructo implantable; (c) preparar una formulación que contiene el constructo; (d) implantar el constructo en el sujeto; y (e) determinar, en una muestra biológica del sujeto, que el nivel de un indicador de eritropoyesis es diferente con respecto al nivel de indicador en un control, en el que la diferencia en el nivel de indicador (i) indica que el sujeto responde a la etapa de administración (a), o (ii) es indicativo de homeostasis eritroide en el sujeto.

La presente divulgación describe formulaciones para su uso en métodos para proporcionar tanta estabilización de la función renal como restauración de la homeostasis eritroide en un sujeto con necesidad, dicho sujeto teniendo tanto un déficit de función renal como una anemia y/o deficiencia de EPO. En un caso, el método incluye la etapa de administrar una formulación que contiene una población de células renales o combinación de células renales como se describe en el presente documento que contiene uno o más de los siguientes tipos celulares: células obtenidas a partir de túbulos, células obtenidas a partir de glomérulos, células obtenidas a partir de intersticios, células obtenidas a partir de conductos de recogida, células obtenidas a partir de tejido del estroma, o células obtenidas a partir de la musculatura. En otro caso, la población o combinación contiene tanto células que producen EPO como células epiteliales tubulares, las células tubulares habiendo sido identificadas mediante al menos uno de los siguientes marcadores: megalina, cubilina, ácido hialurónico sintasa 2 (HAS2), vitamina D3 25-Hidroxilasa (CYP2D25), N-cadherina (Ncad), E-cadherina (Ecad), Acuaporina-1 (Aqp1), Acuaporina-2 (Aqp2), RAB17, miembro de la familia de oncogenes RAS (Rab17), proteína 3 de unión a GATA (Gata3), regulador 4 de transporte iónico que contiene el dominio FXYD (Fxyd4), familia 9 de vehículo de soluto (intercambiador de sodio/hidrógeno), miembro 4 (Slc9a4), familia de la aldehído deshidrogenasa 3, miembro B1 (Aldh3b1), familia de la aldehído deshidrogenasa 1, miembro A3 (Aldhla3), y Calpaína-8 (Capn8). En este caso, el tratamiento del sujeto se podría demostrar mediante una mejora en al menos un indicador de función renal simultáneo con una mejora en al menos un indicador de eritropoyesis, en comparación con cualquiera de un sujeto tratado o para los indicadores de tratamiento previo del sujeto.

La presente divulgación describe formulaciones para su uso en métodos para (i) tratar una enfermedad renal, anemia, o una deficiencia de EPO; (ii) estabilizar la función renal, (iii) restaurar la homeostasis eritroide, o (iv) cualquier combinación de las mismas mediante la administración de una población de células renales enriched for células que producen EPO o combinación de células renales que contiene una población celular enriquecidas con células que producen EPO como se describe en el presente documento, en el que los efectos beneficiosos de la administración son mayores que los efectos de la administración de una población celular no enriquecida con células que producen EPO. En otro caso la población de células enriquecidas proporciona una mejora del nivel de sangre en suero y nitrógeno ureico (BUN). En otro caso, la población de células enriquecidas proporciona una mejora de la retención de proteínas en el suero. En otro caso, la población de células enriquecidas proporciona una mejora de niveles de colesterol y/o triglicéridos en suelo. En otro caso, la población de células enriquecidas proporciona una mejora del nivel de vitamina D. En un caso, la población de células enriquecidas proporciona una mejora de la proporción de fósforo: calcio en comparación con una población de células no enriquecidas. En otro caso, la población de células enriquecidas proporciona una mejora del nivel de hemoglobina en comparación con una población de células no enriquecidas. Además en un caso, la población de células enriquecidas proporciona una mejora del nivel de creatinina en suero en comparación con una población de células no enriquecidas. Además en otro caso, la población de células enriquecidas proporciona una mejora del nivel de hematocrito en comparación con una población de células no enriquecidas. Además en un caso, la población de células enriquecidas proporciona una mejora del nivel número de glóbulos rojos (N.º de RBC) en comparación con una población de células no enriquecidas. En un caso, el aumento del nivel de hematocrito se restaura a un nivel sano normal de un 95 %. Además en un caso, la población de células enriquecidas proporciona un aumento del número de reticulocitos en comparación con una población de células no enriquecidas. En otros casos, la población de células enriquecidas proporciona un aumento del porcentaje de reticulocitos en comparación con una población de células no enriquecidas. Además en otros casos, la población de células enriquecidas proporciona una mejora del nivel de ancho de distribución del volumen de glóbulos rojos (RDW) en comparación con una población de células no enriquecidas. Además en otro caso, la población de células enriquecidas proporciona una mejora del nivel de hemoglobina en comparación con una población de células no enriquecidas. Además en otro caso, la población de células enriquecidas proporciona una respuesta eritroyética en la médula ósea, de modo que la celularidad de la médula es casi normal y la proporción de mieloides:eritroides es casi normal.

La presente divulgación describe formulaciones para su uso en métodos para (i) tratar una enfermedad renal, anemia, o una deficiencia de EPO; (ii) estabilizar la función renal, (iii) restaurar la homeostasis eritroide, o (iv) cualquier

combinación de los mismos mediante la administración de una población de células enriquecidas, en el que los efectos beneficiosos de la administración de una población de células renales o combinación de poblaciones de células renales que se describe en el presente documento se caracterizan por una mejora de la homeostasis eritroide cuando se compara con los efectos beneficiosos proporcionados por la administración de la EPO recombinante (rEPO). En un caso, la población o combinación, cuando se administra a un sujeto con necesidad proporciona una mejora de la homeostasis eritroide (tal como se determina con el hematocrito, hemoglobina, o N.º de RBC) cuando se compara con la administración de proteína EPO recombinante. En un caso, la población o combinación, cuando se administra proporciona una mejora del nivel de hematocrito, RBC, o hemoglobina en comparación con EPO recombinante, que no es superior a un aproximadamente un 10 % inferior o superior al hematocrito en un control. Además en un caso, una sola dosis o administración de la población o combinación, cuando se administra proporciona una mejora de la homeostasis eritroide (tal como se determina mediante un aumento de hematocrito, hemoglobina, o N.º de RBC) en el sujeto tratado durante un periodo de tiempo que supera formas significativas del periodo de tiempo en el que una sola dosis o administración de la proteína EPO recombinante proporcionó una mejora de la homeostasis eritroide. En otro caso, la población o combinación, cuando se administra una dosis que se describe en el presente documento dará como resultado hematocrito, hemoglobina, o N.º de RBC superiora aproximadamente un 110 % de los niveles normales en controles sanos emparejados. Además en un caso, la población o combinación, cuando se administra una dosis que se describe en el presente documento proporciona superior homeostasis eritroide (tal como se determina con hematocrito, hemoglobina, o N.º de RBC) en comparación con la proteína EPO recombinante administrará una dosis que se describe en el presente documento. En otro caso, la EPO recombinante se administra una dosis de aproximadamente 100 IU/kg, aproximadamente 200 IU/kg, aproximadamente 300 IU/kg, aproximadamente 400 IU/kg, o aproximadamente 500 IU/kg. Las personas con una experiencia habitual en la materia observarán que pueden ser adecuadas otras dosificaciones de EPO recombinante conocidas en la técnica.

Otro caso de la presente divulgación se refiere al uso de formulaciones que contienen al menos una población celular, incluyendo poblaciones de células enriquecidas y combinaciones de las mismas, que se describen en el presente documento, o un constructo implantable que se describe en el presente documento, o productos secretados como se describe en el presente documento, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad renal, anemia, o deficiencia de EPO en sujeto con necesidad, para proporcionar homeostasis eritroide en un sujeto con necesidad, la mejora de la función renal en un sujeto con necesidad, o para proporcionar un efecto regenerador a un riñón nativo.

Otro caso de la presente divulgación se refiere formulaciones que contienen poblaciones de células enriquecidas(s) específicas (que se describen en el presente documento) para el tratamiento de una enfermedad renal de etiología específica, basándose en la selección de subpoblación o subpoblaciones celulares específicas basándose en atributos terapéuticos verificados es decir.

La presente divulgación además describe formulaciones para su uso en métodos para tratar una enfermedad renal en un sujeto con necesidad, que comprende: administrar al sujeto una formulación que comprende una combinación de células renales de mamífero que comprende una primera población celular, B2, una población aislada y enriquecida de células tubulares que tienen una densidad entre 1,045 g/ml y 1,052 g/ml, y una segunda población celular, B4', que comprende células que producen eritropoyetina (EPO) y células vasculares pero agotamiento de células glomerulares que tienen una densidad entre 1,063 g/ml y 1,091 g/ml, en las que la combinación no incluye una población de células B1 que comprende células granulares grandes del conducto de recogida y el sistema tubular que tienen una densidad < 1,045 g/ml, o una población de células B5 que comprende residuos y células pequeñas de baja granularidad y viabilidad con una densidad > 1,091 g/ml. En ciertos casos, el método incluye determinar en una muestra de ensayo del sujeto que el nivel de un indicador de función renal indicator diferente con respecto al nivel de indicador en un control, en el que la diferencia del nivel de indicador es indicativa de un arreglo con reducción en disminución, estabilización, o una mejora de una o más funciones renales en el sujeto. En un caso, la población de células B4' usada en el método se caracteriza por la expresión de un marcador vascular. En ciertos casos, la población de células B4' usada en el método no se caracteriza por la expresión de un marcador glomerular. En un caso, la combinación de células usadas en el método es capaz de expresión de eritropoyetina que se puede modificar con oxígeno (EPO). En ciertos casos, la enfermera renal que se va a tratar con los métodos de la divulgación va acompañada por una deficiencia de eritropoyetina (EPO). En ciertos casos, la deficiencia de EPO es anemia. En algunos casos, la deficiencia de EPO o anemia se produce de forma secundaria con respecto a la insuficiencia renal en el sujeto. En algunos otros casos, la deficiencia de EPO o anemia se produce de forma secundaria con respecto a un trastorno seleccionado entre el grupo que consiste en insuficiencia renal crónica, deficiencia de EPO primaria, quimioterapia o terapia antiviral, cáncer no mieloide, infección por VIH, enfermedad hepática, insuficiencia cardiaca, artritis reumatoide, o insuficiencia sistémica multiorgánica. En ciertos casos, la composición usada en el método además comprende un biomaterial que comprende uno o más polímeros sintéticos y/o proteínas o tejidos de origen natural, biocompatibles, en el que la combinación está revestida con, depositada sobre o en, atrapada en, suspendida en, embebida en y/o de otro modo combinada con el biomaterial. En ciertos casos, la combinación usada en las formulaciones de la divulgación se obtiene a partir de tejido de riñón de mamífero o células de riñón de mamífero cultivadas. En otros casos, la combinación se obtiene a partir de una muestra de riñón que es autóloga con respecto al sujeto con necesidad. En una realización, la muestra es una biopsia de riñón. En otros casos, la formulación contiene una combinación obtenida a partir de la muestra de riñón no autóloga.

La divulgación además describe un uso de una formulación que contiene las preparaciones celulares y combinaciones que se describen en el presente documento o un constructo implantable de la presente divulgación para la preparación de un medicamento útil en el tratamiento de una enfermedad renal, anemia o deficiencia de EPO en un sujeto con necesidad del mismo.

La presente divulgación también describe formulaciones para su uso en métodos para la regeneración de un riñón nativo en un sujeto con necesidad de las mismas. En un caso, el método incluye la etapa de administración o implantación de una población, combinación, o constructo celular que se describe en el presente documento al sujeto. Un riñón nativo regenerado se puede caracterizar por un número de indicadores que incluyen, pero no se limitan a, desarrollo de la función o capacidad en el riñón nativo, mejora de la función o la capacidad en el riñón nativo, y la expresión de ciertos marcadores en el riñón nativo. En un caso, la función o capacidad desarrollada o mejorada se puede observar basándose en los diversos indicadores de homeostasis eritroide y función renal que se han descrito anteriormente. En otro caso, el riñón regenerado se caracteriza por expresión diferencial de uno o más marcadores de células madre. El marcador de células madre puede ser uno o más de los siguientes: SRY (región Y determinante del sexo)-caja 2 (Sox2); Factor de Transcripción de Células Embrionarias No Diferenciadas (UTF1); Homólogo Nodal de Ratón (NODAL); Prominina 1 (PROM1) o CD133 (CD133); CD24; y cualquier combinación de los mismos (véase Ilagan *et al.,* documento PCT/US2011/036347). En otro caso, la expresión el marcador marcadores de células madre está regulada de forma positiva en comparación con control.

Las poblaciones celulares que se describe en el presente documento, incluyendo poblaciones de células enriquecidas y combinaciones de las mismas, así como construcciones que contienen las mismas se pueden usar para proporcionar un efecto regenerador a un riñón nativo. El efecto puede ser proporcionado por las propias células y/o por productos secretados a partir de las células. El efecto regenerador se prevé caracterizar por uno o más de los siguientes: una reducción de la transición epitelial-mesenquimal (que puede se puede realizar mediante atenuación de la señalización de TGF-β); una reducción de la fibrosis renal; una reducción de la inflamación renal; expresión diferencial del marcador de células madre en el riñón nativo; migración de células implantadas y/o células nativas a un sitio de lesión renal, por ejemplo, lesión tubular, injerto de células implantadas en un sitio de lesión renal, por ejemplo, lesión tubular; estabilización de uno o más indicadores de función renal (como se describe en el presente documento); restauración de homeostasis eritroide (como se describe en el presente documento); y cualquier combinación de los mismos.

7. Métodos para monitorizar la regeneración

La presente divulgación describe un método de pronóstico para monitorizar la regeneración de un riñón nativo después de la administración o implantación de una formulación que contiene una población, combinación, o constructo celular que se describe en el presente documento al sujeto. En un caso, el método incluye la etapa de detectar el nivel de expresión del marcador en una muestra de ensayo obtenida a partir del sujeto y en una muestra de control, en el que un nivel de expresión más elevado del marcador en la muestra de ensayo, en comparación con la muestra de control, es pronóstico para regeneración del riñón nativo en el sujeto. En otro caso, el método incluye la detección de la expresión de uno o más marcadores de células madre en la muestra. El marcador de células madre se puede seleccionar entre Sox2; UTF1; NODAL; CD133; CD24; y cualquier combinación de los mismos (véase el Ejemplo 11 de Ilagan *et al.,* documento PCT/US2011/036347). La etapa de detección puede incluir la determinación de que la expresión del marcador o marcadores de células madre está regulada de forma positiva o es más elevada en la muestra de ensayo con respecto a una muestra de control, en la que el nivel de expresión más elevado es pronóstico para regeneración del riñón nativo del sujeto. En otro caso, la expresión del ARNm del marcador o marcadores de células madre se detecta. En otros casos, la detección de la expresión del ARNm seca de producir mediante un método basado en PCR, por ejemplo, qRT-PCR. La hibridación *in situ* también se puede usar para la detección de la expresión del ARNm. En otro caso, la expresión polipeptídico del marcador de células madre también se puede detectar usando un agente antimarcador de células madre. En otro caso, el agente es un anticuerpo frente al marcador. En otro caso, la expresión politécnica del marcador de células madre se detecta usando inmunohistoquímica o una transferencia de Western. Las personas con una experiencia habitual en la materia observarán otros métodos para detectar ARNm y/o expresión politécnica de marcadores.

La divulgación describe métodos para pronosticar la evaluación de un paciente después de la implantación o administración de una formulación que contiene una población, combinación, o constructo celular que se describe en el presente documento. En un caso, el método incluye la etapa de detectar el nivel de expresión del marcador en una muestra de ensayo obtenida a partir de dicho sujeto; (b) determinar el nivel de expresión en la muestra de ensayo con respecto al nivel de expresión del marcador con respecto a una muestra de control (o un valor de referencia de control); y (c) predecir el pronóstico regenerativo del paciente basándose en la determinación de niveles de expresión del marcador, en un nivel más elevado de expresión de marcador en la muestra de ensayo, en comparación con la muestra de control (o un valor de referencia de control), es pronóstico para regeneración en el sujeto.

La presente divulgación además describe métodos de pronóstico para monitorizar la regeneración de un riñón nativo después de la administración o implante de una formulación que contiene una población, combinación, o constructo celular que se describe en el presente documento al sujeto, en el que se usó un método no invasivo. Como una alternativa a la biopsia de tejido, un resultado regenerativo en el sujeto que recibe tratamiento se puede evaluar a partir del examen de un fluido corporal, por ejemplo, orina. Se ha descubierto que las microvesículas obtenidas a partir

de fuentes de orina obtenidas a partir del sujeto contienen ciertos componentes que incluyen, pero no se limitan a, proteínas específicas y a los ARNmi que por último se tienen a partir de las poblaciones de células renales impactadas por tratamiento con las poblaciones celulares de la presente divulgación. Estos componentes pueden incluir factores implicados en la replicación y diferenciación de células madre, apoptosis, inflamación e inmunomodulación. Un análisis temporal de patrones de expresión de ARNmi/proteína asociados con microvesículas permite una monitorización continua de los resultados degenerativos dentro del riñón de sujetos que reciben las poblaciones celulares, combinaciones, o construcciones de la presente divulgación.

Estas vesículas obtenidas a partir de riñón y/o los contenidos luminales de vesículas obtenidas a partir de riñón vertidas en la orina de un sujeto se pueden analizar para buscar biomarcadores indicativos de resultado regenerativo.

En un caso, la presente divulgación describe métodos para evaluar si un paciente con enfermedad renal (KD) responde al tratamiento con una formulación terapéutica. El método puede incluir la etapa de determinar o detectar la cantidad de vesículas o su contenido luminal en una muestra de ensayo obtenida de un paciente con KD tratado con la terapéutica, en comparación con o con respecto a la cantidad de vesículas en una muestra de control, en donde una cantidad mayor o menor de vesículas o su contenido luminal en la muestra de ensayo en comparación con la cantidad de vesículas o su contenido luminal en la muestra de control es indicativo de la respuesta del paciente tratado al tratamiento con el terapéutico.

La presente divulgación también describe un método para monitorizar la eficacia del tratamiento con un agente terapéutico en un paciente con KD. En un caso, el método incluye la etapa de determinar o detectar la cantidad de vesículas en una muestra de ensayo obtenida de un paciente con KD tratado con el agente terapéutico, en comparación con o con respecto a la cantidad de vesículas o sus contenidos luminales en una muestra de control, en el que una cantidad mayor o menor de vesículas o sus contenidos luminales en la muestra de ensayo en comparación con la cantidad de vesículas o sus contenidos luminales en la muestra de control es indicativo de la eficacia del tratamiento con el agente terapéutico en el paciente con KD.

La presente divulgación describe un método para identificar una subpoblación de pacientes para que un agente sea eficaz para tratar la enfermedad renal (KD). En un caso, el método incluye la etapa de determinar una correlación entre la eficacia del agente y la presencia de una cantidad de vesículas o su contenido luminal en muestras de la subpoblación del paciente en comparación con la cantidad de vesículas o su contenido luminal en una muestra obtenido de una muestra de control, en el que una cantidad mayor o menor de vesículas en las muestras de la subpoblación del paciente en comparación con la cantidad de vesículas o sus contenidos luminales en la muestra de control es indicativo de que el agente es eficaz para tratar KD en el subpoblación de pacientes.

La etapa de determinación o detección puede incluir el análisis de la cantidad de ARNmi u otros productos secretados que pueden existir en la muestra de ensayo, por ejemplo, orina.

Los métodos de pronóstico no invasivos pueden incluir la etapa de obtener una muestra de orina del sujeto antes y/o después de la administración o implantación de una población, combinación, o constructo celular que se describe en el presente documento. Las vesículas y otros productos secretados se pueden aislar de las muestras de orina usando técnicas específicas, que incluyen, pero no se limitan a, centrifugación para retirar residuos no deseados (Zhou *et al.* 2008. Kidney Int. 74 (5): 613-621; Skog *et al.,* solicitud de patente publicada de Estados Unidos N.º 20110053157).

La presente divulgación se refiere a métodos no invasivos para detectar el resultado regenerativo en un sujeto después del tratamiento. Los métodos implican la detección de vesículas o sus contenidos luminales en orina de un sujeto tratado. El contenido luminal puede ser uno o más ARNmi. La detección de combinaciones o paneles de los ARNmi individuales puede ser adecuada para los métodos de pronóstico de ese tipo. Las combinaciones a modo de ejemplo incluyen dos o más de los siguientes: miR-24; miR-195; miR-871; miR-30b-5p; miR-19b; miR-99a; miR-429; let-7f; miR-200a; miR-324-Sp; miR-10a-5p; y cualquier combinación de los mismos. En un caso, la combinación de los ARNmi pueden incluir 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o más ARNmi individuales. Las personas con una experiencia habitual en la materia observarán que otros ARNmi y combinaciones de ARNmi pueden ser adecuados para su uso en métodos de pronóstico de ese tipo. Las fuentes de ARNmi adicionales incluyen miRBase en http://mirbase.org, que está alojado y mantenido en la Facultad de Ciencias de la Vida en la Universidad de Manchester.

Los expertos en la materia observarán que los métodos de pronóstico para detectar la regeneración pueden ser adecuados para sujetos tratados con agentes terapéuticos conocidos en la técnica, además de las poblaciones celulares y las construcciones son adecuadas que se describen en el presente documento.

En algunos casos, la etapa determinante comprende el uso de un programa de software ejecutado con un procesador adecuado con el fin de (i) medir el nivel diferencial de expresión de marcador (o contenidos de vesículas/vesícula) en una muestra de ensayo y un control; y / o (ii) analizar los datos obtenidos de la medición del nivel diferencial de la expresión del marcador en una muestra de ensayo y un control. El software y los procesadores adecuados se conocen bien la técnica y están disponibles en el mercado. El programa se puede incorporar en un software almacenado en un medio tangible tal como un CD-ROM, un disquete, un disco duro, un DVD o una memoria asociada al procesador, pero las personas con una experiencia habitual en la materia observarán fácilmente que todo el programa o partes del

mismo se podrían ejecutar con un dispositivo que no sea un procesador, y/o incorpora en el firmware y/o hardware dedicado de una manera bien conocida.

Después de la etapa determinante, los resultados de la medición, hallazgos, diagnósticos, predicciones y/o recomendaciones de tratamiento se registran y se comunican a técnicos, médicos y/o pacientes, por ejemplo. En ciertos casos, se usarán ordenadores para comunicar dicha información a las partes interesadas, tales como pacientes y/o los médicos que atienden. En algunos casos, los ensayos se llevarán a cabo o los resultados de los análisis se analizarán en un país o jurisdicción que difiere del país o jurisdicción a la que se comunican los resultados o diagnósticos.

En un caso preferente, un pronóstico, predicción y/o recomendación de tratamiento basándose en el nivel de expresión del marcador medido en un sujeto de ensayo que tiene un nivel diferencial de expresión del marcador se comunica al sujeto tan pronto como sea posible después el ensayo se ha completado y se genera el pronóstico y/o predicción. Los resultados y/o información relacionados se pueden comunicar al sujeto por el médico que trata al sujeto. Como alternativa, los resultados se pueden comunicar directamente a un sujeto de ensayo mediante cualquier medio de comunicación, incluyendo formas escritas, formas electrónicas de comunicación, tales como correo electrónico o teléfono. La comunicación se puede facilitar mediante el uso de un ordenador, como en el caso de las comunicaciones por correo electrónico. En ciertos casos, la comunicación que contiene los resultados de un ensayo de pronóstico y/o conclusiones extraídas a partir de las recomendaciones de tratamiento basadas en el ensayo, se puede generar y entregar automáticamente al sujeto usando una combinación de hardware y software informático que será familiar a las personas expertas en telecomunicaciones. Un ejemplo de un sistema de comunicaciones orientado a la salud se describe en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.283.761; sin embargo, la presente divulgación no se limita a los métodos que utilizan este sistema de comunicaciones en particular. En ciertos casos de los métodos de la divulgación, todas o algunas de las etapas del método, incluyendo el análisis de muestras, el pronóstico y/o la predicción de la regeneración, y la comunicación de los resultados o pronósticos del ensayo, se pueden realizar en diversas jurisdicciones (por ejemplo, extranjero).

En otra situación, los métodos de pronóstico que se describen en el presente documento proporcionan información a una parte interesada con respecto al éxito regenerativo de la implantación o administración.

En todos los casos, los métodos para proporcionar un riñón regenerado a un sujeto que necesite dicho tratamiento como se describe en el presente documento pueden incluir la etapa de implantación posterior de la evaluación de pronóstico de regeneración como se ha descrito anteriormente.

8. Formulaciones de células bioactivas

Las formulaciones que se describen en el presente documento incorporan biomateriales que tienen propiedades que crean un ambiente favorable para que el agente activo, tal como las células renales bioactivas, se administren a un sujeto. En un caso, la formulación contiene un primer biomaterial que proporciona un ambiente favorable desde el momento en que el agente activo se formula con el biomaterial hasta el punto de administración al sujeto. En otro caso, el entorno favorable se refiere a las ventajas de tener células bioactivas suspendidas en un estado sintético sólido con respecto a células en un fluido (como se describe en el presente documento) antes de la administración a un sujeto. En otra realización, el primer biomaterial es un biomaterial sensible a la temperatura. El biomaterial sensible a la temperatura puede tener (i) un estado esencialmente sólido a aproximadamente 8 ºC o inferior, y (ii) un estado esencialmente líquido a temperatura ambiente o superior. En una realización, la temperatura ambiente es aproximadamente la temperatura de la habitación.

En otra situación, la formulación contiene células bioactivas combinadas con un segundo biomaterial que proporciona un entorno un entorno favorable para las células combinadas desde el momento de la formulación hasta un momento después de su administración al sujeto. En un caso, el entorno favorable proporcionado por el segundo biomaterial se refiere a las ventajas de administración de células en un biomaterial que retiene la integridad estructural hasta el momento de su administración a un sujeto y durante un periodo de tiempo después de la administración. En un caso, la integridad estructural del segundo biomaterial después de la implantación es de minutos, horas, días, o semanas. En un caso, la integridad estructural es inferior a un mes, inferior a una semana, inferior a un día, o inferior a una hora. La integridad estructural relativamente a corto plazo proporciona una formulación que puede administrar el agente activo y el biomaterial a una ubicación diana en un tejido u órgano con una manipulación, colocación o dispersión controladas sin que sea un impedimento u obstáculo para la interacción de los elementos incorporados con el tejido urbano en el que se colocó.

En otro caso, el segundo biomaterial es un biomaterial sensible a la temperatura que tiene una sensibilidad diferente a la del primer biomaterial. El segundo biomaterial puede tener (i) un estado esencialmente sólido aproximadamente a temperatura ambiente o inferior, y (ii) un estado esencialmente líquido a aproximadamente 37 ºC o superior. En un caso, la temperatura ambiente es aproximadamente la temperatura de la habitación.

En un caso, el segundo biomaterial son perlas reticuladas. Las perlas reticuladas pueden tener tiempos de permanencia *in vivo* que se pueden modificar finalmente dependiendo del grado de reticulación, como se describe en

el presente documento. En otra realización, las perlas reticuladas comprenden células bioactivas y son resistentes a la degradación enzimática como se describe en el presente documento.

Las formulaciones de la presente divulgación pueden incluir el primer biomaterial combinado con un agente activo, por ejemplo, las células bioactivas, con o sin un segundo biomaterial combinado con un agente activo, por ejemplo, las células bioactivas. Cuando una formulación incluye un segundo biomaterial, éste puede ser una perla sensible a la temperatura y/o una perla reticulada. En los ejemplos que siguen a continuación se proporcionan diversas formulaciones representativas (véanse también las Figuras 3-7).

Las preparaciones celulares bioactivas, combinaciones, y/o construcciones que se describen en el presente documento se pueda administrar como formulaciones de células bioactivas. En una situación, las formulaciones incluyen las células y uno o más biomateriales que proporcionan estabilidad a las preparaciones celulares bioactivas, combinaciones, y/o construcciones que se describen en el presente documento. En un caso, el biomaterial es un biomaterial sensible a la temperatura que puede mantener al menos dos fases o estados diferentes dependiendo de la temperatura. El biomaterial es capaz de mantener un primer estado ha una primera temperatura, un segundo estado a una segunda temperatura, y/o un tercer estado a una tercera temperatura. El primer, segundo o tercer estados puede ser un estado esencialmente sólido, estado esencialmente líquido, o un estado esencialmente semisólido o semilíquido. En un caso, el biomaterial tiene un primer estado a una primera temperatura y un segundo estado a una segunda temperatura, en el que la primera temperatura es inferior a la segunda temperatura.

En otro caso, el estado del biomaterial sensible a la temperatura es un estado esencialmente sólido a una temperatura de aproximadamente 8 ºC o inferior. En otro caso, el estado esencialmente sólido se mantiene a aproximadamente 1 ºC, aproximadamente 2 ºC, aproximadamente 3 ºC, aproximadamente 4 ºC, aproximadamente 5 ºC, aproximadamente 6 ºC, aproximadamente 7 ºC, o aproximadamente 8 ºC. En un caso, el estado esencialmente sólido tiene la forma de un gel. En otro caso, el estado del biomaterial sensible a la temperatura es un estado esencialmente líquido a temperatura ambiente o superior. En un caso, el estado esencialmente líquido se mantiene a aproximadamente 31 ºC, aproximadamente 32 ºC, aproximadamente 33 ºC, aproximadamente 34 ºC, aproximadamente 35 ºC, aproximadamente 36 ºC, o aproximadamente 37 ºC. En un caso, la temperatura ambiente es aproximadamente la temperatura de la habitación.

En otro caso, el estado del biomaterial sensible a la temperatura es un estado esencialmente sólido a una temperatura de aproximadamente temperatura ambiente o inferior. En una realización, la temperatura ambiente es aproximadamente la temperatura de la habitación. En otro caso, el estado esencialmente sólido se mantiene a aproximadamente 17 ºC, aproximadamente 16 ºC, aproximadamente 15 ºC, aproximadamente 14 ºC, aproximadamente 13 ºC, aproximadamente 12 ºC, aproximadamente 11 ºC, aproximadamente 10 ºC, aproximadamente 9 ºC, aproximadamente 8 ºC, aproximadamente 7 ºC, aproximadamente 6 ºC, aproximadamente 5 ºC, aproximadamente 4 ºC, aproximadamente 3 ºC, aproximadamente 2 ºC, o aproximadamente 1 ºC. En un caso, el estado esencialmente sólido tiene la forma de una perla. En otro caso, el estado del biomaterial sensible a la temperatura es un estado esencialmente líquido a una temperatura de aproximadamente 37 ºC o superior. En otra realización, el estado esencialmente sólido se mantiene a aproximadamente 37 ºC, aproximadamente 38 ºC, aproximadamente 39 ºC, o aproximadamente 40 ºC.

Los biomateriales sensibles a la temperatura se pueden proporcionar en forma de una solución, en forma de perlas, o en otras formas adecuadas que se describen en el presente documento y/o son conocidas por las personas con experiencia habitual en la materia. Las poblaciones y preparaciones celulares que se describen en el presente documento se pueden revestir con, depositar sobre, embeber en, unir, sembrar, suspender en, o atrapar en un biomaterial sensible a la temperatura. Como alternativa, el biomaterial sensible a la temperatura se puede proporcionar sin células, tal como, por ejemplo en forma de perlas espaciadoras.

En otros casos, el biomaterial sensible a la temperatura tiene un estado de transición entre un primer estado y un segundo estado. En un caso, el estado de transición es un estado transicional de sólido con respecto a líquido entre una temperatura de aproximadamente 8 ºC y aproximadamente temperatura ambiente. En un caso, la temperatura ambiente es aproximadamente la temperatura de la habitación. En otro caso, el estado de transición de sólido a líquido se produce a una o más temperaturas de aproximadamente 8 ºC, aproximadamente 9 ºC, aproximadamente 10 ºC, aproximadamente 11 ºC, aproximadamente 12 ºC, aproximadamente 13 ºC, aproximadamente 14 ºC, aproximadamente 15 ºC, aproximadamente 16 ºC, aproximadamente 17 ºC, y aproximadamente 18 ºC.

Los biomateriales sensibles a la temperatura tienen una cierta viscosidad a una temperatura dada a medida en centipoises (cP). En un caso, el biomaterial tiene una viscosidad a 25 ºC de aproximadamente 1 cP a aproximadamente 5 cP, aproximadamente 1,1 cP a aproximadamente 4,5 cP, aproximadamente 1,2 cP a aproximadamente 4 cP, aproximadamente 1,3 cP a aproximadamente 3,5 cP, aproximadamente 1,4 cP a aproximadamente 3,5 cP, aproximadamente 1,5 cP a aproximadamente 3 cP, aproximadamente 1,55 cP a aproximadamente 2,5 cP, o aproximadamente 1,6 cP a aproximadamente 2 cP. En otro caso, la solución al 0,75 % (p/v) tiene una viscosidad a 37 ºC de aproximadamente 1,0 cP a aproximadamente 1,15 cP. La viscosidad a 37 ºC puede ser de aproximadamente 1,0 cP, aproximadamente 1,01 cP, aproximadamente 1,02 cP, aproximadamente 1,03 cP, aproximadamente 1,04 cP, aproximadamente 1,05 cP, aproximadamente 1,06 cP, aproximadamente 1,07 cP,

aproximadamente 1,08 cP, aproximadamente 1,09 cP, aproximadamente 1,10 cP, aproximadamente 1,11 cP, aproximadamente 1,12 cP, aproximadamente 1,13 cP, aproximadamente 1,14 cP, o aproximadamente 1,15 cP. En otro caso, el biomaterial es una solución de gelatina. La gelatina está presente a aproximadamente un 0,5 %, aproximadamente un 0,55 %, aproximadamente un 0,6 %, aproximadamente un 0,65 %, aproximadamente un 0,7 %, aproximadamente un 0,75 %, aproximadamente un 0,8 %, aproximadamente un 0.85 %, aproximadamente un 0,9 %, aproximadamente un 0,95 % o aproximadamente un 1 %, (p/v) en la solución. En un ejemplo, el biomaterial es una solución de gelatina al 0,75 % (p/v) en PBS. En una realización, la solución al 0,75 % (p/v) tiene una viscosidad a 25 ºC de aproximadamente 1,6 cP a aproximadamente 2 cP. En un caso, la solución al 0,75 % (p/v) tiene una viscosidad a 37 ºC de aproximadamente 1,07 cP a aproximadamente 1,08 cP. La solución de gelatina se puede proporcionar en PBS, DMEM, u otro disolvente adecuado.

En una situación, la formulación de células bioactivas también incluye un agente de viabilidad celular. En una realización, el agente de viabilidad celular se selecciona entre el grupo que consiste en un antioxidante, un vehículo de oxígeno, un factor inmunomodulador, un factor de reclutamiento, un factor de unión celular, un agente antiinflamatorio, un factor angiogénico, un factor de curación de heridas, y productos secretados a partir de células bioactivas.

Los antioxidantes se caracterizan por la capacidad de inhibir la oxidación de otras moléculas. Los antioxidantes incluyen, pero no se limitan a, uno o más de ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox®), carotenoides, flavonoides, isoflavonas, ubiquinona, glutatión, ácido lipoico, superóxido dismutasa, ácido ascórbico, vitamina E, vitamina A, carotenoides mixtos (por ejemplo, beta caroteno, alfa caroteno, gamma caroteno, luteína, licopeno, fitopeno, fitoflueno y astaxantina), selenio, coenzima Q10, indolo-3-carbinol, proantocianidinas, resveratrol, quercetina, catequinas, ácido salicílico, curcumina, bilirrubina, ácido oxálico, ácido fítico, ácido lipoico, ácido vanílico, polifenoles, ácido ferúlico, teflavinas y derivados de los mismos. Las personas con una experiencia habitual en la materia observarán otros antioxidantes adecuados para su uso en la presente divulgación.

Los vehículos de oxígeno son agentes caracterizados por la capacidad de transportar y liberar oxígeno. Incluyen, pero no se limitan a, perfluorocarbonos y productos farmacéuticos que contiene perfluorocarbonos. Los vehículos de oxígeno a base de perfluorocarbono incluyen, pero no se limitan a, bromuro de perfluorooctilo (C8F17Br); perfluorodicorotano (C8F16C12); bromuro de perfluorodecilo; perfluobron; perfluorodecalina; perfluorotripopilamina; perfluorometilciclopiperidina; Fluosol® (perfluorodecalina y perfluorotripopilamina); Perftoran® (perfluorodecalina y perfluorometilciclopiperidina); Oxygent® (bromuro de perfluorodecilo y perfluobron); Ocycyte™ (perfluoro (terc-butilciclohexano)). Las personas con una experiencia habitual en la materia observarán otros vehículos de oxígeno a base de perfluorocarbonopara su uso en la presente divulgación.

Los factores inmunomoduladores incluyen, pero no se limitan a, osteopontina, factores de ligando FAS, interleuquinas, factor beta de crecimiento transformante, factor de crecimiento obtenido a partir de plaquetas, clusterina, transferrina, regulado después de acción, expresado por linfocitos T normales, proteína secretada (RANTES), inhibidor 1 de activador de plasminógeno (Pai-1), factor alfa de necrosis tumoral (TNF-alfa), interleuquina 6 (IL-6), microglobulina alfa-1, y microglobulina beta-2. Las personas con una experiencia habitual en la materia observarán otros factores inmunomoduladores adecuados para su uso en la presente divulgación.

Los agentes antiinflamatorios o agentes inmunosupresores (que se describen a continuación) también pueden ser parte de la formulación. Las personas con una experiencia habitual en la materia observarán otros antioxidantes adecuados para su uso en las presentes formulaciones y/o tratamientos.

Los factores de reclutamiento celular incluyen, pero no se limitan a, proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1), y CXCL-1. Las personas con una experiencia habitual en la materia observarán otros factores de reclutamiento adecuados para su uso en las presentes formulaciones y/o tratamientos.

Los factores de unión celular incluyen, pero no se limitan a, fibronectina, procolágeno, colágeno, ICAM-1, factor de crecimiento del tejido conectivo, lamininas, proteoglicanos, péptidos de adhesión celular específicos tales como RGD e YSIGR. Las personas con una experiencia habitual en la materia observarán otros factores de unión celular adecuados para su uso en las presentes formulaciones y/o tratamientos.

Los factores angiogénicos incluyen, pero no se limitan a, metaloproteasa 1 de matriz (MMP1), metaloproteasa 2 de matriz (MMP2), factor F de crecimiento endotelial vascular (VEGF), metaloproteasa 9 de matriz (MMP-9), inhibidor de tejido o mataloproteasas -1 (TIMP-1) factor F de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetina-2 (ANG-2). Las personas con una experiencia habitual en la materia observarán otros factores angiogénicos adecuados para su uso en las presentes formulaciones y/o tratamientos.

Los factores de curación de heridas incluyen, pero no se limitan a, factor 1 de crecimiento de queratinocitos (KGF-1), tejido activador de plasminógeno (tPA), calbindina, clusterina, cistatina C, factor 3 de trébol. Las personas con una experiencia habitual en la materia observarán otros factores de curación de heridas adecuados para su uso en las presentes formulaciones y/o tratamientos.

Los productos secretados de células bioactivas que se describen en el presente documento también se pueden añadir a la formulación de células bioactivas como un agente de viabilidad celular.

En otra situación, la formulación incluye un biomaterial sensible a la temperatura que se describe en el presente documento y una población de perlas biocompatibles que contiene un biomaterial. En un caso, las perlas están reticuladas. La reticulación se puede conseguir usando cualquier agente de reticulación adecuado conocido por las personas con una experiencia habitual en la materia, tales como, por ejemplo, carbodiimidas; aldehídos (por ejemplo, furfural, acroleína, formaldehído, glutaraldehído, gliceril aldehído), agentes de reticulación a base de succinimida {suberato de Bis (sulfosucclnimidilo) (BS3), glutarato de Disuccinimidilo (DSG), suberato de Disuccinimidilo (DSS), Ditiobis(propionato de succinimidilo), Etilenglicolbis(succinato de sulfosuccinimidilo), Etilenglicolbis(succinato de succinimidilo) (EGS), glutarato de Bis(sulfosuccinimidilo) (BS2G), tartrato disuccinimidilo (DST)}; epóxidos (etilenglicol diglicidil éter, 1,4 Butanodiol diglicidil éter); sacáridos (azúcares glucosa y aldosa); ácidos sulfónico y ácido p-tolueno sulfónico; carbonildiimidazol; genipina; iminas; cetonas; difenilfosforilazida (DDPA); cloruro de tereftaloílo; hexahidrato de nitrato de cerio(III); transglutaminasa microbiana; y peróxido de hidrógeno. Las personas con una experiencia habitual en la materia observarán otros agentes de reticulación y métodos de reticulación adecuados para su uso en los métodos, formulaciones y/o tratamientos presentes.

En un caso, las perlas son perlas reticuladas con carbodiimida. Las perlas reticuladas con carbodiimida se pueden reticular con una carbodiimida seleccionada entre el grupo que consiste en clorhidrato de 1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC), DCC - N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC), y N,N'-Diisopropilcarbodiimida (DIPC). Se esperaba que las perlas tratadas con una concentración menor de EDC tuvieran un mayor número de aminas primarias libres, mientras que las muestras tratadas con altos niveles de reticulante tendrían la mayoría de las aminas primarias unidas en enlaces amida. La intensidad del color naranja desarrollado por el enlace covalente entre la amina primaria y el ácido picrilsulfónico, detectable mediante espectrofotometría a 335 nm, es proporcional al número de aminas primarias presentes en la muestra. Cuando se normaliza por miligramo de proteína presente en la muestra, se puede observar una correlación inversa entre el número de aminas libres presentes y la concentración inicial de EDC usada para la reticulación. Este resultado es indicativo de la reticulación diferencial de la perla, dictada por la cantidad de carbodiimida usada en la reacción. En general, las perlas reticuladas presentan un número reducido de aminas primarias libres en comparación con las perlas no reticuladas. El número de aminas primarias libres se puede detectar por vía espectrofotométrica a aproximadamente 335 nm.

Las perlas reticuladas tienen una susceptibilidad reducida con respecto a la degradación enzimática en comparación con las perlas biocompatibles no reticuladas, proporcionando de ese modo perlas con tiempos de permanencia *in vivo* finamente ajustables. Por ejemplo, las perlas reticuladas son resistentes a las enzimas endógenas, tal como colágenasas. La provisión de perlas reticuladas es parte de un sistema de administración entrado en el desarrollo y la producción de biomateriales que facilitan uno o más de: (a) administración de células unidas a los sitios deseados y creación de espacio para la regeneración y el crecimiento interno de suministro de tejido nativo y vascular; (b) capacidad de persistir en el sitio el tiempo suficiente para permitir que las células establezcan, funcionen, remodelen su microambiente y secreten su propia matriz extracelular (ECM); (c) estimulación de la integración de las células trasplantadas con el tejido circundante; (d) capacidad de implantar células en una forma esencialmente sólida; (e) integridad estructural a corto plazo que no proporciona una barrera significativa para el crecimiento del tejido o la integración de células/materiales administrados con el tejido hospedador; (f) su administración *in vivo* localizada en una forma esencialmente sólida evitando de ese modo la dispersión de células dentro del tejido durante la implantación; (g) mejor estabilidad y viabilidad de las células dependientes del anclaje en comparación con las células suspendidas en un fluido; y (h) perfil de liberación bifásica cuando las células se administran i) en una forma esencialmente sólida (por ejemplo, unida a perlas), y ii) en una forma esencialmente líquida (por ejemplo, suspendida en un fluido).

En un caso, la presente divulgación proporciona perlas reticuladas que contienen gelatina. Las perlas de gelatina no reticuladas no son adecuadas para una formulación de células bioactivas porque pierden rápidamente integridad y las células se disipan del sitio de inyección. Por el contrario, las perlas de gelatina altamente reticuladas pueden persistir demasiado tiempo en el sitio de inyección y pueden dificultar la secreción de ECM *de novo*, la integración celular y la regeneración de tejido. La presente divulgación permite que el tiempo de permanencia *in vivo* de las perlas reticuladas se ajuste con precisión. Con el fin de adaptar la biodegradabilidad de los biomateriales, se usan diferentes agentes de reticulación de carbodiimida, aunque las condiciones generales de reacción se mantuvieron constantes para todas las muestras. Por ejemplo, la susceptibilidad enzimática de las perlas reticuladas con carbodiimida se puede ajustar finamente variando la concentración del agente de reticulación de aproximadamente cero a aproximadamente 1 M. En algún caso, la concentración es aproximadamente 5 mM, aproximadamente 6 mM, aproximadamente 7 mM, aproximadamente 8 mM, aproximadamente 9 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 11 mM, aproximadamente 12 mM, aproximadamente 13 mM, aproximadamente 14 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 16 mM, aproximadamente 17 mM, aproximadamente 18 mM, aproximadamente 19 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 21 mM, aproximadamente 22 mM, aproximadamente 23 mM, aproximadamente 24 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 26 mM, aproximadamente 27 mM, aproximadamente 28 mM, aproximadamente 29 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 31 mM, aproximadamente 32 mM, aproximadamente 33 mM, aproximadamente 34 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 36 mM, aproximadamente 37 mM, aproximadamente 38 mM, aproximadamente 39 mM,

aproximadamente 40 mM, aproximadamente 41 mM, aproximadamente 42 mM, aproximadamente 43 mM, aproximadamente 44 mM, aproximadamente 45 mM, aproximadamente 46 mM, aproximadamente 47 mM, aproximadamente 48 mM, aproximadamente 49 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 55 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 65 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 85 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 95 mM, o aproximadamente 100 mM. La concentración de agente de reticulación también puede ser aproximadamente 0,15 M, aproximadamente 0,2 M, aproximadamente 0,25 M, aproximadamente 0,3 M, aproximadamente 0,35 M, aproximadamente 0,4 M, aproximadamente 0,45 M, aproximadamente 0,5 M, aproximadamente 0,55 M, aproximadamente 0,6 M, aproximadamente 0,65 M, aproximadamente 0,7 M, aproximadamente 0,75 M, aproximadamente 0,8 M, aproximadamente 0,85 M, aproximadamente 0,9 M, aproximadamente 0,95 M, o aproximadamente 1 M. En otro caso, el agente de reticulación es clorhidrato de 1-Etil-3-[3-dimetilaminopropil] carbodiimida (EDC). En un caso, las perlas reticuladas con EDC son perlas de gelatina.

Las perlas reticuladas pueden tener ciertas características que favorecen la siembra, unión o encapsulación. Por ejemplo, las perlas pueden tener una superficie porosa y/o pueden ser esencialmente huecas. La presencia de poros proporciona una mayor superficie de unión celular que permite que un mayor número de células se unan en comparación con una superficie no porosa o lisa. Además, la estructura de poros puede soportar la integración del tejido del hospedador con las perlas porosas que apoyan la formación del tejido *de novo*. Las perlas tienen una distribución de tamaño que se puede ajustar a un diagrama de Weibull que corresponde al patrón general de distribución de partículas. En una realización, las perlas reticuladas tienen un diámetro medio inferior a aproximadamente 120 µm, aproximadamente 115 µm, aproximadamente 110 µm, aproximadamente 109 µm, aproximadamente 108 µm, aproximadamente 107 µm, aproximadamente 106 µm, aproximadamente 105 µm, aproximadamente 104 µm, aproximadamente 103 µm, aproximadamente 102 µm, aproximadamente 101 µm, aproximadamente 100 µm, aproximadamente 99 µm, aproximadamente 98 µm, aproximadamente 97 µm, aproximadamente 96 µm, aproximadamente 95 µm, aproximadamente 94 µm, aproximadamente 93 µm, aproximadamente 92 µm, aproximadamente 91 µm, o aproximadamente 90 µm. Las características de las perlas reticuladas varían según el proceso de fusión. Por ejemplo, un proceso en el que se usa una corriente de aire para aerosolizar una solución de gelatina líquida y rociarla en nitrógeno líquido con un pulverizador de reactivo de cromatografía en capa fina (ACE Glassware) se usa para proporcionar perlas que tienen las características mencionadas anteriormente. Los expertos en la materia observarán que la modulación de los parámetros del proceso de fusión brinda la oportunidad de adaptar diferentes características de las perlas, por ejemplo, distribuciones de diferentes tamaños.

La citocompatibilidad de las perlas reticuladas se evalúa *in vitro* antes de la formulación usando técnicas de cultivo celular en las que las perlas se cultivan con células que corresponden a la formulación celular bioactiva final. Por ejemplo, las perlas se cultivan con células renales primarias antes de la preparación de una formulación bioactiva de células renales y se usan ensayos de células vivas/muertas para confirmar la citocompatibilidad. En ciertas formulaciones, las perlas reticuladas biocompatibles se combinan con un biomaterial sensible a la temperatura en solución de aproximadamente un 5 % (p/p) a aproximadamente un 15 % (p/p) del volumen de la solución. Las perlas reticuladas pueden estar presentes en aproximadamente un 5 % (p/p), aproximadamente un 5,5 % (p/p), aproximadamente un 6 % (p/p), aproximadamente un 6,5 % (p/p), aproximadamente un 7 % (p/p), aproximadamente un 7,5 % (p/p), aproximadamente un 8 % (p/p), aproximadamente un 8,5 % (p/p), aproximadamente un 9 % (p/p), aproximadamente un 9,5 % (p/p), aproximadamente un 10 % (p/p), aproximadamente un 10,5 % (p/p), aproximadamente un 11 % (p/p), aproximadamente un 11,5 % (p/p), aproximadamente un 12 % (p/p), aproximadamente un 12,5 % (p/p), aproximadamente un 13 % (p/p), aproximadamente un 13,5 % (p/p), aproximadamente un 14 % (p/p), aproximadamente un 14,5 % (p/p), o aproximadamente un 15 % (p/p) del volumen de la solución.

En otra situación, la presente divulgación proporciona formulaciones que contienen biomateriales que se degradan durante un periodo de tiempo del orden de minutos, horas, o días. Esto contrasta con un gran cuerpo o trabajo centrado en la implantación de materiales sólidos que a continuación se degradan lentamente durante días, semanas o meses.

En otra situación, la presente divulgación proporciona formulaciones que tienen perlas reticuladas biocompatibles sembradas con células bioactivas en combinación con una matriz de administración. En un caso, la matriz de administración tiene características de uno o más de los siguientes: biocompatibilidad, biodegradable/bioabsorbible, un estado esencialmente sólido antes y durante la implantación en un sujeto, pérdida de integridad estructural (estado esencialmente sólido) después de la implantación y entorno citocompatible para apoyar la viabilidad celular. La capacidad de la matriz de administración para mantener las partículas implantadas (por ejemplo, perlas reticuladas) espaciadas durante la implantación mejora el crecimiento interno del tejido. Si la matriz de suministro está ausente, la compactación de las perlas celularizadas durante la implantación puede conducir a un espacio inadecuado para el crecimiento de tejido suficiente. La matriz de administración facilita la implantación de formulaciones sólidas. Además, la corta duración de la integridad estructural se refiere a que poco después de la implantación, la matriz no proporciona una barrera significativa para el crecimiento del tejido o la integración de las células/materiales administrados con el tejido hospedador. La matriz de administración proporciona la localización de la formulación que se describe en el presente documento, ya que la inserción de una unidad sólida ayuda a evitar que los materiales administrados se dispersen dentro del tejido durante la implantación. Para formulaciones a base de células, una matriz de administración

sólida mejora la estabilidad y la viabilidad de las células dependientes del anclaje en comparación con las células suspendidas en un fluido.

En un caso, la matriz de administración es una población de perlas biocompatibles que no se siembra con células. En otra realización, las perlas no sembradas se dispersan por todas partes y entre las perlas individuales sembradas de células. Las perlas no sembradas actúan como "perlas espaciadoras" entre las perlas sembradas con células antes e inmediatamente después del trasplante. Las perlas espaciadoras contienen un biomaterial sensible a la temperatura que tiene un estado esencialmente sólido a una primera temperatura y un estado esencialmente líquido a una segunda temperatura, en el que la primera temperatura es inferior a la segunda temperatura. Por ejemplo, las perlas espaciadoras contienen un biomaterial que tiene un estado esencialmente sólido aproximadamente a temperatura ambiente o inferior y un estado esencialmente líquido a aproximadamente 37 ºC, tal como lo que se describe en el presente documento. En un caso, la temperatura ambiente es aproximadamente la temperatura de la habitación. En otro caso, el biomaterial es una solución de gelatina. La solución de gelatina está presente en aproximadamente un 4 %, aproximadamente un 4,5 %, aproximadamente un 5 %, aproximadamente un 5,5 %, aproximadamente un 6 %, aproximadamente un 6,5 %, aproximadamente un 7 %, aproximadamente un 7,5 %, aproximadamente un 8 %, aproximadamente un 8,5 %, aproximadamente un 9 %, aproximadamente un 9,5 %, aproximadamente un 10 %, aproximadamente un 10,5 %, o aproximadamente un 11 %, (p/v). la solución de gelatina se puede proporcionar en PBS, medios de cultivo celular (por ejemplo, DMEM u otro disolvente adecuado.

En una situación, la presente divulgación proporciona formulaciones que contienen biomateriales que se implantan en una forma esencialmente sólida (por ejemplo, perlas espaciadoras) y a continuación se licúan/funden o pierden integridad estructural después de la implantación en el cuerpo. Esto contrasta con el cuerpo de trabajo significativo que se centra en el uso de materiales que se pueden inyectar como un líquido, que a continuación se solidifican en el cuerpo.

La sensibilidad a la temperatura de las perlas espaciadoras se puede evaluar *in vitro* antes de su formulación. Las perlas espaciadoras se pueden etiquetar y mezclar con perlas no sensibles a la temperatura sin etiquetar. A continuación la mezcla se incuba a 37 ºC para observar cambios en la transición física. La pérdida de forma de las perlas sensibles a la temperatura etiquetadas a la temperatura más elevada se observa a lo largo del tiempo. Por ejemplo, las perlas de gelatina sensibles a la temperatura se pueden preparar con colorante azul Alcián para servir como un marcador de la transición física. Las perlas de gelatina de color azul se mezclan con perlas Cultispher S (de color blanco), cargadas en un catéter, a continuación se excluyen y se incuban en 1X PBS, pH 7,4, a 37 ºC. La pérdida de forma de las perlas de gelatina de color azul se sigue al microscopio en diferentes momentos. Los cambios del estado físico de las perlas de gelatina de color azul son visibles después de 30 min haciéndose más pronunciados con tiempos de incubación prolongados. Las perlas no se disipan completamente debido a la viscosidad del material.

Las formulaciones de células bioactivas que se describen en el presente documento se pueden usar para preparar formulaciones basadas en células renales para su inyección en el riñón. Sin embargo, las personas con experiencia habitual en la materia observarán que las formulaciones serán adecuadas para otros muchos tipos de poblaciones de células bioactivas. Por ejemplo, la presente divulgación contempla formulaciones para células bioactivas para su inyección en cualquier órgano sólido o tejido.

En una situación, las formulaciones de células bioactivas que se describen en el presente documento contendrán un número establecido de células. En una realización, el número total de células para la formulación es aproximadamente 10^4, aproximadamente 10^5, aproximadamente 10^6, aproximadamente 10^7, aproximadamente 10^8, o aproximadamente 10^9. En un caso, la dosificación de las células para una formulación que se describe en el presente documento se puede calcular basándose en la masa estimada o masa funcional del órgano o tejido diana. En ciertos casos, las formulaciones de células bioactivas contienen una dosificación que corresponde a un número de células basándose en el peso del órgano hospedador que será el sujeto de tratamiento con la formulación. Por ejemplo, una acumulación de células renales bioactivas se basa en el peso medio de aproximadamente 150 gramos para un riñón humano. En un caso, el número de células por gramo (g) de riñón es de aproximadamente 600 células/g a aproximadamente 7,0 x 10^7 células/g. En algunas realizaciones, el número de células por gramo de riñón es aproximadamente 600 células/g, aproximadamente 1000 células/g, aproximadamente 1500 células/g, aproximadamente 2000 células/g, aproximadamente 2500 células/g, aproximadamente 3000 células/g, aproximadamente 3500 células/g, aproximadamente 4000 células/g, aproximadamente 4500 células/g, aproximadamente 5000 células/g, aproximadamente 5500 células/g, aproximadamente 6000 células/g, aproximadamente 6500 células/g, aproximadamente 7000 células/g, aproximadamente 7500 células/g, aproximadamente 8000 células/g, aproximadamente 8500 células/g, aproximadamente 9000 células/g, aproximadamente 9500 células/g, o aproximadamente 10.000 células/g.

En otros casos, el número de células por gramo de riñón es aproximadamente 1,5 x 10^4 células/g, aproximadamente 2,0 x 10^4 células/g, aproximadamente 2,5 x 10^4 células/g, aproximadamente 3,0 x 10^4 células/g, aproximadamente 3,5 x 10^4 células/g, aproximadamente 4,0 x 10^4 células/g, aproximadamente 4,5 x 10^4 células/g, aproximadamente 5,0 x 10^4 células/g, aproximadamente 5,5 x 10^4 células/g, aproximadamente 6,0 x 10^4 células/g, aproximadamente 6,5 x 10^4 células/g, aproximadamente 7,0 x 10^4 células/g, aproximadamente 7,5 x 10^4 células/g, aproximadamente 8,0 x 10^4 células/g, aproximadamente 9,5 x 10^4 células/g.

En otros casos, el número de células por gramo de riñón es aproximadamente 1,0 x 10^5 células/g, aproximadamente 1,5 x 10^5 células/g, aproximadamente 2,0 x 10^5 células/g, aproximadamente 2,5 x 10^5 células/g, aproximadamente 3,0 x 10^5 células/g, aproximadamente 3,5 x 10^5 células/g, aproximadamente 4,0 x 10^5 células/g, aproximadamente 4,5 x 10^5 células/g, aproximadamente 5,0 x 10^5 células/g, aproximadamente 5,5 x 10^5 células/g, aproximadamente 6,0 x 10^5 células/g, aproximadamente 6,5 x 10^5 células/g, aproximadamente 7,0 x 10^5 células/g, aproximadamente 7,5 x 10^5 células/g, aproximadamente 8,0 x 10^5 células/g, aproximadamente 8,5 x 10^5 células/g, aproximadamente 9,0 x 10^5 células/g, o aproximadamente 9,5 x 10^5 células/g.

En otros casos, el número de células por gramo de riñón es aproximadamente 1,0 x 10^6 células/g, aproximadamente 1,5 x 10^6 células/g, aproximadamente 2,0 x 10^6 células/g, aproximadamente 2,5 x 10^6 células/g, aproximadamente 3,0 x 10^6 células/g, aproximadamente 3,5 x 10^6 células/g, aproximadamente 4,0 x 10^6 células/g, aproximadamente 4,5 x 10^6 células/g, aproximadamente 5,0 x 10^6 células/g, aproximadamente 5,5 x 10^6 células/g, aproximadamente 6,0 x 10^6 células/g, aproximadamente 6,5 x 10^6 células/g, aproximadamente 7,0 x 10^6 células/g, aproximadamente 7,5 x 10^6 células/g, aproximadamente 8,0 x 10^6 células/g, aproximadamente 8,5 x 10^6 células/g, aproximadamente 9,0 x 10^6 células/g, aproximadamente 9,5 x 10^6 células/g, 1,0 x 10^7 células/g, o aproximadamente 1,5 x 10^7 células/g.

Un número total de células se puede seleccionar para la formulación y el volumen de la formulación se puede ajustar para alcanzar la dosificación apropiada.

En algunos casos, la formulación puede contener una dosificación de células a un sujeto que es una dosificación única o una dosificación única más dosificaciones adicionales. En otros casos, las dosificaciones se pueden proporcionar mediante un constructor como se describe en el presente documento. La cantidad terapéuticamente eficaz de las poblaciones de células renales o combinaciones de poblaciones de células renales que se describen en el presente documento puede variar desde el número máximo de células que el sujeto recibe de forma segura hasta el número mínimo de células necesarias para el tratamiento de la enfermera renal, por ejemplo, estabilización, tasa de disminución reducida, o mejora de una o más funciones renales.

La cantidad terapéuticamente eficaz de las poblaciones de células renales o combinaciones de las mismas que se describen en el presente documento se puede suspender en un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. un vehículo de ese tipo incluye, pero no se limita a, un medio de cultivo basal más albúmina en suero al 1 %, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, colágeno, alginato, ácido hialurónico, pegamento de fibrina, polietilenglicol, alcohol polivinílico, carboximetilcelulosa y anticuerpos de los mismos. La formulación se debería adaptar al modo de administración.

Por lo tanto, la divulgación proporciona un uso de una formulación que contiene poblaciones de células renales o combinaciones de las mismas, por ejemplo, la población de células B2 sola o combinada con la población de células B3 y/o o B4 o células B4', para la fabricación de un medicamento para tratar la enfermedad renal en un sujeto. En algunos casos, el medicamento comprende además polipéptidos recombinantes, tales como factores de crecimiento, quimioquinas o citoquinas. En otros casos, los medicamentos son una población celular obtenida a partir de riñón humano. Las células usadas para fabricar los medicamentos se pueden aislar, obtener a partir de o enriquecer usando cualquiera de las variaciones proporcionadas para los métodos que se describen en el presente documento.

La preparación o preparaciones de células renales, o combinaciones de las mismas, o composiciones se formulan de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para la administración a seres humanos. Por lo general, las composiciones para administración intravenosa, administración intraarterial o administración dentro de la cápsula del riñón, por ejemplo, son soluciones en tampón isotónico acuoso estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un anestésico local para aliviar cualquier dolor en el sitio de la inyección. En general, los ingredientes se suministran por separado o se mezclan en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como un concentrado crioconservado en un recipiente herméticamente cerrado, como una ampolla que indica la cantidad de agente activo. Cuando la composición se administra por infusión, se puede dispensar con un frasco de infusión que contiene agua o solución salina estéril de calidad farmacéutico. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes se puedan mezclar antes de su administración.

Los vehículos farmacéuticamente aceptables se determinan en parte por la composición particular que se está administrando, así como por el método particular usado para administrar la composición. Por lo tanto, hay una gran diversidad de formulaciones adecuadas de composiciones farmacéuticas (véase, por ejemplo, Alfonso R Gennaro (ed), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, anteriormente Remington's Pharmaceutical Sciences 20ª ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 2003). Las composiciones farmacéuticas generalmente se formulan como composiciones isotónicas, esencialmente estériles y que cumplen totalmente con todos los reglamentos de la Good Manufacturing Practice (GMP) de la U.S. Food and Drug Administration.

Una situación también proporciona una formulación farmacéutica, que comprende una preparación de células renales, por ejemplo, la preparación de células B2 sola o en combinación con la población de células B3 y/o B4 o B4', y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la formulación comprende de 10^4 a 10^9 células

obtenidas a partir de riñón de mamífero.

Formulaciones de Liberación Modificadas

En una situación, las formulaciones de la presente divulgación se proporcionan como formulaciones de liberación modificadas. En general, la liberación modificada se caracteriza por una liberación inicial de un primer agente activo después de la administración, seguida por al menos una liberación adicional después de una segunda sustancia activa. El primer y segundo agente activo pueden ser iguales o diferentes. En un caso, las formulaciones proporcionan una liberación modificada a través de múltiples componentes en la misma formulación. En otro caso, la formulación de liberación modificada contiene un agente activo como parte de un primer componente que permite que el agente activo se mueva libremente a lo largo del volumen de la formulación, permitiendo así la liberación inmediata en el sitio diana después de la administración. El primer componente puede ser un biomaterial sensible a la temperatura que tiene una fase esencialmente líquida y una fase esencialmente sólida, en el que el primer componente está en una fase esencialmente líquida en el momento de la administración. En un caso, el agente activo se encuentra en la fase esencialmente líquida de manera que es esencialmente libre de moverse a lo largo del volumen de la formulación y, por lo tanto, se libera inmediatamente al sitio dianas después de la administración.

En otro caso, la formulación de liberación modificada tiene un agente activo como parte de un segundo componente en el que el agente activo está unido a, depositado sobre, revestido con, embebido en, sembrado en, o atrapado en el segundo componente, que persiste antes y después de la administración al sitio diana. El segundo componente contiene elementos estructurales con los que el agente activo se puede asociar, evitando de ese modo la liberación inmediata del agente activo desde el segundo componente en el momento de la administración. Por ejemplo, el segundo componente se proporciona en una forma esencialmente sólida, por ejemplo, perlas biocompatibles, que se pueden reticular para prevenir o retrasar la degradación enzimática *in vivo*. En un caso, el agente activo en la fase esencialmente sólida conserva su integridad estructural dentro de la formulación antes y después de la administración y, por lo tanto, no libera inmediatamente el agente activo al sitio diana después de la administración. En el presente documento se han descrito vehículos adecuados para formulaciones de liberación modificada, pero los expertos en la materia observarán otros vehículos que son apropiados para su uso en el presente documento.

En un caso, la formulación proporciona una administración/liberación rápida inicial de elementos administrados, incluyendo células, nanopartículas, moléculas terapéuticas, etc., seguida de una liberación tardía posterior de elementos. Las formulaciones de la presente divulgación se pueden diseñar para un perfil de liberación bifásico en el que el agente que se va a administrar se proporciona en una forma no unida (por ejemplo, células en una solución) y una forma adjunta (por ejemplo, células en combinación con cuentas u otro vehículo adecuado). Después de la administración inicial, el agente no cargado se proporciona inmediatamente al sitio de administración mientras se retrasa la liberación del agente cargado hasta que la integridad estructural del vehículo (por ejemplo, perlas) falla en el punto en que se libera el agente previamente unido. Como se discute a continuación, los expertos en la técnica observarán otros mecanismos adecuados de liberación.

El retraso de tiempo para la liberación se puede ajustar en función de la naturaleza del agente activo. Por ejemplo, el retraso de tiempo para la liberación en una formulación de células bioactivas puede ser del orden de segundos, minutos, horas, o días. En algunas circunstancias, un retraso en el orden de semanas puede ser apropiado. Para otros agentes activos, como moléculas pequeñas o grandes, el retraso de tiempo para la liberación en una formulación puede ser del orden de segundos, minutos, horas, días, semanas o meses. También es posible que la formulación contenga diferentes biomateriales que proporcionan diferentes perfiles de liberación de retraso de tiempo. Por ejemplo, un primer biomaterial con un primer agente activo puede tener un primer tiempo de liberación y un segundo biomaterial con un segundo agente activo puede tener un segundo tiempo de liberación. El primer y segundo agentes activos pueden ser iguales o diferentes.

Como se discute en el presente documento, el periodo de tiempo de liberación retardada puede corresponder generalmente al periodo de tiempo para la pérdida de integridad estructural de un biomaterial. Sin embargo, las personas con una experiencia habitual en la materia observarán otros mecanismos de liberación tardía. Por ejemplo, un agente activo se puede liberar continuamente a lo largo del tiempo independientemente del tiempo de degradación de cualquier biomaterial particular, por ejemplo, la difusión de un fármaco desde una matriz polimérica. Además, las células bioactivas pueden migrar lejos de una formulación que contiene un biomaterial y las células bioactivas a tejido nativo. En un caso, las células bioactivas migran de un biomaterial, por ejemplo, una perla, al tejido nativo.

Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tal como acetato etileno y vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. La absorción prolongada de las formulaciones inyectables se puede conseguir aproximadamente incluyendo en la formulación un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y la gelatina. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o generalmente son conocidos por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978. Se describen métodos adicionales aplicables a la liberación controlada o extendida de agentes polipeptídicos, por ejemplo, en los documentos de Patente de Estados Unidos N.os Pat. Nos. 6.306.406 y 6.346.274, así como, por ejemplo, en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos N.os US2020182254 y US20020051808.

9. Métodos y vías de administración

Las formulaciones de células bioactivas de la presente divulgación se creen administrar solas o en combinación con otros componentes bioactivos. Las formulaciones son adecuadas para la inyección o implantación de elementos modificados por ingeniería de tejidos incorporados en el interior de órganos sólidos para regenerar tejidos. Además, las formulaciones se usan para la inyección o implantación de elementos de ingeniería tisular en la pared de los órganos huecos para regenerar el tejido.

En una situación, la presente divulgación proporciona métodos para proporcionar una formulación de células bioactivas que se describe en el presente documento a un sujeto con necesidad. En un caso, la fuente de la célula bioactiva puede ser autóloga o alogénica, singénica (autogénica o isogénica) y cualquier combinación de las mismas. En casos en los que la fuente no es autóloga, los métodos pueden incluir la administración de un agente inmunosupresor. Los fármacos inmunosupresores adecuados incluyen, pero no se limitan a, azatioprina, ciclofosfamida, mizoribina, ciclosporina, hidrato de tacrolimus, clorambucilo, lobenzarit disódico, auranofina, alprostadilo, clorhidrato de gusperimus, biosynsorb, muromonab, alefacept, pentostatina, daclizumab, sirolimus, micofenolato mofetilo, leflonomida la, basiliximab, dornasa α, bindarid, cladribina, pimecrolimus, ilodecaquina, cedelizumab, efalizumab, everolimus, anisperimus, gavilimomab, faralimomab, clofarabina, rapamicina, siplizumab, saireito, LDP-03, CD4, SR-43551, SK&F-106615, IDEC-114, IDEC-131, FTY-720, TSK-204, LF-080299, A-86281, A-802715, GVH-313, HMR-1279, ZD-7349, IPL-423323, CBP-1011, MT-1345, CNI-1493, CBP-2011, J-695, UP-920, L-732531, ABX-RB2, AP-1903, IDPS, BMS-205820, BMS-224818, CTLA4-1 g, ER-49890, ER-38925, ISAtx-247, RDP-58, PNU-156804, UP-1082, TMC-95A, TV-4710, PTR-262-MG, y AGI-1096 (véase el documento de Patente de Estados Unidos N.º 7.563.822). Las personas con una experiencia habitual en la materia observarán otros fármacos inmunosupresores adecuados.

Los métodos de tratamiento de la divulgación objeto implican la administración de una formulación de células bioactivas que se describe en el presente documento. En un caso, se prefiere la administración directa de células al sitio de beneficio previsto. Un sujeto con necesidad también se puede tratar por contacto *in vivo* de un riñón nativo con una formulación de células bioactivas que se describe en el presente documento en combinación con productos secretados de una o más poblaciones de células renales enriquecidas, y/o una combinación o constructo que contiene las mismas.

La etapa de puesta en contacto de un riñón nativo *in vivo* con se puede conseguir a través del uso/administración de una formulación que contiene una población de productos secretados de medios de cultivo celular, por ejemplo, medios condicionados, o mediante la implantación de una población de células enriquecidas y combinaciones, o un constructo capaz de secretar los productos los productos *in vivo*. La etapa de puesta en contacto *in vivo* proporciona un efecto regenerador al riñón nativo.

En vista de la presente memoria descriptiva, varios medios para administrar células y/o productos secretados a los sujetos será evidente para los expertos en la materia. los métodos de ese tipo incluyen la inyección de las células en un sitio diana en un sujeto.

Las células y/o productos secretados se pueden insertar en un dispositivo de administración o vehículo, lo que facilita la introducción por inyección o implantación en los sujetos. En ciertos casos, el vehículo de administración puede incluir materiales naturales. En ciertos otros casos, el vehículo de administración puede incluir materiales sintéticos. En un caso, el vehículo de administración proporciona una estructura para imitar o ajustarse adecuadamente a la arquitectura del órgano. En otros casos, el vehículo de administración es de naturaleza fluida. Los dispositivos de administración de ese tipo pueden incluir tubos, por ejemplo, catéteres, para inyectar células y fluidos en el cuerpo de un sujeto receptor. En un caso preferente, los tubos además tienen una aguja, por ejemplo, una jeringa, a través de que las células se pueden introducir en el sujeto en la ubicación deseada. En algunos casos, las poblaciones de células obtenidas a partir de riñón de mamíferos se formulan para la administración en un vaso sanguíneo a través de un catéter (en los que el término "catéter" implica cualquiera de los diversos sistemas en forma de tubo para el suministro de sustancias a un vaso sanguíneo). Como alternativa, las células se pueden insertar en un biomaterial o armazón, incluyendo los textiles, tal como tejidos, tejidos de punto, trenzas, mallas y no tejidos, películas perforadas, esponjas y espumas, y perlas, tales como perlas sólidas o porosas, micropartículas, nanopartículas y similares (por ejemplo, perlas de gelatina Cultispher-S - Sigma). Las células se pueden preparar para su administración en varias formas diferentes. Por ejemplo, las células se pueden suspender en una solución o gel. Las células se pueden mezclar con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable para que las células sigan siendo viables. Los vehículos y diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina, soluciones tampón acuosas, disolventes y/o medios de dispersión. El uso de vehículos influyentes de ese tipo se conoce bien en la técnica. La solución es preferentemente estéril y fluida, y a menudo será isotónica. Preferentemente, la solución es estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y se conserva frente a la acción contaminante de los microorganismos tales como bacterias y hongos mediante el uso de, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, thmerosal, y similares. Alguien con experiencia en la materia observará que el vehículo de administración usado en la administración de las poblaciones celulares y combinaciones de las mismas puede incluyen combinaciones de las características mencionadas anteriormente.

Los modos de administración de las formulaciones que contienen población o poblaciones de células renales aisladas, por ejemplo, la población de células B2 sola o combinada con B4' y/o B3, incluyen, pero no se limitan a, inyección sistémica, intrarrenal (por ejemplo, inyección parenquimal), intravenosa o intraarterial e inyección directamente en el tejido en el sitio de actividad previsto. Los modos adicionales de administración que se van a usar incluyen inyección o inyecciones individuales o múltiples mediante laparotomía directa, mediante laparoscopia directa, transabdominal, o percutánea. Todavía hay modos de administración adicionales que se usarán, incluyendo, por ejemplo, infusión retrógrada y ureteropélvica. El significado quirúrgico de la administración incluye procedimientos de una sola etapa, tal como, pero no limitados a, nefrectomía parcial e implantación de construcciones, nefrectomía parcial, pielectomía parcial, vascularización con omentum 6 peritoneo, huellas de aguja de biopsia multifocal, cono o piramidal, al cilindro y reemplazo del tipo polo renal, así como procedimientos de dos etapas que incluyen, por ejemplo, biorreactor organoide-interno para replantación. En un caso, las formulaciones que contienen combinaciones de células se administran mediante la misma ruta al mismo tiempo. En otro caso, cada una de las composiciones celulares que comprenden la combinación controlada se administran por separado a ubicaciones específicas o mediante metodologías específicas, ya sea de forma simultánea o controlada temporalmente, mediante uno o más de los métodos que se describen en el presente documento.

La dosificación de implantación celular adecuada en seres humanos se puede determinar a partir de la información existente relacionada con la actividad de las células, por ejemplo, la producción de EPO, o se puede extrapolar a partir de estudios de dosificación realizados en estudios preclínicos. A partir de cultivo *in vitro* y experimentos en animales *in vivo* la cantidad de células se puede cuantificar y usar calculando una dosificación adecuada de material implantado. Además, el paciente se puede monitorizar para determinar si se puede hacer una implantación adicional o se puede reducir el material implantado en consecuencia.

A las poblaciones celulares y combinaciones de las mismas se les pueden añadir uno o más componentes, incluyendo componentes de la matriz extracelular seleccionados, tal como uno o más tipos de colágeno o ácido hialurónico conocidos en la técnica, y/o factores de crecimiento, plasma rico en plaquetas y fármacos.

Las personas con una experiencia habitual en la materia observarán las diversas formulaciones y métodos de administración adecuados para los productos secretados que se describen en el presente documento.

10. Artículos de Fabricación y Kits

La presente divulgación incluye además kits que comprenden las matrices poliméricas y armazones como se desvela en el presente documento y materiales relacionados, y/o medios de cultivo celular e instrucciones de uso. Las instrucciones de uso pueden contener, por ejemplo, instrucciones para el cultivo de las células o la administración de las células y/o productos celulares. En un caso, la presente divulgación proporciona un kit que comprende un armazón como se describe en el presente documento e instrucciones. Además en otro caso, el kit incluye un agente para la detección de la expresión del marcador, reactivos para el uso del agente e instrucciones de uso. Este kit se puede usar con el propósito de determinar el pronóstico regenerativo de un riñón nativo en un sujeto después de la implantación o administración de una población celular, una combinación, o una construcción que se describe en el presente documento. El kit también se puede usar para determinar la eficacia bioterapéutica de una población, combinación, o constructo celular que se describe en el presente documento.

Además en el presente documento se describe un artículo de fabricación que contiene células bioactivas útiles para el tratamiento de sujetos con necesidad. El artículo de fabricación comprende un envase y una etiqueta o prospecto en o asociado con el envase. Los envases adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas, etc. Los envases pueden estar formados por varios materiales tales como vidrio o plástico. El envase contiene una composición que es eficaz para tratar una afección y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el envase puede ser una bolsa de solución o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección). Al menos un agente activo en la formulación es una población de células bioactivas tal como se proporciona en el presente documento. La etiqueta o el prospecto indica que la formulación se usa para tratar la afección en particular. La etiqueta o el prospecto incluirá más instrucciones para administrar la formulación al paciente. También se contemplan artículos de fabricación y kits que comprenden terapias combinatorias que se describen en el presente documento. El prospecto del paquete se refiere a las instrucciones habitualmente incluidas en los paquetes comerciales de productos terapéuticos que contienen información sobre las indicaciones, uso, dosificación, administración, contraindicaciones y/o advertencias sobre el uso de dichos productos terapéuticos. En una realización, el prospecto indica que la formulación se usa para tratar una enfermedad o trastorno, tal como, por ejemplo, una enfermedad o trastorno renal. Además puede incluir otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas. También se proporcionan kits que son útiles para diversos fines, por ejemplo, para la evaluación del resultado regenerativo. Se pueden proporcionar kits que contengan agentes de detección para vesículas derivadas de orina y/o sus contenidos, por ejemplo, ácidos nucleicos (tal como ARNmi), vesículas, exosomas, etc., como se describe en el presente documento. Los agentes de detección incluyen, pero no se limitan a, cebadores y sondas de ácido nucleico, así como anticuerpos para la detección *in vitro* de la diana deseada. Según el artículo de fabricación, el kit comprende un envase y una etiqueta o prospecto en el envase o asociado al mismo. El recipiente contiene una composición que comprende al menos un agente de detección. Se pueden incluir recipientes

adicionales que contienen, por ejemplo, diluyentes y tampones o agentes de detección de control. La etiqueta o el prospecto pueden proporcionar una descripción de la composición así como instrucciones para el uso *in vitro*, pronóstico o diagnóstico previsto.

11. Informes

Los métodos de la presente divulgación, cuando se ponen en práctica con fines comerciales generalmente producen un informe o resumen del pronóstico regenerativo. Los métodos de la presente divulgación producirán un informe que comprende una predicción del curso probable o el resultado de la regeneración antes y después de cualquier administración o implantación de una formulación que contiene una población celular, una combinación, o un constructo que se describe en el presente documento. El informe puede incluir información sobre cualquier indicador pertinente al pronóstico. Los métodos e informes de la presente divulgación pueden incluir además almacenar el informe en una base de datos. Como alternativa, el método puede crear aún más un registro en una base de datos para el sujeto y completar los datos de registro. En un caso, el informe es un informe en papel, en otro caso, el informe es un informe auditivo, en otra realización, el informe es un registro electrónico. Se contempla que el informe se proporcione a un médico y/o al paciente. La recepción del informe puede incluir además establecer una conexión de red a una computadora servidor que incluya los datos e informes y solicitar los datos e informes de la computadora servidor. Los métodos previstos en el presente documento también se pueden automatizar en su totalidad o en parte.

La invención ilustrativa que se describe en el presente documento se puede poner en práctica de forma adecuada en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no se desvelan de forma específica en el presente documento. Por lo tanto, por ejemplo, en cada caso en el presente documento cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" se pueden sustituir por cualquiera de los otros dos términos. Por lo tanto, para una realización de la invención usando uno de los términos, la invención también incluye otra realización en la que uno de estos términos se incluye por otro de estos términos. En cada realización, los términos tienen su significado establecido. Por lo tanto, por ejemplo, una realización puede abarcar una formulación "que comprende" una serie de componentes, otra realización abarcaría una formulación "que consiste esencialmente en" los mismos componentes, y una tercera realización podría abarcar una formulación "que consiste en" los mismos componentes. Los términos y expresiones que se han usado se usan como términos de descripción y no de limitación, y no existe la intención de que el uso de dichos términos y expresiones excluyan cualquier equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, pero es reconoció que son posibles varias modificaciones dentro del alcance de la invención reclamada. Por lo tanto, se debe entender que aunque la presente invención se ha desvelado de forma específica mediante realizaciones y características opcionales preferentes, los expertos en la materia pueden recurrir a la modificación y variación de los conceptos que se describen en el presente documento, y que tales modificaciones y variaciones se consideran dentro del alcance de la presente invención tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Se considera que la descripción escrita mencionada anteriormente es suficiente como para permitir que un experto en la materia ponga en práctica la invención. Los siguientes ejemplos se ofrecen solo con fines ilustrativos, y no pretenden limitar el alcance de la presente invención en modo alguno. De hecho, varias modificaciones de la invención además de las mostradas y que se describen en el presente documento serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción anterior y entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplos

Ejemplo 1

Preparación de Soluciones

Este ejemplo proporcionó las composiciones de los diversos medios de formulaciones y soluciones usados en los siguientes Ejemplos para el aislamiento y la caracterización de la población heterogénea de células renales, y la fabricación del producto de terapia regenerativa.

Tabla 1.1 Medios de Cultivo y Soluciones

Material	**Composición**
Medio de transporte tisular	Viaspan™ o HypoThermosol-FRS® o DMEM Kanamicina: 100 mg/ml

(continuación)

Material	Composición
Medio de crecimiento de células renales	• DMEM:KSFM (50:50) • FBS al 5 % • Suplementos de Crecimiento: • HGF: 10 mg/l • EGF: 2,5 µg/l • Insulina: 10,0 mg/l, • Transferrina: 5,5 mg/l • Selenio: 670 µg/l • Kanamicina: 100 µg/ml
Solución de lavado tisular	• DMEM • Kanamicina: 100 µg/ml
Solución de digestión	• Colagenasa IV: 300 Unidades • Dispasa: 5 mg/ml • Cloruro cálcico: 5 mM
Solución de disociación celular	• TrypLE
Solución de gradiente de densidad	• OptiPrep al 7 % • OptiMEM
Solución de crioconservación	• DMEM o HypoThermosol® FRS • DMSO al 10 % • FBS al 10 %

La solución salina tamponada con fosfato modificada por Dulbecco (DPBS) se usó para todos los lavados celulares.

Ejemplo 2

Aislamiento de la población heterogénea de células renales no fraccionadas

Este ejemplo ilustra el aislamiento de una población heterogénea de células renales (UNFX) no fraccionada de seres humanos. La disociación inicial del tejido se llevó a cabo para generar suspensiones celulares heterogéneas a partir de tejido renal humano.

El tejido renal mediante biopsia renal proporcionó el material fuente para una población heterogénea de células renales. Se puede usar tejido renal que comprende uno o más de tejido cortical, unión corticomedular o medular. Se prefiere el uso de tejido de unión corticomedular. Se requirieron múltiples núcleos de biopsia (mínimo 2), evitando tejido cicatricial de un riñón con ERC. El tejido renal fue obtenido por el investigador clínico del paciente en el sitio clínico aproximadamente 4 semanas antes de la implantación planificada de la NKA final. El tejido fue transportado en el Medio de Transporte de Tejido del Ejemplo 1.

El tejido se lavó a continuación con la solución de lavado tisular del Ejemplo 1 para reducir la carga biológica entrante antes de procesar el tejido para extracciones celulares.

El tejido renal se troceó, se pesó y se disoció en la solución de digestión del Ejemplo 1. La suspensión celular resultante se neutralizó en medio Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) + suero bovino fetal al 10 % (FBS) (Invitrogen, Carlsbad CA), se lavó y se volvió suspender en medio de queratinocitos sin suero, sin suplemento (KSFM) (Invitrogen). Las suspensiones celulares se sometieron a un gradiente de yodixanol (OptiPrep ™, Sigma) al 15 % (p/v) para retirar los glóbulos rojos y los desechos antes de iniciar el cultivo en matraces o placas de poliestireno tratados con cultivo de tejidos a una densidad de 25.000 células por cm^2 en Medio de crecimiento de células renales del Ejemplo 1. Por ejemplo, las células se pueden colocar en placas en un matraz T500 Nunc a $25x10^6$ células/matraz en 150 ml de medios a 50:50.

Ejemplo 3

Expansión celular de la población de células renales aisladas

La expansión de las células renales depende de la cantidad de tejido recibido y del éxito del aislamiento de las células renales del tejido entrante. Las células aisladas se pueden crioconservar, si fuera necesario (ver a continuación). La cinética del crecimiento de las células renales puede variar de una muestra a otra debido a la variabilidad inherente de las células aisladas de pacientes individuales.

Se desarrolló un proceso de expansión celular definido que acomoda el intervalo de recuperaciones celulares

resultantes de la variabilidad del tejido entrante **Tabla 3.1**. La expansión de células renales implica pases en serie en recipientes de cultivo cerrados (por ejemplo, matraces en T, fábricas celulares, HyperStacks®) y medio de crecimiento de células renales **Tabla 1.1** usando procedimientos de cultivo celular definidos.

Un medio libre de BPE se desarrolló para ensayos clínicos en seres humanos para eliminar los riesgos inherentes asociados con el uso de BPE. El crecimiento celular, el fenotipo (CK18) y la función celular (actividad enzimática de GGT y LAP) se evaluaron en medio libre de BPE y se compararon con el medio BPE que contiene usado en los estudios en animales. El crecimiento, el fenotipo y la función de las células renales fueron equivalentes en los dos medios (los datos no se muestran).

Tabla 3.1 Recuperación Celular de Biopsias de Riñón Humano

Fuente	Células renales (células/10 mg de tejido)	
Muestras de Tejido de Riñón Humano (n=6)	Pase 0	Pase 1
	1,51-5,36 x 10^6	2,40-7,48 x 10^7

Una vez que se observó el crecimiento celular en los matraces T iniciales (pase 0) y no hubo signos visuales de contaminación, el medio de cultivo se reemplazó y cambió posteriormente cada 2-4 días **Figura 2B**. Se evaluaron las células para verificar la morfología de las células renales mediante observación visual de cultivos bajo el microscopio. Los cultivos demostraron característicamente un pavimento apretado o una apariencia de adoquines, debido a que las células se agruparon. Estas características morfológicas varían durante la expansión y pueden no estar presentes en cada pase. La confluencia del cultivo celular se estimó mediante una Biblioteca de imágenes de células en varios niveles de confluencia en los recipientes de cultivo usados durante las expansiones celulares.

Las células renales se pasaron por tripsinización cuando los recipientes de cultivo tienen al menos un 50 % de confluencia **Figura 2B**. Las células separadas se reconocen en recipientes que contienen medio de crecimiento celular renal, se hace el recuento y se calcula la viabilidad celular. En cada pase celular, las células se sembraron a 500-4000 células/cm^2 en un número suficiente de recipientes de cultivo para expandir el número celular al requerido para la formulación de NKA **Figura 2B**. Los recipientes de cultivo se pusieron en una incubadora a 37 ºC en una atmósfera de CO_2 al 5 %. Como se ha descrito anteriormente, se monitorizar o la morfología y la confluencia celular y se reemplazaron los medios de cultivo de tejido cada 2-4 días. La **Tabla 3.2** enumera la viabilidad de las células renales humanas observadas durante el aislamiento celular y la expansión de seis biopsias renales de donantes humanos.

Tabla 3.2 Viabilidad Celular de Células Renales Humanas en Cultivo

Pase (n = 6)	Viabilidad Celular (Promedio %)	Intervalo (%)
P0	88	84-93
P1	91	80-98
P2	94	92-99
P3	98	97-99

La variabilidad inherente del tejido de diferentes pacientes dio como resultado un rendimiento celular diferente en cultivo. Por lo tanto, no es práctico definir estrictamente el tiempo de los pases de células o el número y tipo de recipientes de cultivo requeridos en cada pase para alcanzar los números de células objetivo. Normalmente las células renales se someten a 2 o 3 pases; sin embargo, la duración del cultivo y el rendimiento celular pueden variar según la tasa de crecimiento celular. Esto se ejemplifica en la Figura 3, en la que se muestra la duración del cultivo y los rendimientos celulares (cálculo) de 6 pacientes.

Las células se separaron para la cosecha o pase con tripsina al 0,25 % con EDTA (Invitrogen). La viabilidad se evaluó mediante la exclusión con azul de Tripano y el recuento se lleva a cabo por vía manual usando un hemocitómetro o usando el sistema de recuento automatizado Cellometer® (Nexcelom Bioscience Lawrence MA).

Ejemplo 4

Crioconservación de Células Cultivadas

Las células renales expandidas se crioconservaron de manera rutinaria para acomodar la variabilidad inherente del crecimiento celular de pacientes individuales y para administrar el producto en un programa clínico determinado previamente **(Figura 2B).** Las células crioconservadas también proporcionan una fuente de soporte de células en caso de que se necesite otra NKA (por ejemplo, retraso debido a enfermedad del paciente, sucesos imprevistos del proceso, etc.). Se establecieron condiciones que se han usado para crioconservar células y recuperar células viables y funcionales al descongelarse.

Para la crioconservación, las células se suspenden a una concentración final de aproximadamente $50x10^6$ células/ml en solución de criopreservación (véase el **Ejemplo 1**) y se distribuyen en viales. Los viales de un ml que contienen aproximadamente $50x10^6$ células/ml se pusieron en la cámara de congelación de un congelador de velocidad controlada y se congelaron a una velocidad programada previamente. Después de la congelación, las células se transfirieron a un congelador de nitrógeno líquido para su almacenamiento en el proceso.

Ejemplo 5

Preparación de la población de células SRC

Las células renales seleccionadas (SRC) se pueden preparar a partir de los recipientes de cultivo finales que se cultivan a partir de células crioconservadas o directamente a partir de los cultivos de expansión que dependen de la programación de la **Figura 2B**.

Si se usan células crioconservadas, las células se descongelaron y se colocaron en placas en recipientes de cultivo de tejidos para una etapa de expansión final. Cuando los recipientes de cultivo finales tenían una confluencia de aproximadamente 50-100 %, las células confluentes estaban listas para el procesamiento para la separación SRC. Los intercambios de medios y los lavados finales de NKA diluyen cualquier solución de crioconservación residual en el producto final.

Una vez que los recipientes de cultivo celular final han alcanzado al menos una confluencia de un 50 %, los recipientes de cultivo se transfirieron a una incubadora hipóxica ajustada para oxígeno al 2 % en una atmósfera de CO_2 al 5 % a 37 ºC y se cultivaron durante una noche. Véase la **Figura 2C**. Las células se pueden mantener en la incubadora controlada por oxigeno ajustada para oxígeno al 2 % durante 48 horas. La exposición al entorno fisiológicamente relevante de bajo contenido de oxígeno (2 %) mejoró la eficacia de la separación celular y permitió una mayor detección de marcadores inducidos por hipoxia tal como VEGF.

Después de que las células se hayan expuesto a las condiciones hipóxicas durante un periodo de tiempo suficiente (por ejemplo, durante una noche a 48 horas), las células se separaron con tripsina al 0,25 % con EDTA (Invitrogen). La viabilidad se evaluó mediante exclusión con azul de Tripano y el recuento se llevó a cabo por vía manual usando un hemocitómetro o usando el sistema de recuento automatizado Cellometer® (Nexcelom Bioscience Lawrence MA). Las células se lavaron una vez con DPBS y se resuspendieron aproximadamente $850x10^6$ células/ml en DPBS.

La centrifugación en gradiente de densidad se usó para separar las poblaciones de células renales recolectadas en función de la densidad de flotación de la célula. Las suspensiones de células renales se separaron en solución de gradiente de densidad de iodixanol al 7 % en una sola etapa (OptiPrep; 60 % (p/v) en OptiMEM; véase el **Ejemplo 1**).

La solución de gradiente OptiPrep al 7 % se preparó y el índice de refracción indicativo de la densidad deseada se midió (I. R. 1,3456 + /- 0,0004) antes de su uso. Las células renales cosechadas se colocaron en capas sobre la solución de gradiente. El gradiente de densidad se centrifugó a 800 g durante 20 minutos a temperatura ambiente (sin freno) en tubos de centrífuga o en un procesador celular (por ejemplo, COBE 2991). La fracción celular que presentaba una densidad de flotación mayor de aproximadamente 1,045 g/ml se recogió después de la centrifugación como un sedimento distinto **Figura 4**. Las células que mantenían una densidad de flotación inferior a 1,045 g/ml se excluyeron y se descartaron.

El sedimento de SRC se resuspendió en DPBS **(Figura 2C).** La transferencia de OptiPrep residual, FBS, medio de cultivo y materiales auxiliares en el producto final se minimizan con 4 etapas de lavado con DPBS y 1 solución de gelatina.

Ejemplo 6

<u>Las células con potencial terapéutico se pueden aislar y propagar a partir de tejido renal normal y crónicamente enfermo</u>

El objetivo del presente estudio fue determinar la caracterización funcional de las células NKA humanas a través del análisis de alto contenido (HCA). Las imágenes de alto contenido (HCI) proporcionan imágenes simultáneas de múltiples sucesos subcelulares usando dos o más sondas fluorescentes (multiplexación) a través de un número de muestras. El análisis de alto contenido (HCA) proporciona una medición cuantitativa simultánea de múltiples parámetros celulares capturados en imágenes de alto contenido. En resumen, se generaron cultivos no fraccionados (UNFX) (Aboushwareb *et al.,* World J Urol 26, 295, 2008) y se mantuvieron a partir de biopsias centrales tomadas de cinco riñones humanos con enfermedad renal crónica avanzada (CKD) y tres riñones de ser humano sin CKD mediante procedimientos convencionales de biopsia. Después de (2) pases de UNFX *ex vivo*, las células se cosecharon y se sometieron a métodos de gradiente de densidad (como se describe en el Ejemplo 2 de Basu *et al.,* documento WO 2012/064369) para generar subfracciones, incluyendo las subfracciones B2, B3, y/o B4.

Los tejidos de riñón humano se obtuvieron a partir de donantes humanos sin CKD y con CKD como se resume en la Tabla 10.1 de Ilagan *et al.,* documento PCT/US2011/036347. la Figura 4 de Ilagan *et al.,* documento PCT/US2011/036347 muestra las características histopatológicas de las muestras HK17 y HK19. Los cultivos *ex vivo* se establecieron a partir de todos los riñones sin CKD (3/3) y con CKD (5/5). El análisis de alto contenido (HCA) del transporte de albúmina en células NKA humanas que definen regiones de interés (ROI) se muestra en la Figura 5 (HCA del transporte de albúmina en células NKA humanas) de Ilagan *et al.,* documento PCT/US2011/036347. La comparación cuantitativa del transporte de albúmina en células NKA obtenidas a partir de riñón sin CKD y con CKD se muestra en la Figura 6 de Ilagan *et al.,* documento PCT/US2011/036347. Como se muestra en la Figura 6 de Ilagan *et al.,* documento PCT/US2011/036347, el transporte de albúmina no se ve comprometido en los cultivos de NKA obtenidas a partir de CKD. El análisis comparativo de expresión de marcadores entre células B2 enriquecidas con túbulos y subfracciones de células B4 con agotamiento de células tubulares se muestra en la Figura 7 (CK8/18/19) de Ilagan *et al.,* documento PCT/US2011/036347.

El análisis funcional comparativo del transporte de albúmina entre las subfracciones de células B2 enriquecidas con túbulos y subfracciones de células B4 con agotamiento de células tubulares se muestra en la Figura 8 de Ilagan *et al.,* documento PCT/US2011/036347. La subfracción B2 está enriquecida con células de túbulos proximales y por lo tanto presenta un aumento de la función de transporte de albúmina.

Absorción de albúmina: Los medios de cultivo de células cultivadas hasta confluencia en placas de colágeno IV de 24 pocillos (BD Biocoat ™) se reemplazó durante 18-24 horas con DMEM sin rojo fenol, sin suero, DMEM con bajo contenido de en glucosa (DMEM pr-/s-/lg) que contenía 1X antimicótico / antibiótico y glutamina 2 mM. Inmediatamente antes del ensayo, las células se lavaron y se incubaron durante 30 minutos con DMEM pr-/s-/lg + HEPES 10 mM, glutamina 2 mM, $CaCl_2$ 1,8 mM, y $MgCl_2$ 1 mM. Las células se expusieron a 25 µg/ml de albúmina bovina conjugada con rodamina (Invitrogen) durante 30 minutos, se lavaron con PBS frío para detener la endocitosis y se fijaron inmediatamente con paraformaldehído al 2 % que contenía 25 µg/ml de colorante nuclear de Hoechst. Para los experimentos de inhibición, la proteína asociada al receptor 1 µM (RAP) (Ray Biotech, Inc., Norcross GA) se añadió 10 minutos antes de la adición de albúmina. El análisis y la obtención de imágenes microscópicas se realizaron con un BD Pathway™ 855 High-Content Biolmager (Becton Dickinson) (véase Kelley *et al.* Am J Physiol Renal Physiol. Nov de 2010; 299 (5): F1026-39. Epub 8 de Sep, 2010).

En conclusión, el HCA produce datos a nivel celular y puede revelar dinámicas de poblaciones que son indetectables con otros ensayos, es decir, expresión de genes o proteínas. Se puede usar un ensayo cuantificable de HCA *ex vivo* para medir la función de transporte de albúmina (HCA-AT) para caracterizar células de túbulos renales humanos como componentes de prototipos de NKA humanos. HCA-AT permitió la evaluación comparativa de la función celular, mostrando que las células competentes para el transporte de albúmina eran retenidas en cultivos de NKA obtenidos a partir de riñones con CKD humana. También se demostró que las subfracciones específicas de los cultivos de NKA, B2 y B4, eran distintas en fenotipo y función, con B2 que representa una fracción enriquecida en células tubulares con actividad de transporte de albúmina potenciada. La subpoblación de células B2 de la CKD humana es fenotípica y funcionalmente análoga a las células roedor B2 que demostraron eficacia *in vivo* (como se ha mostrado anteriormente).

Ejemplo 7

Cultivo con bajo contenido de oxígeno antes de que el gradiente influya en la distribución, composición, y expresión genética de la banda

Para determinar el efecto de las condiciones de oxigeno en la distribución y composición de los prototipos B2 y B4, las preparaciones celulares de neoriñón de diferentes especies se expusieron a diferentes condiciones de oxígeno antes de la etapa de gradiente. Se estableció una preparación celular (RK069) para el aumento de los neoriñones (NKA) de roedor mediante procedimientos convencionales para el aislamiento de células de rata y el inicio del cultivo, como se describe en Kelley *et al.,* 2010, mencionado anteriormente. Todos los matraces se cultivaron durante 2-3 días en condiciones de oxígeno al 21 % (atmosférico). Los medios se cambiaron y la mitad de los matraces a continuación se reubicaron a una incubadora con oxígeno controlado ajustada a un 2 % de oxígeno, mientras que los matraces restantes se mantuvieron en condiciones de oxígeno al 21 %, durante un periodo adicional de 24 horas. A continuación, las células se cosecharon de cada conjunto de condiciones mediante los procedimientos estándar de recolección enzimática que se han mencionado anteriormente. Los gradientes de etapa se prepararon de acuerdo con los procedimientos convencionales y los cultivos "normóxicos" (oxígeno al 21 %) e "hipóxicos" (oxígeno al 2 %) se cosecharon por separado y se aplicaron lado a lado a gradientes de etapas idénticos. Aunque se generaron 4 bandas y un sedimento en ambas condiciones, la distribución de las células en todo el gradiente fue diferente en lotes cultivados con oxígeno al 21 % y al 2 % **(Tabla 7.1).** Específicamente, el rendimiento de B2 aumentó con la hipoxia, con una disminución simultáneas de B3. Además, la expresión de genes específicos de B4 (tal como eritropoyetina) se mejoró en el gradiente resultante generado a partir de las células cultivadas en condiciones hipóxicas (Figura 73 de Presnell *et al.,* documento WO/2010/056328).

Una preparación celular de NKA de canino (DK008) se estableció mediante procedimientos convencionales para el aislamiento y el cultivo de células de perro (análogos a los procedimientos de aislamiento y cultivo de roedor), como se describe en Basu *et al.,* documento WO 2012/064369. Todos los matraces se cultivaron durante 4 días en

condiciones de oxígeno al 21 % (atmosférico), a continuación un subconjunto de matraces se transfirió a hipoxia (2 %) durante 24 horas mientras que un subconjunto de los matraces se mantuvo al 21 %. Posteriormente, cada conjunto de matraces se cosechó y se sometió a gradientes escalonados idénticos. De un modo similar al de los resultados en ratas, las células de canino cultivadas en condiciones hipóxicas se distribuyeron en todo el gradiente de manera diferente que las células de camino cultivadas con oxigeno atmosférico **(Tabla 7.1).** De nuevo, el rendimiento de B2 aumentó con la exposición hipóxica antes del gradiente, junto con una disminución simultánea de la distribución de B3.

Tabla 7.1.

	Rata (RK069)		**Perro (DK008)**	
	O_2 al 2 %	**O_2 al 21 %**	**O_2 al 2 %**	**O_2 al 21 %**
B1	0,77 %	0,24 %	1,20 %	0,70 %
B2	88,50 %	79,90 %	64,80 %	36,70 %
B3	10,50 %	19,80 %	29,10 %	40,20 %
B4	0,23 %	0,17 %	4,40 %	21,90 %

Los datos mencionados anteriormente muestran que la exposición de gradiente previo a hipoxia mejora la composición de B2 así como la distribución de células especializadas específicas (células productoras de eritropoyetina, células vasculares y células glomerulares) en B4. Por lo tanto, el cultivo hipóxico, la separación de gradiente de densidad seguido como se describe en Basu *et al.,* mencionado anteriormente, es una forma eficaz de generar poblaciones 'B2' y 'B4', entre especies.

Ejemplo 8

Caracterización de una mezcla no fraccionada de células renales aisladas a partir de una muestra de paciente con glomerulonefritis autoinmune

Una mezcla no fraccionada de células renales se aisló, como se ha descrito anteriormente, a partir de una muestra de paciente autoinmune con glomerulonefritis. Para determinar la composición genotípica imparcial de subpoblaciones específicas de células renales aisladas y expandidas a partir de tejido renal, se realizó un análisis cuantitativo por PCR en tiempo real (qRTPCR) (Brunskill *et al.,* Dev. Cell. Noviembre de2008; 15 (5): 781-791) usado para identificar patrones de expresión de genes diferenciales específicos de tipo celular y de ruta específica entre las subfracciones celulares. Como se muestra en la Tabla 6.1 de Ilagan *et al.,* Documento PCT/US2011/036347, HK20 es una muestra de paciente autoinmune con glomerulonefritis. Como se muestra en la Tabla 6.2 de Ilagan *et al.,* Documento PCT/US2011/036347, las células generadas a partir de HK20 carecen de células glomerulares, de acuerdo con lo determinado por qRTPCR.

Ejemplo 9

Formación de perfiles genéticos de poblaciones de células renales bioactivas terapéuticamente relevantes aisladas a partir de un caso de glomerulosclerosis segmentaria focal

Para determinar la composición genotípica imparcial de subpoblaciones específicas de células renales aisladas y expandidas a partir de tejido renal, se empleó el análisis cuantitativo por PCR en tiempo real (qRTPCR) (Brunskill et al., Mencionados anteriormente 2008) para identificar los patrones de expresión génica específicos de células y específicos de rutas entre las subfracciones celulares. La preparación humana HK023, obtenida a partir de un caso de glomeruloesclerosis segmentaria focal (FSGS) en la que se había destruido una gran parte de los glomérulos, se evaluó la presencia de células glomerulares en la fracción B4 al momento de la cosecha. En resumen, se generaron cultivos no fraccionados (UNFX) (Aboushwareb *et al.,* World J Urol 26, 295, 2008) y se mantuvieron con precisión de cada una de las (4) biopsias centrales tomadas de el riñón usando procedimientos de biopsia convencionales. Después de (2) pases de UNFX *ex vivo*, las células se cosecharon y se sometieron a métodos de gradiente de densidad de acuerdo con Ejemplo 6 de Basu *et al.,* documento WO2012/064369 para generar subfracciones, incluyendo la subfracción B4, que se sabe que está enriquecida para células endocrinas, vasculares y glomerulares basándose en el trabajo llevado a cabo en muestras de ensayo de roedor, perro y otras muestras de ensayo de ser humano.

Las fracciones de células B4 se recogieron por separado a partir de cada muestra UNFX independiente de HK023, que aparecen como bandas distintas de células con densidad de flotación entre 1,063 -1,091 g/ml. El ARN se aisló de cada muestra y se examinó la expresión de Podocina (marcador de células glomerulares) y PECAM (marcador de células endoteliales) mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Como se esperaba de una muestra generada por biopsia de un caso de FSGS grave, la presencia de células glomerulares positivas para podocina (+) en fracciones B4 fue incoherente, con la podocina siendo indetectable en 2/4 de las muestras. Por el contrario, PECAM + células vasculares estuvieron constantemente presentes en las fracciones B4 de 4/4 de los cultivos iniciados por biopsia. Por

lo tanto, la fracción B4 se puede aislar en el intervalo de densidades de 1,063-1,091 g/ml, incluso a partir de los riñones de ser humano con patologías graves.

Tabla 9.1 Expresión de Podocina y PECAM para detección de células glomerulares y vasculares en la subfracción B4 aislada a partir de un caso de FSGS.

HK02 3 / Biopsia	RQ (Podoclna)/B4	RQ (PECAM)/B4
N.º 1/p2	0,188	0,003
N.º 2/p2	ND	0,02
N.º 3/p2	40,1	0,001
N.º 4/P2	ND	0,003

Además, como se muestra en la Tabla 7.2 de Ilagan *et al.,* documento PCT/US2011/036347, la muestra de ser humano (HK018) presentó Podocina (marcador glomerular) no detectable por qRTPCR después de centrifugación en gradiente de densidad.

Ejemplo 10

Enriquecimiento/agotamiento de tipos de células renales viables usando clasificación celular activada por fluorescencia (FACS)

Una o mas células renales aisladas se pueden enriquecer, y/o uno o más tipos de células renales específicas se pueden agotar a partir de tejido de riñón primario aislado usando clasificación celular activada por fluorescencia (FACS).

REACTIVOS: etanol al 70 %; tampón de lavado (PBS); medio de células renales a 50:50 (DMEM con alto contenido de glucosa al 50 %): Queratinocitos al 50 %-SFM; azul de tripano al 0,4 %; anticuerpos primarios para dirigirse a la población de células de riñón tal como CD31 para células endoteliales de riñón y Nefrina para células glomerulares de riñón. Anticuerpos secundarios fluorescentes específicos de isotipo emparejados; tampón de tinción (BSA a 0,05 %en PBS).

PROCEDIMIENTO: Siguiendo procedimientos convencionales para limpieza de la cabina de seguridad biológica (BSC), una suspensión de células individuales de células de riñón a partir de cualquiera de células de aislamiento primario o cultivadas se puede obtener a partir de un matraz tratado con T500 T/C y se mueven a suspender en medio de células de riñón y se colocan en hielo. El recuento y la viabilidad celulares a continuación se determinan usando el método de exclusión con azul de tripano. Para enriquecimiento/agotamiento de células renales de, por ejemplo, las células glomerulares o las células endoteliales de una población heterogénea, se obtienen entre 10 y $50x10^6$ células vivas con una viabilidad de al menos un 70 %. La población heterogénea de células renales a continuación se tiñe con anticuerpo primario específico para el tipo de célula diana a una concentración de partida de 1 µg/0,1 ml de tampón de tinción/1 x 10^6 células (se hace la titulación si fuera necesario). El anticuerpo diana puede estar conjugado tal como CD31 PE (específico para células endoteliales de riñón) o no conjugado tal como Nefrina (específica para células glomerulares de riñón).

A continuación las células se tiñeron durante 30 minutos en hielo o a 4 ºC protegidas de la luz. Después de 30 minutos de incubación, las células se lavan mediante centrifugación a 300 x g durante 5 min. A continuación el sedimento se vuelve a suspender en cualquiera de PBS o tampón de tinción dependiendo de si se requiere un anticuerpo secundario específico de isotipo conjugado. Si las células se etiquetan con un anticuerpo primario conjugado con fluorocromo, las células se vuelven no suspender en 2 ml de PBS por 10^7 células y se evoluciona a FACS aria o aparato de clasificación de células equivalente. Si las células no están etiquetadas con un anticuerpo conjugado con fluorocromo, entonces las células se etiquetaron con un anticuerpo secundario conjugado con fluorocromo específico isotipo a una concentración de partida de 1 ug/0,1 ml/10^6 células.

A continuación las células se tiñeron durante 30 min el hielo o a 4 ºC protegidas de la luz. Después de 30 minutos de incubación, las células se lavan mediante centrifugación a 300 x g durante 5 min. Después de la centrifugación con el sedimento se vuelve a suspender en PBS a una concentración de $5x10^6$/ ml de PBS y a continuación se transfieren 4 ml por 12 x 75 mm a un tubo estéril.

FACs Aria se prepara para clasificación estéril de células vivas de acuerdo con las instrucciones del fabricante (manual de usuario de BD FACs Aria). El tubo de muestra se carga en el FACs Aria y los voltajes de PMT se ajustan después de que comience la adquisición. Las ventanas se dibujan para seleccionar tipos de células específicas de riñón usando intensidad fluorescente usando una longitud de onda específica. Se dibuja otra puerta para seleccionar la población negativa. Una vez que se han dibujado las puertas deseadas para encapsular la población diana positiva y la población negativa, las células se clasifican de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La población diana positiva se recoge en un tubo cónico de 15 ml y la población negativa en otro tubo cónico de 15 ml lleno con 1 ml de medio de células renales. Después de la recolección, se analiza una muestra de cada tubo mediante citometría de flujo para determinar la pureza. Las células recolectadas se lavan por centrifugación a 300 x g durante 5 min. y el sedimento se resuspende en medio de células renales para su posterior análisis y experimentación.

Ejemplo 11

Enriquecimiento/agotamiento de tipos de células renales usando clasificación celular magnética

Una o mas células renales aisladas se pueden enriquecer y/o uno o más tipos de células renales específicas se pueden agotar a partir de tejido de riñón primario aislado.

REACTIVOS: etanol al 70 %, tampón de lavado (PBS), medio de células renales a 50:50 (DMEM con alto contenido de glucosa al 50 %): Queratinocitos al 50 %-SFM, azul de tripano al 0,4 %, tampón de desarrollo (PBS, EDTA 2 mM, BSA al 0,5 %), tampón de aclarado (PBS, EDTA 2 mM), solución de limpieza (etanol al 70 % en v/v), reactivo de bloqueo Miltenyi FCR, microperlas de Miltenyi específicas para isotipo de IgG, anticuerpo diana tal como CD31 (PECAM) o Nefrina, o anticuerpo secundario.

PROCEDIMIENTO: Siguiendo procedimientos convencionales para limpieza de la cabina de seguridad biológica (BSC), se obtiene una suspensión celular única de células renales de aislamiento primario o cultivo y se resuspende en medio de células renales. El recuento celular y la viabilidad se determinan usando el método de exclusión de azul de tripano. Para el enriquecimiento/agotamiento de células renales de, por ejemplo, las células glomerulares o células endoteliales de una población heterogénea, se obtiene al menos 10^6 hasta $4x10^9$ células vivas con una viabilidad de al menos un 70 %.

La mejor separación para el enfoque de enriquecimiento/agotamiento se determina en función de la célula diana de interés. Para el enriquecimiento de una frecuencia diana inferior a un 10 %, por ejemplo, las células glomerulares usando el anticuerpo Nefrina, Miltenyi autoMACS, o equivalente, el programa instrumento POSSELDS (selección doble positiva en modo sensible). Para el agotamiento de una frecuencia diana de más de un 10 %, se usa Miltenyi autoMACS, o equivalente, el programa de instrumento DEPLETES (agotamiento en modo sensible).

Las células vivas se etiquetan con anticuerpo primario específico mediana, por ejemplo, anticuerpo policlonal Nefrina rb para células glomerulares, añadiendo 1 mg/10^6 células/0,1 ml de PBS con BSA al 0,05 % en un tubo de centrífuga cónico de 15 ml, seguido de incubación durante 15 minutos a 4 ºC.

Después del etiquetado, las células se lavan para retirar el anticuerpo primario sin unir mediante la adición de 1-2 ml de tampón por 10^7 células seguido de centrifugación a 300 x g durante 5 min. Después del lavado, se añade un anticuerpo secundario específico de isotipo, tal como PE de pollo anti-conejo a 1 ug/10^6/0,1 ml de PBS con BSA al 0,05 %, seguido de incubación durante 15 minutos a 4 ºC.

Después de la incubación, las células se lavan para retirar el anticuerpo secundario no unido mediante la adición de 1-2 ml de tampón por 10^7 células seguido de centrifugación a 300 x g durante 5 min. El sobrenadante se retira, y el sedimento celular se resuspende en 60 µl de tampón por 10^7 células totales seguido de la adición de 20 µl de reactivo de bloqueo FCR por 10^7 células totales, que a continuación se mezcla bien.

Añadir 20 µl de microperlas MACS directas (tal como microperlas anti-PE) y mezclar y a continuación incubar durante 15 min a 4 ºC.

Después de la incubación, las células se lavan añadiendo 10-20x del volumen de etiquetado de tampón y centrifugando la suspensión celular a 300 x g durante 5 min y resuspendiendo el sedimento celular en 500 µl - 2 ml de tampón por 10^8 células.

De acuerdo con las instrucciones del fabricante, el sistema autoMACS se limpia y ceba en preparación para la separación de células magnéticas usando autoMACS. Los nuevos tubos de recolección estériles se colocan debajo de los puertos de salida. Se elige el programa de separación celular autoMACS. Para la selección se elige el programa POSSELDS. Para el agotamiento, se elige el programa DEPLETES.

Las células etiquetadas se insertan en el puerto de absorción y a continuación se comienza con el programa. Después de la selección o el agotamiento de las células, las muestras se recogen y se colocan en hielo hasta su uso. La pureza de la muestra agotada o seleccionada se verifica por citometría de flujo.

Ejemplo 12

Caracterización fenotípica de la población de células renales heterogéneas enriquecida

El siguiente ejemplo detalla el uso de citometría de flujo para caracterizar las células renales heterogéneas de ser humano seleccionadas del **Ejemplo 5.** La población heterogénea de células renales estaba compuesta principalmente por células epiteliales renales que son bien conocidas por su potencial regenerativo. Otras células parenquimatosas (vasculares) y estromales (conducto de recogida) pueden estar escasamente presentes en la población celular autóloga.

El fenotipo celular se monitoriza mediante análisis de expresión de marcadores de células renales usando citometría de flujo. El análisis fenotípico de las células se basa en el uso de marcadores antigénicos específicos para el tipo de célula que se analiza. El análisis de citometría de flujo proporciona una medida cuantitativa de las células en la población demuestra que expresa el marcador antigénico que se está analizando.

Se ha informado que varios marcadores en la bibliografía son útiles para la caracterización fenotípica de células renales: (i) citoqueratinas; (ii) proteínas de membrana de transporte (acuaporinas y cubilina); (iii) moléculas de unión celular (adherinas, grupo de diferenciación y lectinas); y (iv) enzimas metabólicas (glutatión). Dado que la mayoría de las células encontradas en cultivos obtenidos a partir de digestiones de riñón completo son células epiteliales y endoteliales, los marcadores examinados se centran en la expresión de proteínas específicas para estos dos grupos.

Las citoqueratinas son una familia de proteínas de filamento intermedio expresadas por muchos tipos de células epiteliales en diversos grados. El subconjunto de citoqueratinas expresadas por una célula epitelial depende del tipo de epitelio. Por ejemplo, las citoqueratinas 7, 8, 18 y 19 se expresan por epitelios simples normales del riñón y el tracto urogenital restante, así como los tractos digestivo y respiratorio. Estas citoqueratinas en combinación son responsables de la integridad estructural de las células epiteliales. Esta combinación representa las familias de queratina ácido (tipo I) y básica (tipo II) y se encuentra abundantemente expresada en células renales (Oosterwijk *et al.,* J Histochem Cytochem, 38 (3): 385-392, 1990). Las citoqueratinas preferentes para su uso en el presente documento son CK8, CK18, CK19 y combinaciones de las mismas.

Las acuaporinas son proteínas de membrana de transporte que permiten el paso de agua dentro y fuera de la célula, a la vez que evitan el paso de iones y otros solutos. Hay trece acuaporinas descritas en la bibliografía, seis de las cuales se encuentran en el riñón (Nielsen *et al.,* J Histochem Cytochem, 38 (3): 385-392, 2002). La Acuaporina 2, al ejercer un control estricto en la regulación del flujo de agua, es responsable de que las membranas plasmáticas de las células epiteliales de los conductos de recolección renales tengan una alta permeabilidad al agua, permitiendo de ese modo que el agua fluya en la dirección de un gradiente osmótico (Bedford *et al.,* J Am Soc Nephrol, 14 (10): 2581-2587, 2003; Takata *et al.,* Histochem Cell Biol, 130 (2): 197-209, 2008; Tamma *et al.,* Endocrinology, 148 (3): 1118 - 1130, 2007). Acuaporina1 es característica de los túbulos proximales (Baer *et al.,* Cells Tissues Organs: 184 (1), 16-22, 2006; Nielsen *et al.,* 2002, mencionados anteriormente).

La Cubilina es una proteína receptora de membrana de transporte. Cuando se localiza conjuntamente con la proteína megalina, juntas estimulan la internalización de ligandos unidos a cubilina tal como albúmina. La Cubilina se encuentra dentro del epitelio del intestino y el riñón (Christensen, Am J Physiol Renal Physiol, 280 (4): F562-573, 2001).

CXCR4 es una proteína de membrana de transporte que sirve como un receptor de quimioquinas para SDF1. Después de la unión del ligando, los niveles de calcio intracelular aumentan y la activación de MAPK1 / MAPK3 aumenta. CXCR4 se expresa constitutivamente en el riñón y desempeña un papel importante en el desarrollo renal y la tubulogénesis (Ueland *et al.,* Dev Dyn, 238 (5): 1083-1091, 2009).

Las cadherinas son proteínas de adhesión celular dependientes de calcio. Se clasifican en cuatro grupos, con las E-cadherinas encontradas en el tejido epitelial, y están implicadas en la regulación de la movilidad y la proliferación. La E-cadherina es una glicoproteína transmembrana que se ha encontrado que se localiza en las uniones de adherinas de las células epiteliales que forman los túbulos distales en el riñón (Prozialeck *et al.,* BMC Physiol, 4:10, 2004; Shen *et al.,* Mod Pathol, 18 (7): 933-940, 2005).

La DBA (aglutinina de *Dolichos biflorus*) es una lectina de unión a α-N-acetilgalactosamina (proteína de unión celular) transportada en la superficie de las estructuras de los conductos colectores renales, y se considera y se usa como un marcador general del desarrollo de conductos renales de recogida y túbulos distales (Michael *et al.,* J Anat 210 (1): 89-97,2007; Lazzeri *et al.,* J Am Soc Nephrol 18 (12): 3128-3138, 2007).

El grupo de diferenciación 31 (CD31; también conocido como molécula de adhesión de células endoteliales de plaquetas, PECAM-1) es una proteína de adhesión celular que se expresa en poblaciones seleccionadas de células inmunes así como células endoteliales. En las células endoteliales, esta proteína se concentra en los bordes celulares (DeLisser, 1997). El grupo de diferenciación 146 (CD146) está implicado en la adhesión celular y la cohesión de las células endoteliales en las uniones intercelulares asociadas con el citoesqueleto de actina. Fuertemente expresado por el endotelio de los vasos sanguíneos y el músculo liso, el CD146 se usa actualmente como marcador para el linaje de células endoteliales (Malyszko *et al.,* J Clin Endocrinol Metab, 89 (9): 4620-4627, 2004), y es el equivalente canino de CD31.

La gamma-glutamil transpeptidasa (GGT) es una enzima metabólica que cataliza la transferencia del resto gamma-

glutamilo de glutatión a un aceptor que puede ser un aminoácido, un péptido, o agua, para formar glutamato. Esta enzima también desempeña un papel en la síntesis y degradación de la glutatión y la transferencia de aminoácidos a través de la membrana celular. GGT está presente en las membranas celulares de muchos tejidos, incluyendo las células del túbulo proximal de los riñones (Horiuchi *et al.,* Eur J Biochem, 87 (3): 429-437, 1978; Pretlow *et al.,* J Histochem Cytochem, 35 (4): 483-487, 1987; Welbourne *et al*., Am J Physiol, 277 (4 Pt 2): F501-505, 1999). La **Tabla 12.1** proporciona un listado de los tipos específicos de células renales que expresan estos marcadores detectados por citometría de flujo.

Tabla 12.1 Marcadores Fenotípicos para Caracterización de SRC

Marcador Antigénico	Reactividad
CK8/18/19	Células epiteliales, túbulos proximales y distales
CK8	Células epiteliales, túbulos proximales
CK18	Células epiteliales, túbulos proximales
CK19	Células epiteliales, conductos de recogida, túbulos distales
CK7	Células epiteliales, conductos de recogida, túbulos distales
CXCR4	Células epiteliales, túbulos proximales y distales
E-cadherina	Células epiteliales, túbulos distales
Cubilina	Células epiteliales, túbulos proximales
Acuaporina 1	Células epiteliales, túbulos proximales, extremidad fina descendente
GGT1	Células de riñón fetales y de adulto, túbulos proximales
Acuaporina 2	Células de los conductos de recogida renales, túbulos distales
DBA	Células de los conductos de recogida renales, túbulos distales
CD31	Células endoteliales del riñón (rata)
CD146	Células endoteliales del riñón (canino, ser humano)

Las células SRC del **Ejemplo 5** se investigaron para fenotipo de biomarcadores específicos.

Para inmunofenotipado: el anticuerpo específico se añadió a 100 microlitros de suspensión celular y la mezcla se incubó en la oscuridad durante 30-45 minutos a 4 ºC. Después de la incubación, las células se lavaron con PBS y se centrifugaron para retirar el exceso de anticuerpo. Las células se volvieron a suspender a células/microlitros de PBS y se analizaron mediante citometría de flujo. El análisis de citometría de flujo se llevó a cabo con un citómetro de flujo FACSAria (Becton Dickinson) y el software FlowJo (Treestar, Inc.). Los anticuerpos usados para caracterizar el fenotipo del marcador de superficie se muestran en las **Tablas 12.2** y **12.3**. En todos los experimentos se usaron los controles negativos de anticuerpo primario específico de isotipo. Los controles emparejados por isoTipo apropiados se usaron para hacer una ventana de las poblaciones negativas.

Tabla 12.2. Panel Fenotípico para SRC Humanas en NKA Informada en IND

Marcador Antigénico	**Distribución renal**	**Componente Celular**	**Descripción Comercial**
Perfil Fenotípico Primario			
CK 18	Células epiteliales, túbulos proximales	Citoplasmático	clon C-04, Ms mAb IgG1, Abcam ab668
GG T1	Túbulos proximales	Membrana	Ms mAb IgG2a, Abcam ab55138
AQ P2	Túbulos distales, conductos de recogida	Membrana	Rb pAb IgG, Abcam ab62628
Perfil Fenotípico Ampliado			
CK 8,18,19	Túbulos proximales y distales	Citoplasmático	Ms mAb IgG1, Abcam ab41825

(continuación)

Marcador Antigénico	Distribución Renal	Componente Celular	Descripción Comercial
CK 8	Túbulos proximales	Citoplasmático	Ms mAb IgG1, Abcam ab9023
CK 19	Túbulos distales, conductos de recogida	Citoplasmático	Clon BA-17, Ms mAb, Abcam ab7755
CK 7	Túbulos distales, conductos de recogida	Citoplasmático	Ms mAb IgG1, Abcam ab41825
CX CR4 (Fusina)	Túbulos proximales y distales	Membrana	Clon 12G5, Ms mAb IgG2a, R&D Systems MAB170
E-cadherina (CD324)	Túbulos distales	Membrana	Ms mAb IgG2a, BD 610182
Cubilina	Túbulos proximales	Membrana	Gt pAb IgG, Santa Cruz Biotechnology, sc-23644
AQ P1	Túbulos proximales, extremidad fina descendente	Membrana	Clon 1/22, Ms mAb IgG2a, Abcam ab9566
DB A	Túbulos distales, conductos de recogida	Membrana	Aglutinina, Vector Labs B-1035
CD 31 (PECAM-1)	Células endoteliales (rata)	Membrana	Ms mAb IgG1, BD 555444
CD 146	Células endoteliales (ser humano, perro)	Membrana	Clon P1H12, Ms mAb IgG1, Abcam ab24577
Abreviaturas: Gt, cabra; Ms, ratón; mAb, anticuerpo monoclonal; pAb, anticuerpo policlonal; Rb, conejo.			

Tabla 12.3. Marcadores Fenotípicos Adicionales para Evaluación de SRC Humanas

Marcador Antigénico	Distribución Renal	Descripción Comercial
AQP4	Conductos de recogida	Clon 8J301, Ms mAb IgG1, US Biological A3000-14B
CD24	Glomérulos y túbulos proximales (marcador de células precursoras / células madre)	Rb pAb IgG, Abcam ab110448
CD54 (ICAM-1)	Glomérulos (células endoteliales, ser humano)	Clon HA58, Ms mAb IgG1, BD 559771
CD73	Corteza Renal (fibroblastos intersticiales)	Gt pAb IgG, Santa Cruz Biotechnology, sc-14684
CD117	Túbulos proximales (marcador de células madre)	Clon 104D2, Ms mAb 104D2, BD 340867
CD133	Glomérulos y túbulos proximales (marcador de células precursoras / células madre)	Rb pAb IgG, Abcam ab19898
CK8,18	Túbulos proximales y distales	Ms mAb IgG2a, Abcam abl5224
CK40 a 67	Túbulos proximales	Clon AE1/AE3, Ms mAb IgG1, Dako M3515
N-cadherina	Túbulos proximales	Ms mAb IgG1, BD 610921

(continuación)

Marcador Antigénico	Distribución Renal	Descripción Comercial
Pan-cadherina	Túbulos proximales	Clon CH-19, Ms mAb IgG1, Abcam ab6528
Calbindina	Túbulos distales	Ms mAb IgG1, US Biological C0113-15
Calponina	Glomérulos (fibroblastos intersticiales)	Ms mAb IgG1, Dako M3556
Conexina 43	Glomérulos	Clon 4EG.2, Ms mAb IgG1, Abcam ab79010
EPO (eritropoyetina)	Corteza Renal (fibroblastos intersticiales)	Ms mAb IgG2a, US Biological E3455-13
GLEPP1 (proteína 1 del epitelio glomerular)	Glomérulos	Gt pAb IgG, Santa Cruz Biotechnology sc-33415
GST-1 (alfa glutatión S-transferasa)	Túbulos proximales	Rb pAb IgG, Santa Cruz Biotechnology sc-459
Haptoglobulina	Glomérulos	IgY de pollo, US Biological 03-003-02
Itgb1 (Integrina 1)	conductos de recogida	Clon JB1B, Ms mAb IgG2a, Abcam ab30388
KIM-1/TIM-1 (molécula 1 de lesión renal /molecular que contiene inmunoglobulina de linfocitos T y mucina)	Túbulos proximales	Clon 212211, Ms mAb IgG2b, R&D Systems MAB1750
Megalina	Túbulos proximales y distales	Rb pAb IgG, Santa Cruz Biotechnology, sc-25470
MAP-2 (proteína 2 asociada a microtúbulos)	Túbulos proximales y distales	Clon M13, Ms mAb IgG1, Zymed / Life Technologies 13-1500
Nefrina	Glomérulos	Ms mAb IgG1, US Biological N2028-50D
NKCC (cotransportadores de Na-K-Cl)	Túbulos distales	Rb pAb IgG, Santa Cruz Biotechnology sc-133823
OAT-1 (transportador 1 de aniones orgánicos)	Túbulos proximales	Rb pAb IgG, US Biological 041836
Osteopontina	Túbulos proximales y distales	Clon 53, Ms mAb IgG2a, Abcam 69498
PCLP1 (molécula 1 similar a podocalixina)	Glomérulos	Gt pAb IgG, Santa Cruz Biotechnology sc-10503
Podocina	Glomérulos	Rb pAb IgG, Santa Cruz Biotechnology sc-21009
SMA (alfa-actina del músculo liso)	Glomérulos (fibroblastos intersticiales)	Ms mAb IgG2a, Dako M0851
Sinaptopodina	Glomérulos	Rb pAb IgG, Santa Cruz Biotechnology sc-50459

(continuación)

Marcador Antigénico	Distribución Renal	Descripción Comercial
THP (proteína tamm-horsfall)	Túbulos distales	Ms mAb IgG2a, Santa Cruz Biotechnology sc-20631
Vimentina	Túbulos proximales (marcador de células precursoras / células madre)	Rb pAb IgG, Atlas Antibodies HPA001762

Las suspensiones celulares se generaron a partir de la disociación inicial del tejido o el tratamiento con tripsina de cultivos adherentes y se analizaron por citometría de flujo para identificar componentes celulares. Los anticuerpos usados se enumeran en las **Tablas 12.2** y **12.3** (arriba). Se usaron controles negativos de anticuerpos primarios específicos de isotipo en todos los experimentos. Las células etiquetadas se analizaron con un citómetro de flujo FACSAria (Becton Dickinson) y el software FlowJo (Treestar, Inc.). Se usaron controles adecuados de isotipo correspondiente para bloquear poblaciones negativas. Después de una incubación durante una noche a 4 ºC, las células se sedimentaron, se lavaron dos veces con Triton Buffer (Triton X-100 al 0,2 % en PBS), se resuspendieron en 1 ml de DBPS que contiene anticuerpo secundario conjugado con IgG2A de cabra anti-ratón al fluorocromo Alexa A647 (Invitrogen), y se incubó durante 30 minutos más. Las células se lavaron y se volvieron a suspender en 1 ml de PBS para su análisis de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando el software FACSAria y FlowJo. Como control negativo, las células se incubaron en anticuerpos monoclonales con isotipo paralelo y conjugado con el mismo fluorocromo.

La **Figura 5** (Distribución de fenotipos) muestra la expresión cuantificada de estos marcadores en poblaciones de SRC representadas como valores de porcentaje de cada fenotipo en la población.

CK8/18/19 son las proteínas de células renales expresadas de manera más coherente detectadas en todas las especies. GGT1 y Acuaporina-1 (AQP1) se expresan de manera coherente pero a niveles variables. DBA, Acuaporina 2 (AQP2), E-cadherina (CAD), CK7, y CXCR4 también se observan a niveles modestos, aunque con más variabilidad, y CD31/146 y Cubilina la fueron las expresiones más bajas. La **Tabla 12.4** proporciona los marcadores seleccionados, el intervalo y los valores de porcentaje medio de fenotipo en SRC y los criterios para su selección.

Tabla 12.4 Marcador Seleccionado para Análisis Fenotípico de SRC

Marcador Fenotípico	Intervalo de Expresión	Promedio	Criterio	Nivel de Expresión
CK18	81,1 a 99,7 % (n = 87)	96,7 %	Marcador epitelial	Alto
GGT1	4,5 a 81.2 % (n = 63)	50,7 %	Marcador Tubular Funcional	Moderado
AQP2	3,0 a 53,7 % (n = 24)	26,8 %	Marcador de conducto de recogida	Bajo*
* Se espera que las células epiteliales del conducto de recogida sean bajas en SRC basándose en su densidad de flotación				

Expresión Génica de SRC

El perfil de expresión génica de SRC aislado de cultivos de células renales ser humano por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR), incluyendo los de acuaporina 2, E-cadherina, cubulina, VEGF y CD31 que también se analizaron para la producción de proteínas. Los marcadores genotípicos de la **Tabla 12.5** son representativos de las poblaciones celulares que cabe esperar que se encuentren en los cultivos de células renales. NCAD, Cubilina y CYP2R1 son marcadores de células epiteliales tubulares, AQP2 y ECAD son marcadores de conducto colector y túbulos distales. Podocina y Nefrina son marcadores de podocitos. VEGF y CD31 son marcadores endoteliales. VEGF y EPO son genes sensibles al oxígeno con ARNm relacionado presente en varios diferentes tejidos y tipos de células.

Las sondas génicas usadas se obtuvieron en TaqMan. El pase 2 de células renales de ser humano se cosechó al 70-90 % de confluencia. El ARN se purificó de las células usando el Kit Mini RNeasy Plus de Qiagen de acuerdo con el protocolo para la purificación del ARN total de las células animales. El ADNc se generó a partir de un volumen de ARN igual a 1,4 µg usando el kit de síntesis de ADNc superscript® VILO ™ de Invitrogen siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos de qPCR promediados para las poblaciones de SRC (n = 3) se muestran en la **Tabla 12.5**.

Los resultados sugieren que una población de células epiteliales tubulares está presente como lo demuestra el nivel relativamente más alto de expresión de NCAD, Cubilina y CYP2R1. Los marcadores del túbulo de recogida distal y del túbulo distal AQP2 y ECAD son relativamente bajos y CD31, un marcador endotelial es aún más bajo **(Tabla 12.5).**

Tabla 12.5 Análisis Expresión Génica de SRC Humanas

Nombre del Gen	Denominación del Gen	Marcador	Humano	
			RQ promedio	Error Estd
Acuaporina 2	AQP2	Túbulo Distal, Conducto de Recogida	0,201	0,201
E-cadherina/	ECAD/	Distal	0,318	0,191
cadherina 1, Tipo 1	CDH1	Túbulo		
cadherina/cadherina 2 Neuronales, Tipo 1	NCAD/CDH2	Túbulo Proximal	3,027	0,208
Cubilina	CUBN	Tubular	4,319	1,036
Nefrina	NPHS1	Podocito	0,768	0,422
Podocina	NPHS2	Podocito	0,000	0,000
Eritropoyetina	EPO	Fibroblasto Cortical	2,795	0,426
vitamina D 24-Hidroxilasa	CYP2R1	Tubular	1,562	0,028
Factor A de Crecimiento Endotelial Vascular	VEGFA	Endotelial	2,232	0,121
Molécula de adhesión de células plaquetarias/Endoteliales/CD31	PECAM1/CD31	Endotelial	0,005	0,005

Se han elegido marcadores fenotípicos y funcionales basándose en una evaluación genotípica temprana. Los niveles de expresión del gen VEGF fueron altos y los niveles de expresión del gen acuaporina2 fueron bajos, lo que es coherente con los datos del análisis de proteínas **(Tabla 12.4 y Tabla 12.6).**

Actividad enzimática de SRC

La presencia de células viables y la función SRC se demostró mediante el metabolismo de PrestoBlue y la producción de VEGF y KIM-1.

SRC secreta activamente proteínas que se pueden detectar mediante un análisis de medio acondicionado. La función celular se evalúa por la capacidad de las células para metabolizar PrestoBlue y secretar VEGF (Factor de crecimiento endotelial vascular) y KIM-1 (Molécula 1 de lesión renal).

Las células que funcionan de manera segura se pueden monitorizar en NKA por su capacidad para metabolizar PrestoBlue. El reactivo de viabilidad celular PrestoBlue es un reactivo de ensayo basado en resazurina modificado que es un colorante de color azul no fluorescente permeable a las células. Después de su entrada en las células que son lo suficientemente viables para proliferar, el colorante se reduce, a través de procesos celulares naturales que involucran enzimas deshidrogenasa, a un fluoróforo de color rojo brillante que se puede medir mediante fluorescencia o absorbancia.

Las biomoléculas VEGF y KIM-1 representan una selección de moléculas de las propuestas como biomarcadores analíticos sensibles y específicos no clínicos de daño y función renal (Sistare, 2010; Warnock, 2010). *In vivo*, ambos marcadores son indicativos de la función tubular, la reparación de lesiones y/o *in vitro* son características reconocidas de los cultivos de células epiteliales tubulares. KIM-1 es una proteína extracelular anclada en la membrana de las células del túbulo proximal renal que sirve para reconocer y fagocitar las células apoptóticas que se desprenden durante la lesión y el recambio celular. El VEGF, expresado constitutivamente por las células renales, es un factor fundamental angiogénico y prosupervivencia que promueve la división celular, la migración, la supervivencia de las células endoteliales y la germinación vascular. SRC se ha caracterizado por expresar constitutivamente ARNm de VEGF **(Tabla 12.5)** y producir activamente la proteína **(Tabla 12.6).** Estas proteínas pueden detectarse en medio de cultivo expuesto a células renales y SRC. La **Tabla 12.6** presenta cantidades de VEGF y KIM-1 presentes en medio acondicionado de células renales y cultivos SRC. Las células renales se cultivaron hasta casi confluencia. El medio acondicionado de la exposición durante una noche a los cultivos de células renales y SRC se sometió a ensayo para VEGF y KIM-1.

Tabla 12.6 Producción de VEGF y KIM-1 por células renales humanas y SRC

Medio Acondicionado	VEGF		KIM-1	
	ng/ml	ng/millones de células	ng/ml	ng/millones de células
Cultivo de Células Renales (n = 15)	0,50 a 2,42	2,98 a 14,6	0,20 a 3,41	1,14 a 15,2
SRC (n = 14)	0,80 a 3,85	4,83 a 23,07	0,32 a 2,10	1,93 a 12,59

La función celular de SRC, formulación previa, también se evaluó midiendo la actividad de dos enzimas específicas; GGT (γ-glutamil transpeptidasa) y LAP (leucina aminopeptidas la) (Chung, 1982, J Cell Biol 95 (1): 118-126), encontrado en riñón túbulos proximales. Los métodos para medir la actividad de estas enzimas en las células usan un sustrato específico de enzima en solución que, cuando se añade a las células que expresan la enzima activa, se escinden, liberando un producto cromogénico (Nachlas, 1960 J Biophys Biochem Cytol 7: 261-264; Tate, 1974 Proc Natl Acad Sci USA 71 (9): 3329-3333). La absorbancia de la solución expuesta a células se mide y es relativa a la cantidad de producto de escisión resultante de la enzima activa. El sustrato usado para GGT es el clorhidrato de la γ-p-nitroanalida del ácido L-glutámico y para LAP es L-leucina p-nitroanalida. La **Figura 6** muestra la actividad de LAP y GGT en seis muestras de SRC producidas a partir de donantes ser humanos (BP1-BP4).

Sumario de Caracterización de SRC

La morfología celular se monitorizó durante la expansión celular mediante la comparación de observaciones de cultivo con imágenes en una biblioteca de imágenes. Se monitorizó la cinética del crecimiento celular en cada pase celular. Se espera que el crecimiento celular sea variable de paciente a paciente. Los recuentos de SRC y la viabilidad se monitorizaron mediante exclusión de colorante azul de tripano y/o metabolismo de PrestoBlue. Las SRC se caracterizan por la expresión fenotípica de CK18, GGT1. Además, se puede controlar la expresión de AQP2. El metabolismo de PrestoBlue y la producción de VEGF y KIM-1 se utilizan como marcadores de la presencia de SRC viable y funcional. La función SRC se puede dilucidar aún más con el perfil de expresión génica y la medición de la actividad enzimática con LAP y GGT.

Ejemplo 13

Preparación del BioMaterial

El biomaterial usado en NKA (solución de gelatina) se caracteriza por dos parámetros fundamentales:

Concentración: la concentración de la solución de gelatina se mide mediante la absorbancia a 280 nm mediante un espectrofotómetro. La concentración de gelatina se determina a partir de una curva de calibración de absorbancia con respecto a la concentración.
Ensayo de inversión: el ensayo de inversión proporciona una evaluación visual de la capacidad de la solución de gelatina para formar y mantener un gel a una temperatura de 2-8 ºC y para que el gel se licúe a temperatura ambiente.

Elucidación de otras Características del Biomaterial

Los biomateriales usados en NKA se pueden caracterizar adicionalmente por las propiedades reológicas y la viscosidad. Los ensayos de reología y viscosidad se llevarán a cabo solo con fines de verificación y están estimados a su uso para la caracterización ampliada de biomateriales obtenidos de otros proveedores.

Las propiedades reológicas del biomaterial se pueden medir primero a 4 ºC, a continuación a 25 ºC mediante el uso de un reómetro estilo Couette Cell. La muestra se equilibra durante al menos 30 minutos a cada temperatura. Un módulo de almacenamiento aceptable (G' > 10) a la temperatura más baja refleja la capacidad de la solución para formar y mantener un gel a una temperatura de envío y transporte de NKA de 2-8 ºC. Un módulo de pérdida aceptable (G" < 10) a la temperatura más alta refleja la capacidad del gel para licuar una temperatura ambiente según se requiera para la administración e implantación de NKA.

La viscosidad del Biomaterial se mide usando un viscosímetro de cono y placa a 37 ºC y una tasa de cizalladura de 200-300 s-1. Las soluciones con viscosidad en intervalos de 1,05-1,35 cP se pueden administrar de manera eficaz mediante agujas con un calibre de 18-27.

En la preparación para la formulación de NKA, la gelatina se disuelve en DPBS a una concentración especificada (0,88 % ± 0,12 % en p/v) para formar una solución de gelatina **(Figura 2D).** La solución de gelatina se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,1 µm y se dividió en alícuotas en tubos. Se tomaron muestras para liberar la solución de

gelatina antes hasta la congelación o formulación de NKA. El hidrogel gelificado se almacena refrigerado o congelado como material a granel listo para la formulación **(Figura 2D).**

Ejemplo 14

Formulación de NKA

Se hizo el recuento de las SRC lavadas del **Ejemplo 5** mediante exclusión de colorante azul de tripano. La solución de gelatina se retiró del almacenamiento en frío y se licuó calentando a 26-30 ºC. Se centrifugó un volumen de suspensión de SRC que contiene el número requerido de células y se resuspendió en solución de gelatina licuada para una etapa de lavado final. Esta suspensión se centrifugó y el sedimento de SRC se resuspendió en suficiente solución de gelatina para lograr una concentración de SRC resultante de $100x10^6$ células/ml en la NKA formulada **(Figura 2D).**

NKA se presenta en una jeringa estéril de 10 ml de un solo uso. El volumen final se calculó a partir de la concentración de $100x10^6$ SRC/ml de NKA y la dosis diana de $3,0x10^6$ SRC/g de peso renal (calculada por MRI).

Ejemplo 15

Carga y Gelificación de NKA

El producto NKA se llenó asépticamente en la jeringa en el envase de NKA en un BSC para procesamiento de tejido y operaciones de cultivo celular **(Figura 2D).** Se realizó un muestreo dinámico del aire durante todo el proceso de carga, fluyendo el muestreo viable y no viable.

La NKA formulada estaba contenida en un tubo de centrifugadora estéril de 50 ml. Una cánula estéril se unió a una jeringa de transferencia de 10 ml. NKA se extrajo de forma manual en la jeringa de transferencia de un tubo de 50 ml mediante la cánula. La cánula se retiró y la jeringa de transferencia se conectó a la conexión Luer-Lock en el extremo del tubo del paquete NKA. NKA se transfirió a la jeringa en el paquete NKA presionando el émbolo en la jeringa de transferencia. Un mínimo de 8,5 ml de producto se transfirió a la jeringa en el paquete NKA. El aire atrapado en la jeringa se retiró invirtiendo la jeringa y presionando lentamente el émbolo. Después de completar el llenado, el tubo del paquete NKA se cerró herméticamente con un sellador RF. El producto restante en la jeringa de transferencia se devolvió al tubo de 50 ml. Se tomaron muestras de control de calidad (prueba de liberación) del tubo de 50 ml. El paquete de NKA se rotó durante un mínimo de 2 horas para mantener las células en suspensión mientras se enfriaba a 2-8 ºC para formar el NKA final gelificado **(Figura 2D).**

Para que la gelación tuviera lugar de manera que las células no se asentaran en la solución de gelatina fue necesario un enfriamiento rápido. La temperatura de la solución de gelatina en una jeringa se controló a la vez que se ponía en condiciones refrigeradas. Se observó una rápida disminución de la temperatura. Después de 1 hora, la temperatura había descendido a 0,3 ºC de la temperatura final 4,4 ºC.

El enfriamiento de la solución de gelatina inicia el proceso de gelificación, pero se requirió una cantidad limitada de tiempo para que el gel formado se estabilizara de manera tal que el SRC permanecerá suspendido en el gel durante el almacenamiento. Las jeringas que contiene NKA formuladas se rotaron durante una noche o durante 1,25 horas y luego se mantuvieron en posición vertical durante una noche. Posteriormente, los contenidos se retiraron y la concentración celular se midió en cuatro segmentos diferentes del producto. El análisis indica que no hubo diferencia entre los cuatro segmentos, por lo tanto, no se produce una sedimentación celular mensurable una vez que NKA ha rotado a temperatura fría durante un mínimo de 1,25 horas (los datos no se muestran).

Ejemplo 16

Empaquetado y transporte de NKA

NKA se empaquetó junto con la documentación apropiada en el transporte de NKA. El transporte está diseñado para mantener un intervalo de temperaturas de 2-8 ºC durante el transporte a la instalación clínica. El producto formulado refrigerado (gelificado) tiene un periodo de duración de 3 días.

Se incluyó un registrador de temperatura con el paquete NKA para monitorizar la temperatura durante el transporte. El grupo de calidad verificó el número de lote de NKA con la ID de paciente única registrada en el libro de registro de envío/recepción. El transporte de NKA Shipper fue enviado a la instalación clínica mediante mensajería o transporte seguro similar.

Ejemplo 17

Implantación de la NKA (población de células SRC)

Este ejemplo demuestra las propiedades degenerativas de las células renales humanas heterogéneas seleccionadas.

Sistema de administración de NKA

El sistema de administración de NKA estaba compuesto por una administración celular compatible con una cánula (aguja) y una jeringa. Diferentes proveedores usan los términos cánula o aguja para describir los productos de administración celular. Para esta descripción, el término cánula y aguja se usan indistintamente. El ensayo clínico propuesto usó el mismo sistema de administración (cánula y jeringa) usado en los estudios con animales adaptados al tamaño y la anatomía del ser humano. Se usó un procedimiento quirúrgico de laparoscopia.

El componente principal del sistema de administración de NKA fue la cánula. Se usó una cánula compatible con NKA.

Implantación de NKA

En la preparación para la implantación, NKA se dejó calentar a temperatura ambiente justo antes de la inyección en el riñón para licuar el producto.

NKA se dirigió para inyección en la corteza del riñón a través de una aguja o cánula y una jeringa compatible con el suministro de células. El uso de una aguja perforadora (cánula) para penetrar la cápsula del riñón permitió la introducción de la aguja / cánula de administración en la corteza del riñón. La jeringa que contiene NKA se unió a la aguja de administración y se inyectó NKA en múltiples sitios en la corteza del riñón. El esquema en la **Figura 7** ilustra el concepto de inyectar NKA en un riñón usando una aguja compatible con la administración y distribución celular en un órgano sólido.

NKA se administró directamente en la corteza renal. La administración de NKA en pacientes usó un procedimiento de laparoscopia convencional.

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar una población heterogénea de células renales adecuada para implantación y/o para provocar una respuesta regenerativa, comprendiendo dicho método las etapas de:

Aislar células de una muestra de riñón de mamífero;
Exponer dichas células aisladas a restos de detección etiquetados, en donde cada resto de detección etiquetado va dirigido a un biomarcador diferente y está etiquetado con una etiqueta diferente, en donde los biomarcadores detectados son GGT-I, una citoqueratina, VEGF y KIM-1; y
Determinar el porcentaje de células que expresan cada uno de dichos biomarcadores diferentes.

2. El método de la reivindicación 1 en el que los biomarcadores detectados además comprenden uno o más biomarcadores adicionales seleccionados entre AQP1, AQP2, AQP4, Calbindina, Calponina, CD117, CD133, CD146, CD24, CD31 (PECAM-1), CD54 (ICAM-I), CD73, CK18, CK19, CK40 a 67, CK7, CKS, CKS, CK18, CK19, combinaciones de CK8, CK18 y CK19, Conexina 43, Cubilina, CXCR4 (Fusina), DBA, E-cadherina (CD324), EPO (eritropoyeitina), GLEPPI (proteína 1 epitelial glomerular), Haptoglobulina, Itgb1 (Integrina β1), MAP-2 (proteína 2 asociada a microtúbulos), Megalina, N-cadherina, Nefrina, NKCC (cotransportadores de Na-K-Cl), OAT-1 (transportador 1 de aniones orgánicos), Osteopontina, Pan-cadherina, PCLP1 (molécula 1 similar a podocalixina), Podocina, SMA (alfa-actina del músculo liso), Sinaptopodina, THP (proteína tamm-horsfall), Vimentina, αGST-1 (alfa glutatión S-transferasa) y combinaciones de los mismos.

3. El método de la reivindicación 1 en el que el resto de detección etiquetado es un anticuerpo.

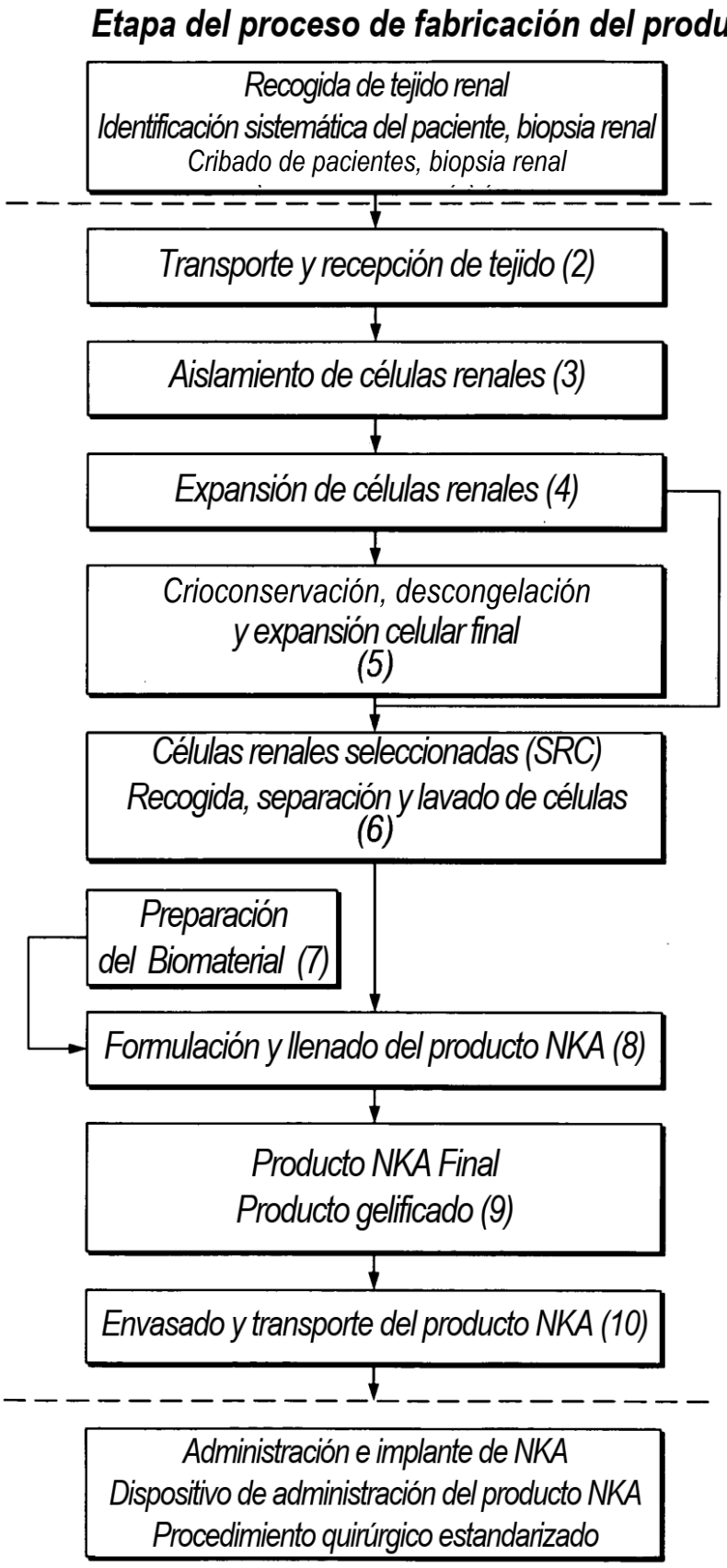
Etapa del proceso de fabricación del producto NKA
Recogida de tejido renal
Identificación sistemática del paciente, biopsia renal
Cribado de pacientes, biopsia renal
Transporte y recepción de tejido (2)
Aislamiento de células renales (3)
Expansión de células renales (4)
Crioconservación, descongelación y expansión celular final (5)
Células renales seleccionadas (SRC)
Recogida, separación y lavado de células (6)
Preparación del Biomaterial (7)
Formulación y llenado del producto NKA (8)
Producto NKA Final
Producto gelificado (9)
Envasado y transporte del producto NKA (10)
Administración e implante de NKA
Dispositivo de administración del producto NKA
Procedimiento quirúrgico estandarizado

FIG. 1

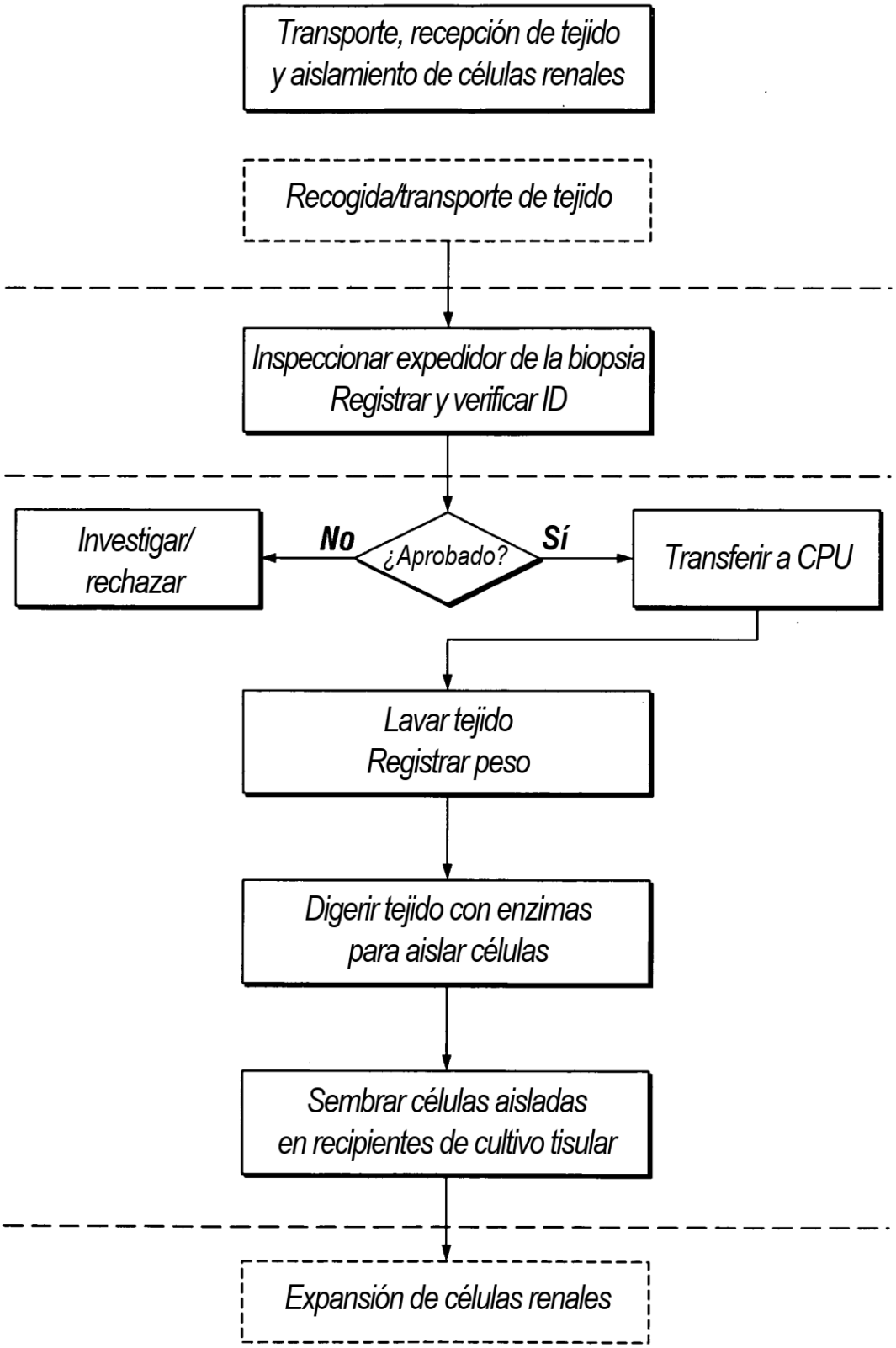
Transporte, recepción de tejido y aislamiento de células renales
Recogida/transporte de tejido
Inspeccionar expedidor de la biopsia
Registrar y verificar ID
Investigar/ rechazar
No
¿Aprobado?
Sí
Transferir a CPU
Lavar tejido
Registrar peso
Digerir tejido con enzimas para aislar células
Sembrar células aisladas en recipientes de cultivo tisular
Expansión de células renales

FIG. 2A

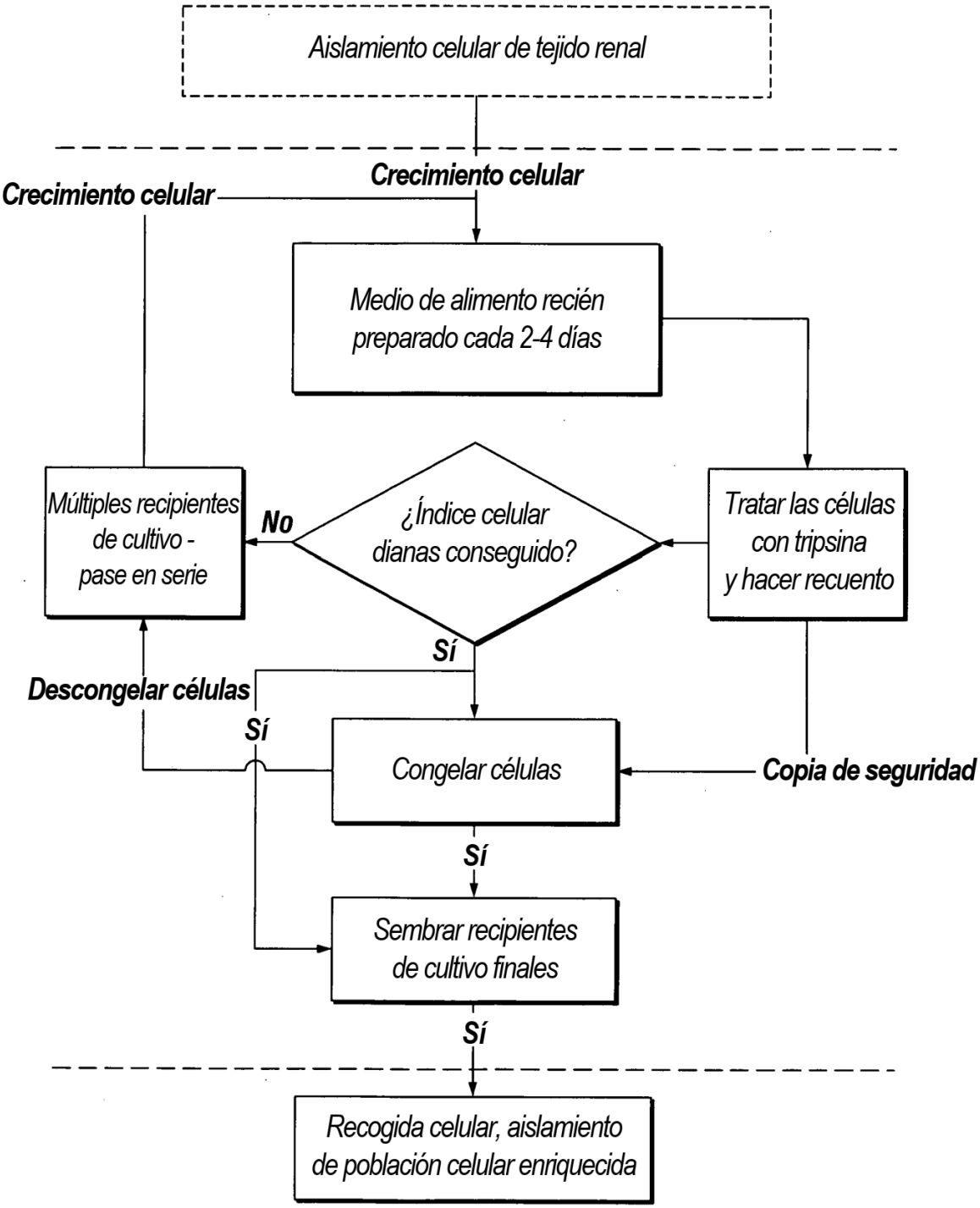
Aislamiento celular de tejido renal
Crecimiento celular
Crecimiento celular
Medio de alimento recién preparado cada 2-4 días
Múltiples recipientes de cultivo - pase en serie
No
¿Índice celular dianas conseguido?
Tratar las células con tripsina y hacer recuento
Sí
Descongelar células
Sí
Congelar células
Copia de seguridad
Sí
Sembrar recipientes de cultivo finales
Sí
Recogida celular, aislamiento de población celular enriquecida

FIG. 2B

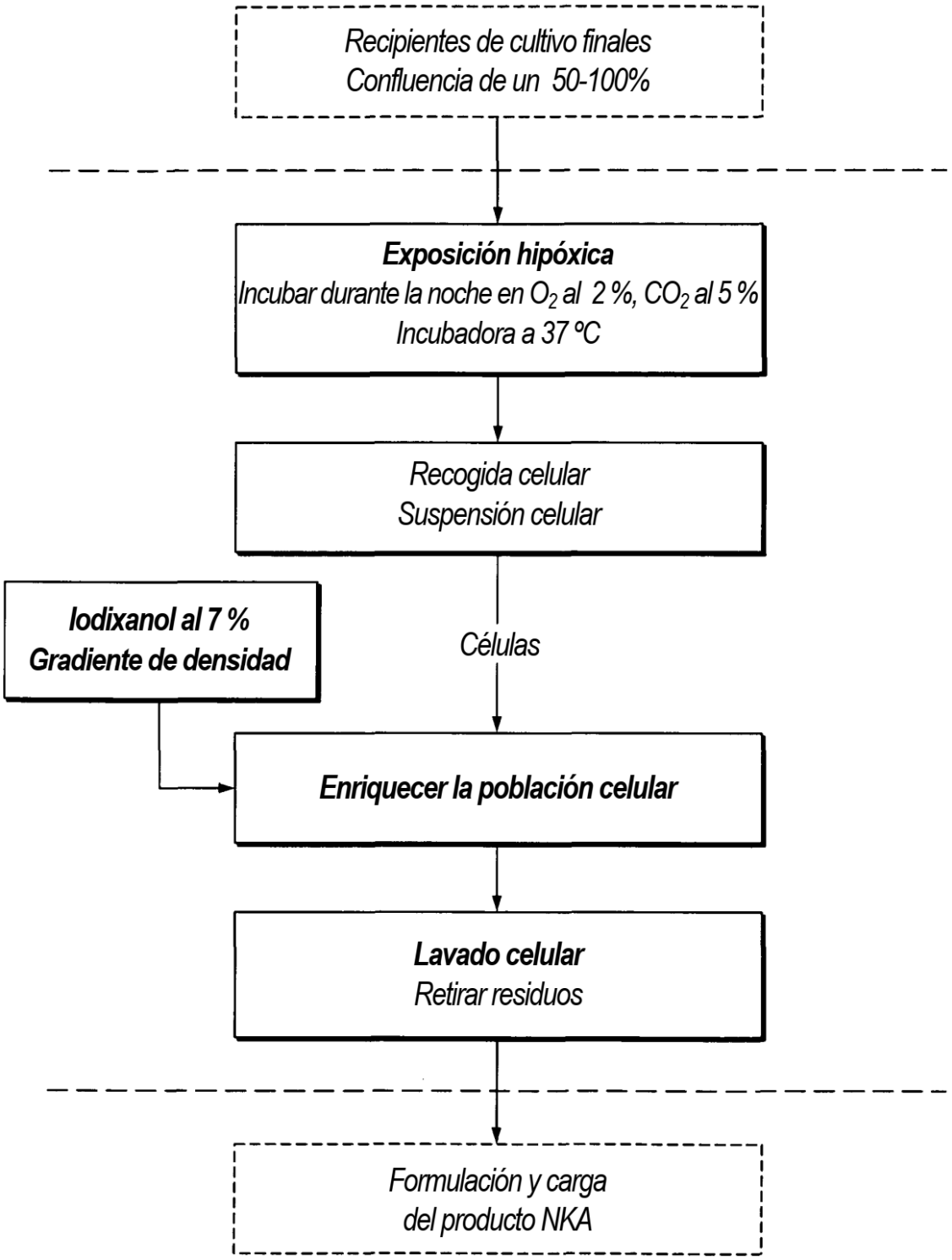
Recipientes de cultivo finales
Confluencia de un 50-100%
Exposición hipóxica
Incubar durante la noche en O_2 al 2 %, CO_2 al 5 %
Incubadora a 37 ºC
Recogida celular
Suspensión celular
Iodixanol al 7 %
Gradiente de densidad
Células
Enriquecer la población celular
Lavado celular
Retirar residuos
Formulación y carga
del producto NKA

FIG. 2C

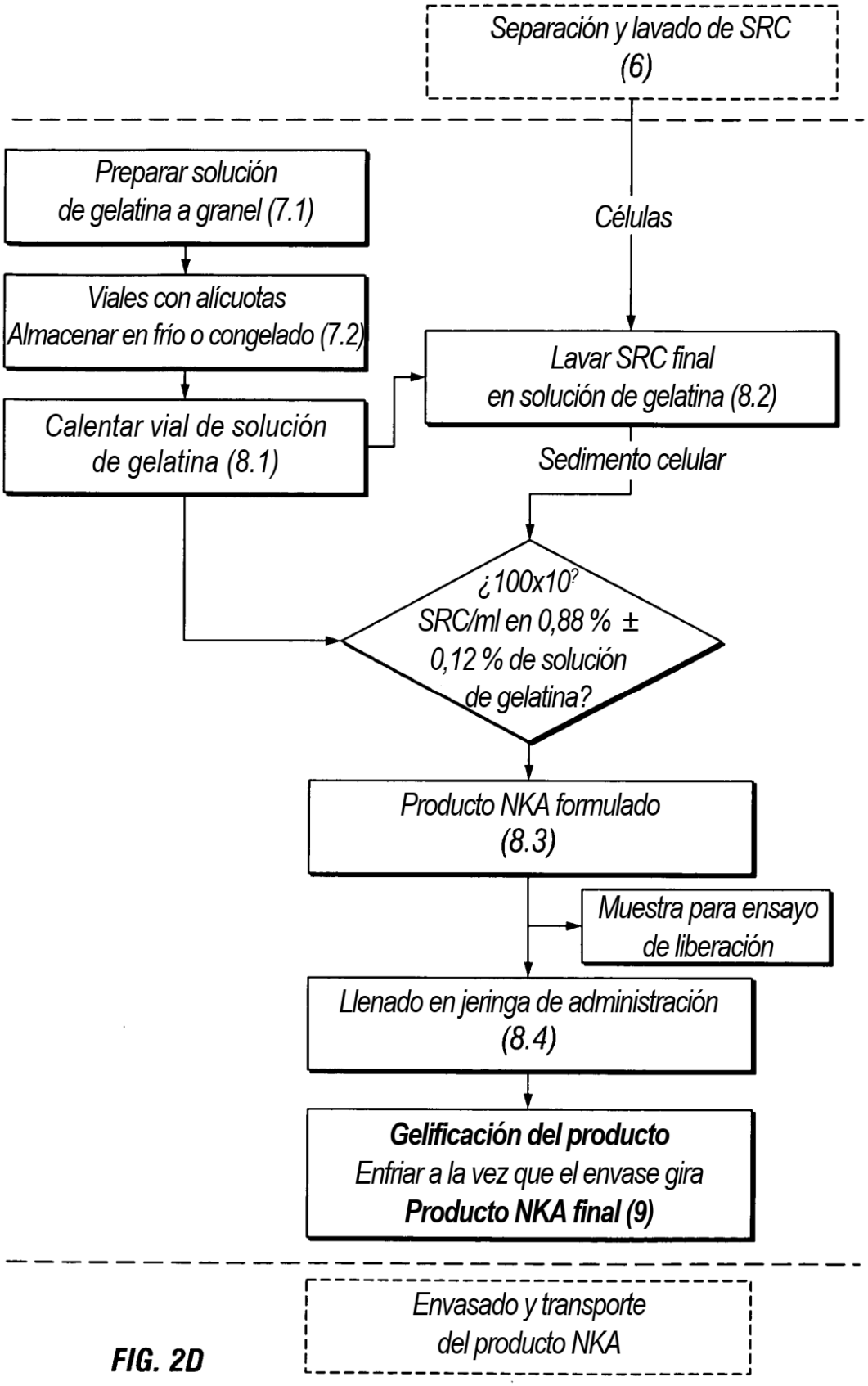
Separación y lavado de SRC
(6)
Preparar solución
de gelatina a granel (7.1)
Células
Viales con alícuotas
Almacenar en frío o congelado (7.2)
Lavar SRC final
en solución de gelatina (8.2)
Calentar vial de solución
de gelatina (8.1)
Sedimento celular
¿100x10⁷
SRC/ml en 0,88 % ±
0,12 % de solución
de gelatina?
Producto NKA formulado
(8.3)
Muestra para ensayo
de liberación
Llenado en jeringa de administración
(8.4)
Gelificación del producto
Enfriar a la vez que el envase gira
Producto NKA final (9)
Envasado y transporte
del producto NKA

FIG. 2D

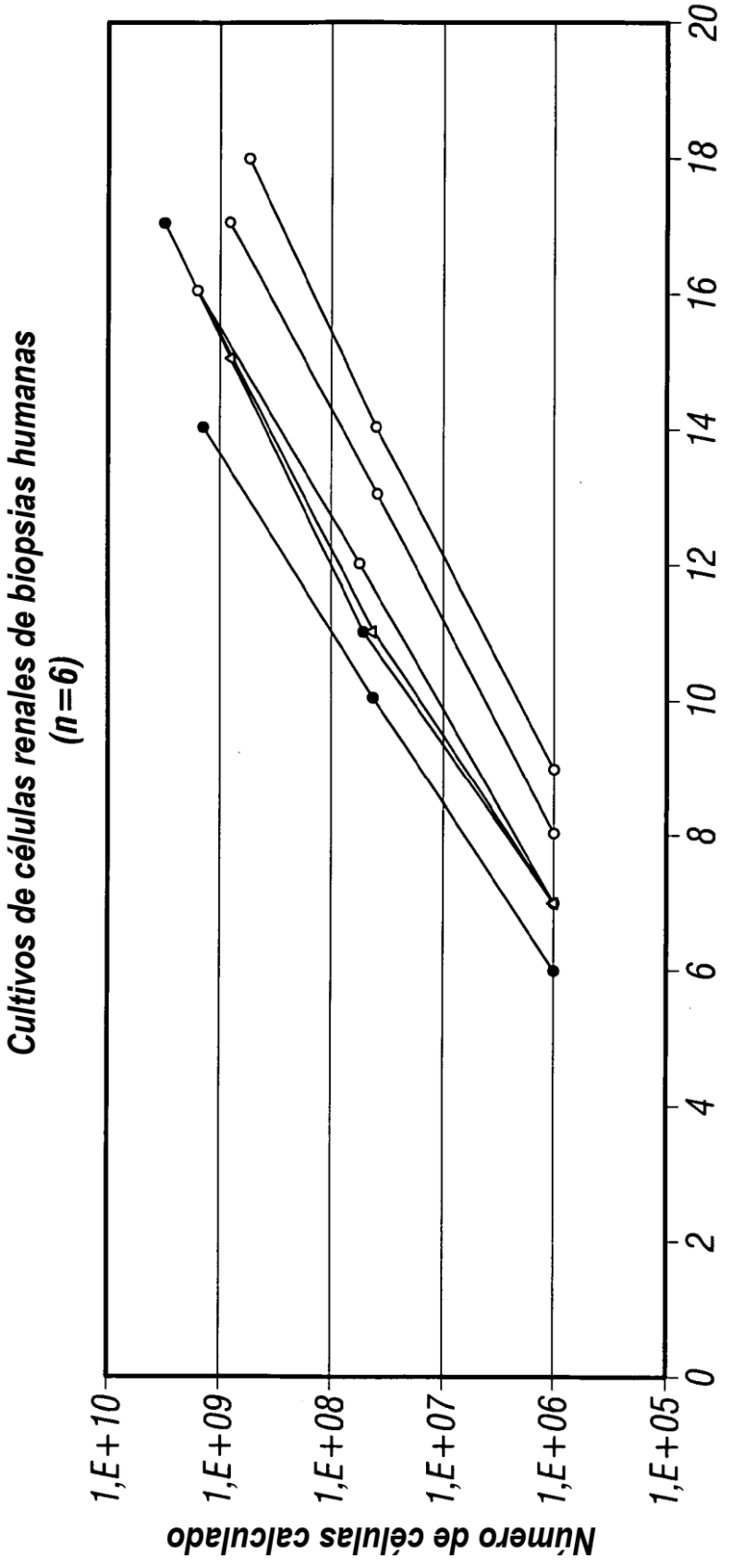
Cultivos de células renales de biopsias humanas
(n=6)
Número de células calculado
1,E+10
1,E+09
1,E+08
1,E+07
1,E+06
1,E+05
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
Días en cultivo

FIG. 3

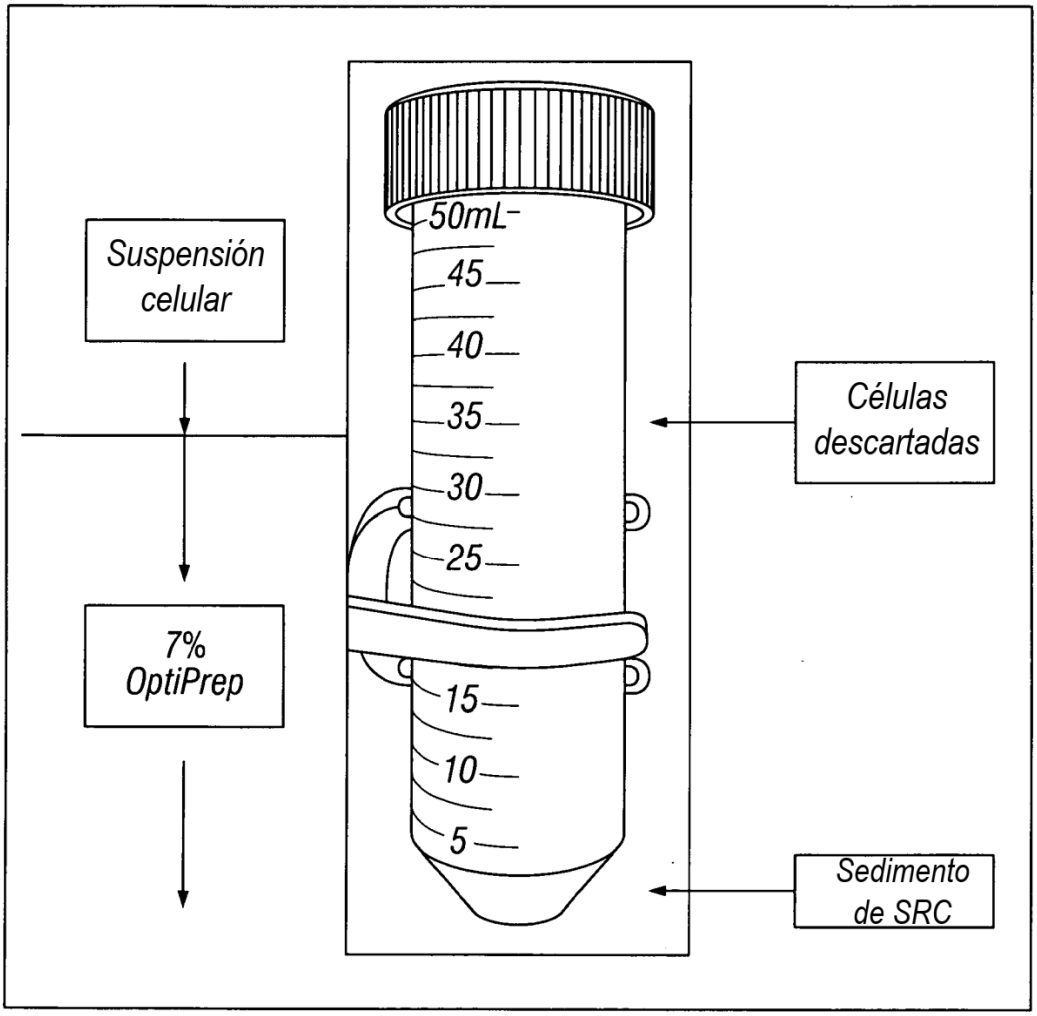
Suspensión celular
7% OptiPrep
50mL
45
40
35
30
25
15
10
5
Células descartadas
Sedimento de SRC

FIG. 4

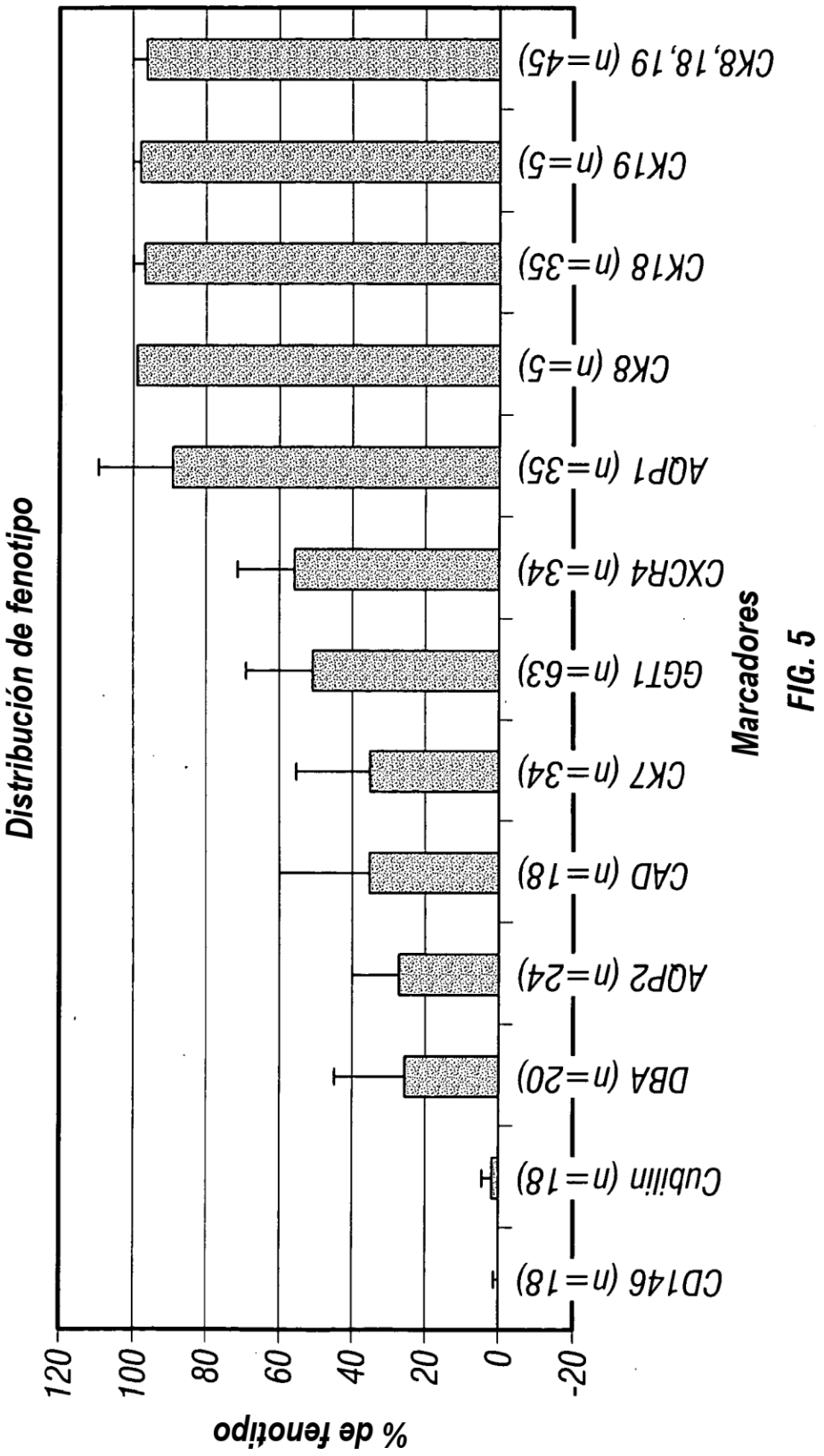
Distribución de fenotipo
% de fenotipo
120
100
80
60
40
20
0
-20
CD146 (n=18)
Cubilin (n=18)
DBA (n=20)
AQP2 (n=24)
CAD (n=18)
CK7 (n=34)
GGT1 (n=63)
CXCR4 (n=34)
AQP1 (n=35)
CK8 (n=5)
CK18 (n=35)
CK19 (n=5)
CK8, 18, 19 (n=45)
Marcadores

FIG. 5

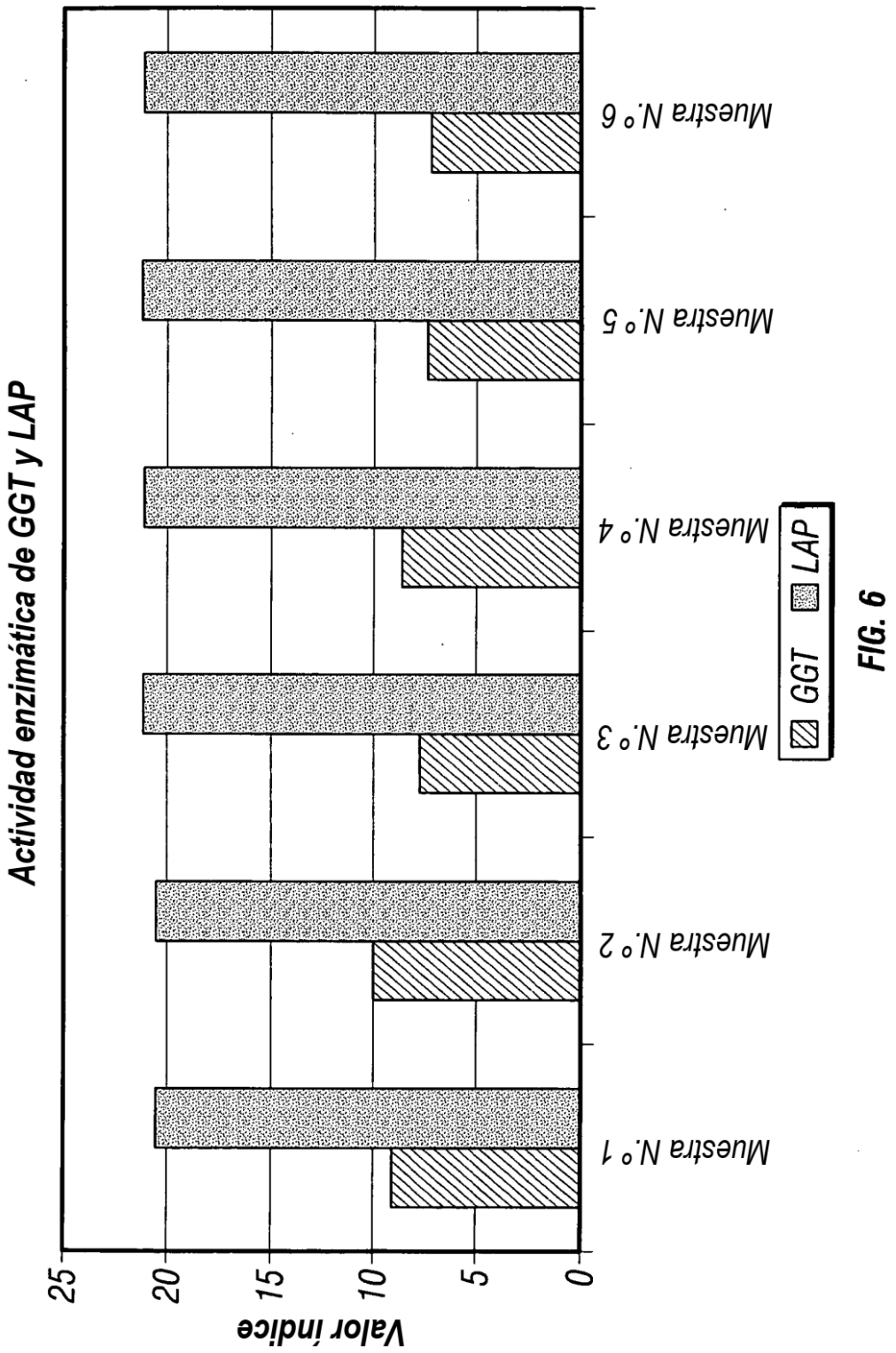
Actividad enzimática de GGT y LAP
Valor índice
0
5
10
15
20
25
Muestra N.º 1
Muestra N.º 2
Muestra N.º 3
Muestra N.º 4
Muestra N.º 5
Muestra N.º 6
GGT
LAP

FIG. 6

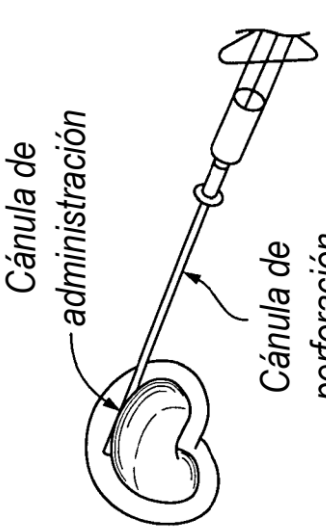

FIG. 7A

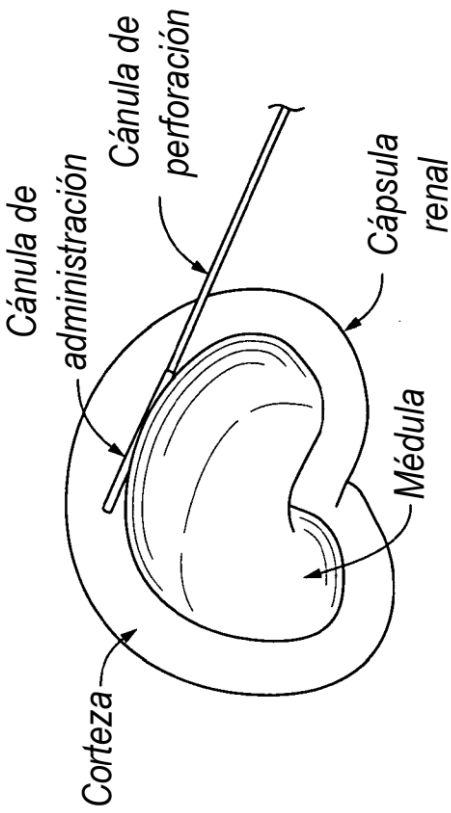

FIG. 7B

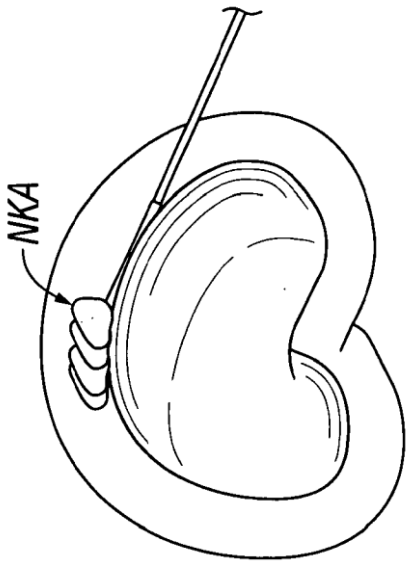

FIG. 7C

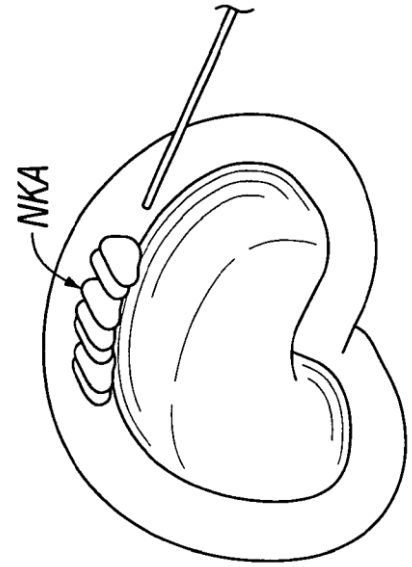

FIG. 7D