

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 523**

51 Int. Cl.:

A61K 35/12 (2006.01)

A61K 35/39 (2006.01)

A61K 35/407 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2004 E 10154555 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2013 EP 2216033**

54 Título: **Procedimientos de tratamiento de enfermedad por trasplante de órganos o tejidos alógenos o xenógenos**

30 Prioridad:

06.03.2003 US 379725

20.01.2004 US 759033

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

03.03.2014

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
(100.0%)
THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE P.O.
BOX 95
76100 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:

**REISNER, YAIR y
DEKEL, BENJAMIN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 445 523 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos de tratamiento de enfermedad por trasplante de órganos o tejidos alógenos o xenógenos

5 La presente invención se refiere a un injerto de órgano o tejido pancreático porcino de edad gestacional para su uso en el tratamiento de un trastorno pancreático asociado a una fisiología o morfología patológica de órgano o tejido según la reivindicación 1.

10 Se desvelan procedimientos de tratamiento de enfermedades por trasplante de órganos/tejidos no singénicos en desarrollo. Más particularmente, lo desvelado se refiere a procedimientos de tratamiento de enfermedad mediante trasplante de órganos/tejidos porcinos de 20 a 42 días de edad gestacional, respectivamente.

15 El trasplante de órganos/tejidos completamente diferenciados es un procedimiento médico de elección a vida o muerte ampliamente practicado para el tratamiento de numerosas enfermedades altamente debilitantes o letales, que incluyen enfermedades de riñón, corazón, páncreas, pulmón, hematológicas, genéticas y de hígado. Por ejemplo, el número de trasplantes de riñón humano ha aumentado rápidamente en los últimos años, pero la demanda supera enormemente a la disponibilidad de órganos. En el caso de insuficiencia renal, la hemodiálisis permanente puede usarse para prolongar la vida; sin embargo, esto es un procedimiento altamente debilitante, incómodo y caro con eficacia limitada que conlleva un riesgo significativo de infección oportunista. En el caso de diabetes, una enfermedad de enorme impacto médico y económico, la inyección diaria de insulina, la terapia convencional de la técnica anterior, no previene satisfactoriamente las consecuencias debilitantes o letales de esta enfermedad. En el mundo, la diabetes se produce en casi el 5 por ciento de la población que oscila en edad de 20 a 79 años, y de ahí que afecte a 150 millones de personas. En los Estados Unidos solo, un cálculo estimado de 17 millones de personas - más del 6 por ciento de la población - tienen diabetes mellitus, y cada año aproximadamente 25 1 millón de estadounidenses de 20 años de edad o más son diagnosticados con la enfermedad. En 1999 se produjeron aproximadamente 450.000 muertes entre adultos con diabetes en los Estados Unidos. La enfermedad cardíaca es la causa predominante de discapacidad y muerte en todas las naciones industrializadas y, además, la incidencia de insuficiencia cardíaca está aumentando en los Estados Unidos, falleciendo más de medio millón de estadounidenses de esta enfermedad al año (Braunwald E., 1997. N Eng J Med. 337:1360; Eriksson H., 1995. J Inter Med. 237:135). Además, en los Estados Unidos, la enfermedad cardíaca representa aproximadamente 335 muertes por cada 100.000 individuos (aproximadamente el 40 % de la mortalidad total), haciendo sombra al cáncer, que sigue con 183 muertes por cada 100.000 individuos. La lesión hepática se produce en varios estados clínicos agudos y crónicos, que incluye hepatotoxicidad inducida por fármacos, infecciones virales, lesión vascular, enfermedad autoinmunitaria y traumatismo cerrado. Además, los pacientes sujetos a metabolopatía congénita 35 pueden estar en riesgo de desarrollar lesión hepática. Los síntomas de lesión hepática que se producen como resultado de estos estados clínicos incluyen, por ejemplo, insuficiencia hepática fulminante con colestasia, lesiones hepáticas y necrosis de tejido hepático, y en muchos casos, la restauración de la función hepática normal es vital para la supervivencia de los pacientes.

40 El trasplante terapéutico en seres humanos normalmente se realiza trasplantando órganos/tejidos completamente diferenciados entre donantes y receptores alógenos adecuadamente del mismo haplotipo. Sin embargo, una modalidad de tratamiento tal sufre considerables desventajas. El trasplante alógeno de órganos/tejidos diferenciados es imposible de implementar en un gran número de casos debido a la falta de disponibilidad de donantes de trasplante inmunológicamente y morfológicamente coincidentes que sean adecuados. Además, el uso de donantes 45 humanos para proporcionar órganos/tejidos para trasplante requiere someter a los donantes vivos a cirugía mayor, por ejemplo, en el caso de trasplante de riñón. Alternativamente, el uso de órganos/tejidos cadavéricos también presenta frecuentemente dilemas éticos. En el caso de diabetes, se ha mostrado que el trasplante de islotes pancreáticos de donantes cadavéricos adultos es técnicamente factible; sin embargo, este enfoque no puede practicarse rutinariamente debido a los insuficientes números de páncreas de donantes alógenos 50 inmunológicamente coincidentes de los que aislar los números suficientes de islotes requeridos.

Así, grandes números de pacientes que de otro modo se beneficiarían del trasplante terapéutico fallecen de enfermedades asociadas a insuficiencia renal, cardíaca, hepática, pancreática, pulmonar o hematológica mientras que esperan donantes de trasplante coincidentes. Además, incluso cuando se encuentran donantes de trasplante 55 adecuadamente del mismo haplotipo, tratamientos inmunodepresores permanentes y perjudiciales, tales como la administración diaria de fármacos tóxicos tales como ciclosporina A, son generalmente requeridos para prevenir el rechazo del injerto. El uso de fármacos tales como ciclosporina A es altamente no deseable ya que ésta produce graves efectos secundarios tales como carcinogenicidad, nefrototoxicidad y elevada susceptibilidad a infecciones oportunistas. Tales tratamientos inmunodepresores contribuyen a los inconvenientes del trasplante alógeno, ya que éstos son frecuentemente insatisfactorios en prevenir el rechazo a corto plazo, y son generalmente incapaces de prevenir indefinidamente el rechazo a largo plazo. El rechazo agudo de injertos cardíacos o hepáticos es frecuentemente mortal. En el caso de trasplante de riñón, la incapacidad de las actuales pautas inmunodepresoras para prevenir el rechazo agudo del injerto frecuentemente necesita intervención quirúrgica de urgencia para extraer el injerto, seguido de la necesidad de estar en diálisis renal pendiente de disponibilidad de otro órgano compatible 65 para trasplante.

Una alternativa al trasplante de aloinjerto que se ha propuesto implica el trasplante de xenoinjerto, es decir, trasplantes de injerto derivados de animal, en particular injertos porcinos, que están bien establecidos como la posible alternativa animal de elección a los injertos humanos. Las grandes ventajas del uso de xenoinjertos para trasplante sería su disponibilidad a petición de todos los pacientes en necesidad de trasplante, además de evitar la carga médica y ética de recoger injertos de donantes humanos vivos o cadavéricos. Sin embargo, hasta la fecha, los injertos de órgano/tejido xenógenos se han descartado para trasplante humano debido a su incompatibilidad inmunológica insuperable hasta la fecha con receptores humanos.

Así, la capacidad para generar órganos/tejidos, tales como órganos/tejidos pancreáticos, renales, hepáticos, cardíacos o linfoides, adecuados para el trasplante terapéutico en cantidades suficientes y óptimamente tolerados en seres humanos inmunocompetentes sin o con inmunodepresión mínima es un objetivo altamente deseado. Una estrategia que se ha propuesto para satisfacer este objetivo implica usar órganos/tejidos en edades de desarrollo tempranas para el trasplante. Un enfoque tal es prometedor, ya que se ha mostrado que la tolerancia inmunológica a injertos derivados de tejido en desarrollo es mejor que la tolerancia a injertos derivados de tejidos en edad adulta (Dekel B. y col., 1997. *Transplantation* 64, 1550; Dekel B. y col., 1997. *Transplantation* 64, 1541; Dekel B. y col., 1999. *Int Immunol.* 11, 1673; Hammerman MR., 2000. *Pediatr Nephrol.* 14, 513). Además, el potenciado potencial de crecimiento y diferenciación de órganos/tejidos en desarrollo es altamente deseable para generar injertos integrados en huésped óptimamente funcionales. Por ejemplo, se mostró que injertos derivados de tejido renal humano en desarrollo mostraban apoptosis y destrucción de tejido reducidas, además de una fase de crecimiento sostenida (Dekel B. y col., 1997. *Transplantation* 64, 550; Dekel B. y col., 2000. *Transplantation* 69, 1470). En el riñón humano en desarrollo, citoblastos frescos son inducidos en la ruta nefrogénica para formar nefronas hasta las 34 semanas de gestación. Tal ruta de diferenciación nefrogénica implica invasión de una región especializada de mesodermo intermedio por una fuente epitelial (yema ureteral), que crece y se ramifica para formar un sistema de túbulos colectores, e induce citoblastos mesenquimatosos metanefríticos desorganizados a agruparse y diferenciarse en nefronas [Woolf, A.S. en: *Pediatric Nephrology*, 4ª ed. Barratt, T.M., Avner, A. y Harmon, W. (eds.), Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland. pág. 1-19 (1999)]. Así, los trasplantes de tejido renal de edad gestacional pueden ser una posible fuente de células renales en regeneración, y una solución prometedora para la actual falta de órganos para trasplante de riñón. En el caso de tejidos pancreáticos, células de los islotes pancreáticas, tales como células beta productoras de insulina, muestran potenciado crecimiento y diferenciación celular con respecto a células beta de islotes diferenciadas. Por ejemplo, se ha mostrado que islotes fetales humanos que incluyen las células secretoras de insulina más tempranas, trasplantadas en ratones sin pelo y ratas, que son huéspedes inmunodeficientes, muestran crecimiento y desarrollo continuado, que incluye producción de las otras hormonas pancreáticas; glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático (Usadel y col., 1980. *Diabetes* 29 Suppl 1:74-9). Similarmente, se ha mostrado que injertos derivados de páncreas embrionario humano trasplantados en ratones NOD/SCID, que también son huéspedes inmunodeficientes, generaron células beta humanas productoras de insulina derivadas de injerto (Castaing M. y col., 2001. *Diabetologia* 44:2066). También se ha mostrado que los trasplantes de islotes porcinos de edad gestacional en ratones pueden mostrar un programa de diferenciación similar, con desarrollo cronológico similar, al de los tejidos no trasplantados normales.

Se han sugerido diversos mecanismos para explicar la reducida inmunogenicidad de injertos de tejido en desarrollo. Se ha sugerido que tales injertos derivados de tejido en desarrollo inducen respuestas inmunitarias anti-injerto del huésped atenuadas en comparación con injertos derivados de tejido de edad adulta debido a que los primeros están predominantemente vascularizados por vasculatura derivada del huésped, a diferencia de la vascularización del injerto derivado predominantemente de injerto observada en los últimos (Hyink D. P. y col., 1996. *Am J Physiol.* 270, F886). Se ha sugerido adicionalmente que los bajos niveles de expresión de histocompatibilidad mayor (MHC) y de molécula de adhesión, y de células presentadoras de antígeno en injertos de tejido de edad gestacional, disminuyen la capacidad de tales injertos para activar respuestas inmunitarias del huésped.

Sin embargo, los enfoques que implican la utilización de órganos/tejidos humanos en desarrollo son dificultados por los obstáculos prácticos y éticos implicados en la obtención de suficientes números de embriones/fetos humanos, además de los problemas éticos implicados en el uso de tejido embrionario humano. Para sortear tales obstáculos se ha sugerido el uso de órganos/tejidos en desarrollo derivados de animal, en particular órganos/tejidos en desarrollo porcinos (Auchincloss, H. y Sachs, D.H., 1998. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 433-470; Hammerman, M.R., 2002. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 11, 11-16).

En la técnica anterior se han intentado diversos enfoques para utilizar trasplante de órganos/tejidos no singénicos en desarrollo para el tratamiento de enfermedades.

Un enfoque implica trasplantar riñones de edad gestacional en receptores no inmunodeprimidos alógenos en intentos por generar órganos renales inmunológicamente tolerados funcionales derivados de injerto en tales receptores, como se muestra usando trasplantes de injerto de ratas de 15 días embrionarias bajo la cápsula renal o en el omento de huéspedes de rata adulta no inmunodeprimidos, sin (Rogers, S.A. y col., 1998. *Kidney Int.* 54, 27-37; Rogers, S.A. y col., 2001. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280, R132-136) o con (Rogers, S.A. y Hammerman, M.R., 2001. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281, R661-665) preservación *in vitro* previa de injertos.

Otro enfoque implica trasplantar riñones de edad gestacional en receptores xenógenos tratados con bloqueo por CTLA4-Ig de la coestimulación en intentos por generar órganos renales inmunológicamente tolerados funcionales derivados de injerto en tales receptores, como se muestra usando trasplantes de injerto de ratas de 15 días embrionarias en huéspedes de ratón (Rogers, S.A. y Hammerman, M.R., 2001. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280, R1865-1869).

Todavía otro enfoque implica trasplantar tejido renal de edad gestacional en receptores xenógenos inmunodeficientes reconstituidos con CMSP humanas en intentos por generar órganos renales derivados de injerto inmunológicamente tolerados funcionales en tales huéspedes, como se muestra por el trasplante de tejido humano de 12 a 22 semanas de edad gestacional en ratas quiméricas SCID/Lewis y SCID/desnudas (Dekel B. y col., 1997. *Transplantation* 64, 1550), y trasplante de órganos/tejidos de 70 días de edad gestacional en ratones NOD/SCID (Dekel B. y col., 2001. *J Am Soc Nephrol.* 13, 977-90; Dekel B. y col., 2000. *Transplantation* 69, 1470).

Todavía otro enfoque implica trasplantar injertos pancreáticos de edad gestacional cultivados en receptores inmunodeficientes xenógenos en intentos por generar células y tejidos pancreáticos derivados de injerto inmunológicamente tolerados funcionales en tales receptores, como se ha intentado por el trasplante de células de los islotes porcinos de edad gestacional en ratones sin pelo (Otonkoski T. y col., 1999. *Transplantation* 68, 1674), de islotes fetales humanos en ratones y ratas sin pelo (Usadel y col., 1980. *Diabetes* 29 Suppl 1:74-9) y de páncreas embrionarios humanos en ratones NOD/SCID (Castaing M. y col., 2001. *Diabetologia* 44:2066).

Otro enfoque implica trasplantar agrupaciones de células de los islotes fetales porcinos intraportalmente o bajo la cápsula renal en receptores humanos diabéticos en intentos por tratar diabetes en tales receptores (Groth CG. y col., 1999. *J Mol Med.* 77,153).

Todavía otro enfoque implica trasplante estriatal de tejido mesencefálico ventral fetal alógeno en receptores humanos con enfermedad de Parkinson en intentos por tratar esta enfermedad (Subramanian, T., 2001. *Semin Neurol.* 21, 103; Schumacher JM. y col., 2000. *Neurology* 54, 1042).

Sin embargo, todos los enfoques de la técnica anterior que implican trasplante de tejidos no singénicos en desarrollo sufren algunos o todos los siguientes inconvenientes: (i) tolerancia insuficiente por linfocitos humanos alógenos/xenógenos; (ii) diferenciación estructural y funcional insuficiente, por ejemplo, con respecto a la producción de orina por injertos renales, o producción de insulina por injertos pancreáticos; (iii) vascularización derivada predominantemente del injerto, a diferencia de derivada del huésped; (iv) crecimiento insuficiente; (v) disponibilidad inadecuada de órganos/tejidos trasplantables; y/o (vi) seguridad insuficiente para administración humana, en particular con respecto a prevenir la generación de teratomas derivados del injerto.

Así, todos los enfoques de la técnica anterior han fracasado en proporcionar una solución adecuada para usar trasplante de órganos/tejidos no singénicos en desarrollo para tratar enfermedades humanas susceptibles a trasplante terapéutico.

Así, hay una necesidad ampliamente reconocida de, y sería altamente ventajoso tener, un procedimiento de tratamiento de enfermedades humanas susceptibles a trasplante terapéutico por trasplante de órganos/tejidos en desarrollo y/o no singénicos que carecen de la limitación anterior. El injerto de órgano o tejido pancreático porcino de edad gestacional para su uso en el tratamiento de un trastorno pancreático asociado a una fisiología o morfología patológica de órgano o tejido de la presente invención se define en la reivindicación 1.

Según un aspecto se proporciona un procedimiento de tratamiento de un trastorno asociado a fisiología o morfología patológica de órgano o tejido, comprendiendo el procedimiento trasplantar a un sujeto en necesidad del mismo un injerto de órgano o tejido de mamífero terapéuticamente eficaz, no expresando sustancialmente o presentando el injerto de órgano o tejido seleccionado al menos una molécula que pueda estimular o potenciar una respuesta inmunitaria en el sujeto, tratando así el trastorno en el sujeto.

Según características adicionales en realizaciones preferidas descritas más adelante, el injerto de órgano o tejido es un injerto de órgano o tejido porcino.

Según todavía otro aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de tratamiento de un trastorno asociado a fisiología o morfología patológica de órgano o tejido, comprendiendo el procedimiento trasplantar a un sujeto en necesidad del mismo un injerto de órgano o tejido porcino terapéuticamente eficaz, seleccionado el injerto de órgano o tejido porcino a una edad de diferenciación correspondiente a 20 a 63 días de gestación, tratando así el trastorno en el sujeto.

Según características adicionales en realizaciones preferidas de la invención descritas más adelante, la edad de diferenciación se corresponde con 20 a 56 días de gestación.

Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, la edad de diferenciación se corresponde con 20 a 42 días de gestación.

Según otro aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de evaluación de la idoneidad de un injerto para trasplante en un sujeto, comprendiendo el procedimiento probar el injerto para la expresión o presentación de al menos una molécula que pueda estimular o potenciar una respuesta inmunitaria en el sujeto, evaluándose así la idoneidad del injerto para trasplante en el sujeto.

5 Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, el injerto de mamífero es un injerto porcino.

10 Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, la prueba se efectúa mediante análisis por RT-PCR del injerto.

15 Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, el procedimiento de tratamiento del trastorno comprende además tratar el sujeto con una pauta inmunodepresora antes de, concomitantemente con o tras trasplantar el injerto de órgano o tejido en el sujeto, promovándose así el injerto en el órgano o tejido en el sujeto.

Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, el tratamiento del sujeto con una pauta inmunodepresora se efectúa administrando un fármaco inmunodepresor al sujeto.

20 Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, el fármaco inmunodepresor puede bloquear la unión de un co-receptor de linfocitos con un ligando del co-receptor de linfocitos.

Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, el fármaco inmunodepresor es CTLA4-Ig.

25 Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, la administración de un fármaco inmunodepresor al sujeto se efectúa durante un único periodo de tiempo seleccionado de un intervalo de 1 a 20 días.

30 Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, la al menos una molécula que puede estimular o potenciar una respuesta inmunitaria en el sujeto es un co-receptor de linfocitos o ligando de co-receptor de linfocitos.

Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, el co-receptor de linfocitos o ligando de co-receptor de linfocitos está seleccionado del grupo que consiste en B7-1, CD40 y CD40L.

35 Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, la selección del injerto de órgano o tejido se efectúa mediante análisis por RT-PCR del injerto de órgano o tejido.

40 Según otras características más de la divulgación, el injerto de órgano o tejido es un injerto de órgano o tejido renal, y el trasplante del injerto de órgano o tejido en el sujeto se efectúa trasplantando el injerto de órgano o tejido en una localización anatómica del sujeto seleccionada del grupo que consiste en la cápsula renal, el riñón, la vena porta, el hígado, el bazo, la grasa testicular, la hipodermis, el omento y el espacio intrabdominal.

45 Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, el injerto de órgano o tejido es un injerto de órgano o tejido pancreático, y el trasplante del injerto de órgano o tejido en el sujeto se efectúa trasplantando el injerto de órgano o tejido en una localización anatómica del sujeto seleccionada del grupo que consiste en la vena porta, el hígado, el páncreas, la cápsula renal, la grasa testicular, la hipodermis, el omento y el espacio intrabdominal.

50 Según otras características más de la divulgación, el injerto de órgano o tejido es un injerto de órgano o tejido hepático, y el trasplante del injerto de órgano o tejido en el sujeto se efectúa trasplantando el injerto de órgano o tejido en una localización anatómica del sujeto seleccionada del grupo que consiste en la vena porta, el hígado, la cápsula renal, la grasa testicular, la hipodermis, el omento, el bazo y el espacio intrabdominal.

55 Según otras características más de la divulgación, el injerto de órgano o tejido es un injerto de órgano o tejido cardíaco, y el trasplante del injerto de órgano o tejido en el sujeto se efectúa trasplantando el injerto de órgano o tejido en una localización anatómica del sujeto seleccionada del grupo que consiste en la cavidad del corazón, el corazón, el miocardio y el espacio intrabdominal.

60 Según otras características más de la divulgación, el injerto de órgano o tejido es un injerto de órgano o tejido linfóide, y el trasplante del injerto de órgano o tejido en el sujeto se efectúa trasplantando el injerto de órgano o tejido en una localización anatómica del sujeto seleccionada del grupo que consiste en la vena porta, el hígado, la cápsula renal, la hipodermis, el omento y el espacio intrabdominal.

65 Según otras características más de la divulgación, el trastorno es un trastorno renal, y el injerto de órgano o tejido es un injerto de órgano o tejido renal.

Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, el trastorno es un trastorno pancreático, y

el injerto de órgano o tejido es un injerto de órgano o tejido pancreático.

Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, el trastorno pancreático es diabetes, y el injerto de órgano o tejido pancreático es un injerto de órgano o tejido de islote pancreático.

5 Según otras características más de la divulgación, el trastorno es un trastorno hepático y/o trastorno metabólico, y el injerto de órgano o tejido es un injerto de órgano o tejido hepático.

10 Según otras características más de la divulgación, el trastorno es un trastorno cardíaco, y el injerto de órgano o tejido es un injerto de órgano o tejido cardíaco.

Según otras características más de la divulgación, el trastorno es un trastorno hematológico y/o genético, y el injerto de órgano o tejido es un injerto de órgano o tejido linfoide.

15 Según otras características más de la divulgación, el injerto de órgano o tejido linfoide está seleccionado del grupo que consiste en un injerto esplénico, un injerto derivado de ganglio linfático, un injerto derivado de placa de Peyer, un injerto tímico y un injerto derivado de médula ósea.

Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, el sujeto es un mamífero.

20 Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, el mamífero es un ser humano.

Según todavía otro aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de evaluación de la edad de diferenciación de un órgano o tejido de mamífero más adecuada para trasplante del mismo en un sujeto mamífero, comprendiendo el procedimiento la evaluación de un trasplante de prueba tomado del órgano o tejido a una edad específica de diferenciación para la presencia de al menos una molécula que pueda estimular o potenciar una respuesta inmunitaria en el sujeto antes de y/o tras un trasplante de prueba del trasplante de prueba en un receptor de prueba mamífero, en el que una ausencia eficaz de la al menos una molécula en el trasplante de prueba antes de y/o tras el trasplante de prueba indica que la edad específica de diferenciación es adecuada para el trasplante del órgano o tejido en el sujeto.

25 Según características adicionales en realizaciones preferidas de la invención descritas más adelante, el procedimiento de evaluación de la etapa de desarrollo de un órgano o tejido más adecuada para el trasplante del mismo en un sujeto comprende además la evaluación del trasplante de prueba para la presencia de la al menos una molécula que puede estimular o potenciar una respuesta inmunitaria en el sujeto antes del trasplante de prueba.

Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, la evaluación del trasplante de prueba para la presencia de la al menos una molécula se efectúa tras un periodo después del trasplante del trasplante de prueba seleccionado del intervalo de 1 segundo a 45 días.

40 Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, el receptor de prueba es un roedor y/o el sujeto.

Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, el roedor es un ratón.

45 Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, el receptor de prueba lleva linfocitos T humanos funcionales.

50 Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, los linfocitos T humanos y el órgano o tejido son no singénicos.

Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, la al menos una molécula que puede estimular o potenciar una respuesta inmunitaria en el sujeto es un co-receptor de linfocitos o ligando de co-receptor de linfocitos.

55 Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, el co-receptor de linfocitos o ligando de co-receptor de linfocitos está seleccionado del grupo que consiste en B7-1, CD40 y CD40L.

60 Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, la prueba se efectúa mediante análisis por RT-PCR del trasplante de prueba.

Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, el órgano o tejido está seleccionado del grupo que consiste en un explante de órgano, un explante de tejido, un explante de célula, un cultivo de órgano, un cultivo de tejido y un cultivo celular.

65 Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, el órgano o tejido es un órgano o tejido

porcino.

Según otras características más en las realizaciones preferidas descritas, el órgano o tejido es un órgano o tejido porcino y la edad específica de diferenciación está seleccionada correspondientes a 20 a 63 días de gestación.

La presente invención trata satisfactoriamente las limitaciones de las configuraciones presentemente conocidas proporcionando un procedimiento generalmente aplicable y óptimo para tratar esencialmente cualquier enfermedad susceptible a trasplante terapéutico usando trasplante de injertos de órgano o tejido alógeno/xenógeno debido a que tales injertos permiten la generación de órganos/tejidos derivados de injerto que muestran diferenciación específica de linaje estructural y funcional óptima, y son óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos en un receptor sin o con inmunodepresión mínima.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica o prueba de la presente invención, métodos y materiales adecuados se describen a continuación. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad. En caso de conflicto, la memoria descriptiva de patente, que incluye definiciones, controlará. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describe en el presente documento, a modo de ejemplo solo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se enfatiza que los datos mostrados son solo a modo de ejemplo y para los fines de discusión ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención, y se presentan para proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente entendida de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se ha hecho intento de mostrar detalles estructurales de la invención en más detalle del que es necesario para un entendimiento fundamental de la invención, haciendo evidente para aquellos expertos en la materia la descripción tomada con los dibujos cómo las varias formas de la invención pueden encarnarse en la práctica.

Todas las figuras y ejemplos referentes a tejido embrionario humano solo se desvelan como referencia, pero no parte de la invención. Además, las partes referentes a otros órganos distintos de aquellos en las reivindicaciones no son parte de la invención.

En los dibujos:

Las FIG. 1a-j son fotografías que representan crecimiento y diferenciación de precursores tempranos de riñón humano y porcino después del trasplante. Las Figuras 1a-b, respectivamente, representan una vista macroscópica e histología (Figura 1b; H&E; $\times 10$ aumentos del original) de un injerto de tejido renal humano de 8 semanas de edad gestacional, 8 semanas después del trasplante. Obsérvese el enorme crecimiento y la forma formada de un riñón (flecha) y el aspecto de capas de glomérulos y túbulos. Las Figuras 1c-d son una vista macroscópica y análisis histológico (H&E; $\times 10$ aumentos del original), respectivamente, de un injerto de tejido renal porcino de 4 semanas de edad gestacional, 8 semanas después del trasplante. Obsérvese el enorme crecimiento (flecha) y lechos vasculares externos y numerosos glomérulos y túbulos. Células de riñón embrionarias tempranas trasplantadas se diferencian en otros destinos celulares tras el trasplante de injertos porcinos renales de 20 a 21 días de edad gestacional (Figuras 1e-g) y 24 a 25 días de edad gestacional (Figuras 1h-j). La Figura 1e es una fotomicrografía de histología de H&E $\times 4$ aumentos del original que muestra vasos sanguíneos (puntas de flecha), cartílago (flecha grande) y hueso (flechas pequeñas). Las Figuras 1f-g son fotomicrografías de histología de H&E $\times 40$ aumentos del original que representan hueso y cartílago, respectivamente. La Figura 1h es una fotomicrografía de histología de H&E $\times 10$ aumentos del original que muestran miofibroblastos (puntas de flecha) y cartílago (flecha grande). Las Figuras 1i-j son fotomicrografías de histología de H&E $\times 40$ aumentos del original que representan miofibroblastos y una estructura similar a tejido glandular representativo, respectivamente.

Las FIG. 2a-j son fotomicrografías que representan vascularización de injertos derivados de tejido renal de edad gestacional temprana por vasos sanguíneos del receptor de ratón. Se muestra la inmunotinción de injertos de tejido renal humano de 8 semanas de edad gestacional (Figuras 2a, 2c y 2e) y porcino de 4 semanas de edad gestacional (Figuras 2b, 2d y 2f), 4 semanas después del trasplante, con anticuerpo contra ratón CD31 (PECAM) ($\times 40$ aumentos del original). Las Figuras 2c-d representan tinción positiva (puntas de flecha) en vasos mayores, las Figuras 2e-f representan capilares medios y de tamaño pequeño, y las Figuras 2g-h representan glomérulos en desarrollo. Las Figuras 2g-h representan la falta de tinción en glomérulos y capilares de tamaño pequeño maduros de tejido de riñón fetal porcino humano de 16 semanas de edad gestacional y de 8 semanas de edad gestacional, 4 semanas después del trasplante. Las Figuras 2i-j muestran la falta de vasos derivados del huésped en riñones fetales humanos y porcinos vascularizados de control, respectivamente ($\times 20$ aumentos del original).

Las FIG. 3a-b son fotografías de injerto completo que representan quistes llenos de fluido similar a orina generados por trasplantes de precursores de riñón humano y porcino embrionarios tempranos. Las Figuras 3a-b, respectivamente, representan vistas macroscópicas de injertos intrabdominales derivados de tejido renal humano de 8 semanas de edad gestacional, y porcino de 4 semanas de edad gestacional que contienen grandes quistes (indicados por flechas), 8 semanas después del trasplante. El análisis del fluido de los quistes lo identificó como orina diluida.

Las FIG. 4a-d son representaciones de datos que representan curvas de crecimiento de injertos de tejido renal humano de 14, 10, 8 y 7 semanas de edad gestacional, respectivamente, en presencia (▲, triángulos rellenos) o ausencia (□, cuadrados blancos) de CMSP humanas alorreactivas. En injertos de tejido renal de 14 ó 10 semanas de edad de gestación, 8 semanas después del trasplante, $P < 0,01$ y $P < 0,05$ se compararon con controles, respectivamente.

Las FIG. 4e-f son fotomicrografías que representan un trasplante de un injerto de tejido renal humano de 14 semanas de edad gestacional inmunoteñido con anticuerpos contra CD3 humano ($\times 40$ aumentos del original) que demuestra la destrucción de glomérulo (Figura 4e) y túbulo (Figura 4f) por linfocitos T humanos.

Las FIG. 4g-h son fotomicrografías que representan un trasplante derivado de tejido renal de 8 semanas de edad gestacional inmunoteñido con anticuerpos específicos para CD3 humano ($\times 40$ aumentos del original). Obsérvese la ausencia de infiltración de linfocitos T, y la presencia de glomérulos y túbulos intactos (Figuras 4g-h, respectivamente).

Las FIG. 5a-b son representaciones de datos que representan curvas de crecimiento similares de injertos derivados de tejido renal humano de 8 semanas de edad gestacional (Figura 5a) en receptores que reciben tanto dos infusiones independientes de CMSP humanas alorreactivas en el momento del trasplante como 6 semanas después del trasplante (▲, triángulos rellenos), o en receptores no infundidos con CMSP (□, cuadrados blancos). La curva de crecimiento de trasplantes que se origina de fetos humanos de 14 semanas de edad demuestra crecimiento detenido (Figura 5b; ▲, triángulos rellenos) cuando los últimos se trasplantan en receptores concomitantemente con la segunda dosis de CMSP humanas, con respecto a aquellas no sometidos a infusión de PBMC (□, cuadrados blancos; $P < 0,05$, 8 semanas después del trasplante).

Las FIG. 6a-c son fotomicrografías que representan rechazo de injertos derivados de tejido renal porcino adulto por leucocitos humanos. Las Figuras 6a-b son vistas de $\times 4$ y $\times 20$ aumentos, respectivamente, que representan tinción histológica con hematoxilina y eosina (H&E) de injertos derivados de tejido de riñón porcino adulto subcapsular 4 semanas tras la infusión intraperitoneal de CMSP humanas. La Figura 6c representa infiltración de linfocitos T en tejido trasplantado, como se ha determinado usando detección inmunohistoquímica de CD3 humano.

Las FIG. 7a-d son representaciones de datos que representan curvas de crecimiento de injertos de tejido renal porcino de 8, 6, 4 y 3 semanas de edad gestacional (Figuras 7a-d, respectivamente) en presencia (▲, triángulos rellenos) o ausencia (□, cuadrados blancos) de CMSP humanas xenorreactivas. En trasplantes que se originan de fetos porcinos de 8 ó 6 semanas de edad, 8 semanas después del trasplante, $P < 0,01$ y $P < 0,05$ se compararon con controles, respectivamente.

Las FIG. 8a-c son fotomicrografías que representan destrucción de tejido de trasplante por invasión de linfocitos T humanos en un trasplante derivado de tejido renal porcino de 8 semanas de edad gestacional, 4 semanas después del trasplante. Las Figuras 8a-b ($\times 40$ aumentos del original) representan inmunotinción con anticuerpos contra CD3 humano, y la FIG. 8c representa tinción histológica con H&E ($\times 10$ aumentos del original).

Las FIG. 9a-b son fotomicrografías de un trasplante derivado de tejido renal porcino de 4 semanas de edad gestacional que demuestra los glomérulos y túbulos preservados sin infiltrado positivo de CD3 ($\times 40$ aumentos del original), 4 semanas después del trasplante.

Las FIG. 10a-b son representaciones de datos que representan curvas de crecimiento similares de injertos derivados de tejido renal porcino de 4 semanas de edad gestacional (Figura 10a) en receptores tanto que reciben 2 infusiones independientes de CMSP humanas xenorreactivas en el momento del trasplante y 4 semanas después del trasplante (▲, triángulos rellenos) como en receptores no infundidos con CMSP (□, cuadrados blancos). La curva de crecimiento (Figura 10b) de trasplantes que se origina de fetos porcinos de 8 semanas de edad demuestra crecimiento detenido (▲, triángulos rellenos) cuando los últimos se trasplantan en receptores concomitantemente con la segunda dosis de CMSP humanas y en comparación con aquellos no sometidos a infusión de PBMC (□, cuadrados blancos) ($P < 0,05$, 8 semanas después del trasplante).

Las FIG. 11a-c son fotografías de UV de electroforesis en gel de agarosa que representan análisis por RT-PCR de la expresión de ARNm de molécula co-estimulante en tejido renal en desarrollo humano normal (antes del trasplante), en tejido renal humano en desarrollo trasplantado inmediatamente después del trasplante, pero antes de la administración de CMSP humanas alorreactivas (después del trasplante), y 2, 4 y 6 semanas después de que los ratones receptores se reconstituyeran con CMSP humanas. Los trasplantes analizados se derivaron de tejidos renales humanos de 8, 14 y 22 semanas de edad gestacional (Figuras 11a-c, respectivamente).

Las FIG. 12a-c representan patrones de expresión génica diferencial de genes relacionados con la inmunidad en tejidos renales humanos adultos frente a de edad gestacional normales. La Figura 12a es un dendrograma de agrupación jerárquica (Zuo, F. y col., 2002. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 6292-6297) de los grupos experimentales generados basándose en la similitud de sus perfiles de expresión que representa las agrupaciones de patrones de expresión adultos y fetales por separado. La Figura 12b es un diagrama de salida del análisis de micromatrices que representa patrones de expresión génica en los 231 genes relacionados con

la inmunidad analizados que muestra que 122 de tales genes puntuaron un TNoM = 0 ó 1 (Kaminski, N. y Friedman, N., 2002. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 27, 125-132). Los valores de expresión génica se dividieron entre una media geométrica de todas las muestras, se transformaron logarítmicamente y luego se representaron usando el software PLOTTPGENE (Kaminski, N. y Friedman, N., 2002. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 27, 125-132). Amarillo y púrpura representan expresión máxima y mínima, respectivamente. Obsérvese que la mayoría de los genes relacionados con la inmunidad se expresaron a menores niveles en edad gestacional en comparación con tejido renal adulto. La Figura 12c es una representación de datos que representa expresión génica de 68 genes que tienen TNoM = 0 ($P < 0,05$). Las representaciones son los valores de expresión medios de todos los genes en el grupo. Para eliminar el efecto de valores atípicos, los genes se normalizaron a un intervalo de [0,1], que significa que el valor máximo para cada gen se fijó para que fuera 1, el valor mínimo para que fuera cero, y el resto de los valores se ajustaron linealmente a este intervalo. Obsérvese de nuevo que la mayoría de los genes estadísticamente significativos (57/68) fueron menores en edad gestacional con respecto a tejido renal de edad adulta.

La FIG. 13 es una fotografía de injerto completa que representa un injerto derivado de tejido pancreático humano de 12 semanas de edad gestacional, 8 semanas después del trasplante, trasplantado en un receptor de ratón NOD/SCID portador de CMSP humanas alorreactivas. Obsérvese el pronunciado crecimiento del injerto y la ausencia de cualquier signo de rechazo del injerto.

Las FIG. 14a-b son fotomicrografías que representan un injerto derivado de hígado porcino de 21 días de edad gestacional teñido con H&E trasplantado en un receptor de ratón NOD/SCID, 7 semanas después del trasplante a $\times 4$ y $\times 20$ aumentos del original, respectivamente. La Figura 14a muestra un claro desarrollo de teratoma con amplia diferenciación de cartílago (Figura 14b).

Las FIG. 15a-d son fotomicrografías que representan diferenciación hepática en secciones de histología de injertos derivados de hígado porcino de 28 días de edad gestacional trasplantados en el bazo de un ratón NOD/SCID, 6 semanas después del trasplante, teñidos con H&E (Figura 15a), ácido peryódico de Schiff (PAS; Figura 15b), anticuerpo anti-albúmina porcina (Figura 15c) y anticuerpo anti-Ki67 (Figura 15d). Obsérvese patrones lobulares de disposición de hepatocitos en las Figuras 15a-c. La funcionalidad del hígado en crecimiento se sugiere por la tinción para PAS y para albúmina (Figuras 15b y 15c, respectivamente). Aumentos del original de las fotomicrografías en las Figuras 15a-c: $\times 10$. En la Figura 15d, la tinción positiva de núcleos de hepatocitos (flechas) con anticuerpo anti-Ki67 demuestra proliferación de hepatocitos derivados de injerto.

La FIG. 16a-b son fotomicrografías que representan diferenciación hepática en secciones de histología de un injerto derivado de hígado porcino de 28 días de edad gestacional trasplantado bajo la cápsula renal de un ratón NOD/SCID, 6 semanas después del trasplante. Las secciones se tiñeron con PAS, y anticuerpo anti-albúmina porcina (Figura 16a y 16b, respectivamente). Aumentos del original: $\times 4$. La actividad funcional del hígado trasplantado se demuestra por glucógeno (positividad para PAS) y síntesis de albúmina.

Las FIGS. 17a-b son fotomicrografías que representan diferenciación hepática en una sección de histología de un injerto derivado de hígado humano de 7 semanas de edad gestacional trasplantado bajo la cápsula renal de un ratón NOD/SCID, 6 semanas después del trasplante. La Figura 17a representa tinción con H&E, aumentos del original $\times 4$, obsérvese la diferenciación del conducto biliar (flechas). La Figura 17b representa tinción de PAS, aumentos del original $\times 40$, obsérvese la presencia de hepatocitos guardados en glucógeno diferenciados.

La FIG. 18a es una estereomicrografía que representa crecimiento pancreático de un injerto de páncreas porcino completo de 28 días de edad gestacional trasplantado bajo la cápsula renal de un ratón NOD/SCID, 5 semanas después del trasplante.

Las FIG. 18b-c son fotomicrografías que representan diferenciación de tejido pancreático en una sección de histología de un injerto derivado de páncreas porcino de 27 días de edad gestacional trasplantado bajo la cápsula renal de un ratón NOD/SCID, 6 semanas después del trasplante. Las Figuras 18b y 18c representan fotomicrografías de la sección a bajo y alto aumento, respectivamente. La sección se tiñó con H&E, obsérvese la diferenciación del lóbulo pancreático con estructuras pancreáticas de conductos y acinosas.

Las FIG. 19a-c son fotomicrografías que representan diferenciación pancreática funcional en secciones de histología de injertos derivados de páncreas porcino de edad gestacional trasplantados bajo la cápsula renal de ratones NOD/SCID, 6 semanas después del trasplante. Las secciones teñidas con anticuerpo anti-insulina (Figura 19a) y anticuerpo anti-polipéptido pancreático (PP) (Figura 19b) demuestran síntesis de insulina y PP, respectivamente, en un injerto derivado de tejido de 27 días de edad gestacional. La Figura 19c representa una sección de histología de un injerto derivado de páncreas porcino de 28 días de edad gestacional inmunoteñido con anticuerpo anti-citoqueratina (el anticuerpo es no reactivo con epitelios de ratón). Obsérvese la diferenciación de epitelios de conducto pancreático derivados de injerto.

Las FIG. 20a-b son fotomicrografías que representan diferenciación pancreática funcional en una sección de un injerto derivado de páncreas humano de 8 semanas de edad gestacional trasplantado bajo la cápsula renal de un ratón NOD/SCID, 6 semanas después del trasplante. La sección se inmunoteñió con anticuerpo anti-insulina, obsérvese focos de células beta positivas para insulina. La Figura 20a es una fotomicrografía tomada a bajo aumento y la Figura 20b es una fotomicrografía tomada a alto aumento que recalca la expresión de insulina dentro de un islote de Langerhans.

Las FIG. 20c-d son fotomicrografías que representan diferenciación pancreática en una sección de histología de un injerto derivado de páncreas humano de 8 semanas de edad gestacional trasplantado bajo la cápsula renal de un ratón NOD/SCID, 6 semanas después del trasplante. La sección se inmunoteñió con anticuerpo anti-vimentina (no reactivo con tejidos de ratón), obsérvese la diferenciación de células mesenquimatosas de origen

humano en el injerto (Figura 20d). Las Figuras 20c y 20d son fotomicrografías de la sección teñida tomada a bajo y alto aumento del original, respectivamente.

Las FIG. 21a-c son fotomicrografías que representan diferenciación cardíaca en secciones de histología de un injerto derivado de corazón humano de 9 semanas de edad gestacional trasplantado bajo la cápsula renal de un ratón NOD/SCID, 6 semanas después del trasplante. La Figura 21a representa una sección teñida con H&E, obsérvese que el trasplante contiene dos tipos distintos de componentes celulares específicos de cardíaco: estructuras cardiomiocíticas ("CM") y ganglionares basales ("GB"). Las Figuras 21b y 21c representan secciones inmunoteñidas con anticuerpo anti-alfa-actina sarcómera y anticuerpo anti-proteína del neurofilamento, respectivamente. Obsérvense grupos de células cardiomiocíticas identificadas por positividad de alfa-actina sarcómera, y células ganglionares basales por positividad de proteínas de neurofilamento.

La FIG. 22 es una fotomicrografía que representa diferenciación esplénica en una sección de histología teñida con H&E de un injerto derivado de bazo porcino de 28 días de edad gestacional trasplantado bajo la cápsula renal de un ratón NOD/SCID, 6 semanas después del trasplante. Obsérvese la diferenciación de tejido mesenquimatoso bien vascularizado. La fotomicrografía se tomó a $\times 4$ aumentos del original.

Descripción de las realizaciones preferidas

La presente invención es de procedimientos de tratamiento de enfermedades por trasplante de órganos/tejidos en desarrollo o no singénicos, y de procedimientos de evaluación de la idoneidad del trasplante de injertos. Específicamente, la presente invención se refiere al trasplante de injertos de órgano o tejido porcino de 27 a 28 días de edad gestacional para tratar enfermedades en seres humanos, tales como enfermedades renales, pancreáticas, hepáticas, cardíacas, genéticas y/o hematológicas. Los injertos porcinos a tales edades gestacionales tienen la capacidad de generar, en ausencia de teratomas derivados del injerto, órganos/tejidos vascularizados por el huésped estructuralmente y funcionalmente diferenciados óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos, sin o con inmunodepresión mínima del huésped. En particular, tales injertos, cuando se derivan de órganos/tejidos renales, tienen la capacidad de generar órganos renales productores de orina vascularizados por el huésped; cuando se derivan de órganos/tejidos pancreáticos tienen la capacidad de generar islotes pancreáticos que comprenden células beta productoras de insulina; cuando se derivan de órganos/tejidos hepáticos tienen la capacidad de generar células y tejidos hepáticos estructuralmente y funcionalmente diferenciados. Tales injertos porcinos, cuando se derivan de órganos/tejidos linfoides, tienen la capacidad de diferenciarse en tejidos mesenquimatosos/del estroma linfoides bien diferenciados y vascularizados. Como tal, el trasplante de tales injertos porcinos de edad gestacional puede usarse para tratar sujetos humanos que tienen una enfermedad que es susceptible a trasplante de células, tejidos y/u órganos terapéutico, tal como una enfermedad renal, pancreática, hepática, cardíaca, genética y/o hematológica, sin o con inmunodepresión mínima de receptores del injerto.

Antes de explicar en detalle al menos una realización de la invención, debe entenderse que la invención no está limitada en su solicitud a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados por los ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de ser puesta en práctica o llevada a cabo de diversas formas. Por tanto, debe entenderse que la fraseología y terminología empleada en el presente documento es con el fin de descripción y no debe considerarse limitante.

El trasplante de órgano o tejido es la terapia óptima o única terapia para numerosas enfermedades devastadoras y letales, tales como enfermedades renales, pancreáticas, hepáticas, cardíacas, hematológicas y/o genéticas. Sin embargo, los actuales procedimientos de trasplante están gravemente limitados por fuentes inadecuadas de órganos/tejidos de donantes adecuados, y por el requisito de tratamiento inmunodepresor permanente y perjudicial de receptores del injerto para prevenir el rechazo del injerto. Las estrategias sugeridas para vencer estos obstáculos implican usar injertos de órgano o tejido xenógeno, que están disponibles en cantidades suficientes, y/o desarrollar injertos de órgano o tejido que se ha mostrado que son mejor tolerados por receptores no coincidentes que los injertos de órgano o tejido completamente diferenciados.

En la técnica anterior se han intentado diversos enfoques para utilizar trasplante de órganos/tejidos en desarrollo y/o no singénicos para tratar enfermedad humana.

Por ejemplo, el trasplante de órganos/tejidos renales de edad gestacional se ha intentado en receptores alógenos no inmunodeprimidos, receptores xenógenos tratados con bloqueo por CTLA4-Ig de la coestimulación, o receptores xenógenos inmunodeficientes reconstituidos con CMSP humanas. Se ha intentado el trasplante de órganos/tejidos pancreáticos de edad gestacional mediante trasplante de células de los islotes, páncreas o islotes pancreáticos de edad gestacional cultivados, en receptores inmunodeficientes xenógenos, o trasplante de agrupaciones de células de los islotes fetales porcinos en receptores humanos diabéticos. Otro enfoque ha intentado trasplante estriatal de tejido mesencefálico ventral fetal alógeno en receptores humanos con enfermedad de Parkinson.

Sin embargo, todos los enfoques de la técnica anterior que emplean trasplante de injertos de órgano o tejido no singénico en desarrollo, tales como injertos porcinos, en un receptor han fracasado en proporcionar un procedimiento de generación en un receptor de órganos/tejidos derivados de injerto que: (i) sean óptimamente estructuralmente/funcionalmente diferenciados; (ii) sean completamente/óptimamente tolerados por linfocitos

humanos alorreactivos/xenorreactivos en un receptor sin o con inmunodepresión mínima del receptor del injerto; (iii) sean óptimamente vascularizados por el huésped; y (iv) puedan generarse en ausencia de teratomas derivados del injerto.

5 En particular, los enfoques de la técnica anterior han fracasado en proporcionar un procedimiento de generación en un receptor de órganos/tejidos renales porcinos derivados de injerto que muestre diferenciación estructural/funcional óptima, que incluya producción de orina y que pueda generarse en ausencia de teratomas derivados del injerto y que sean óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos en el receptor sin o con inmunodepresión mínima del receptor.

10 Además, los enfoques anteriores han fracasado en proporcionar un procedimiento de generación en un receptor de órganos/tejidos pancreáticos porcinos derivados de injerto que incluyan islotes pancreáticos y células beta productoras de insulina, que puedan generarse en ausencia de teratomas y que sean óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos en el receptor.

15 Además, los enfoques de la técnica anterior han fracasado en proporcionar un procedimiento de generación en un receptor de células/tejidos hepáticos estructuralmente y funcionalmente diferenciados porcinos derivados de injerto que puedan generarse en ausencia de teratomas derivados del injerto y que sean óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos en el receptor.

20 Adicionalmente, los enfoques de la técnica anterior han fracasado en proporcionar un procedimiento de generación en un receptor de células/tejidos cardíacos proliferativos derivados de injerto que puedan generarse en ausencia de teratomas derivados del injerto ,y que sean óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos en el receptor.

25 Además, los enfoques de la técnica anterior han fracasado en proporcionar un procedimiento de generación en un receptor de tejidos linfoides porcinos bien diferenciados y vascularizados derivados de injerto que puedan generarse en ausencia de teratomas derivados del injerto y que sean óptimamente tolerados por linfocitos humanos xenorreactivos.

30 Aunque la presente invención se reduce a la práctica, se descubrió inesperadamente la existencia de edades gestacionales específicas durante las cuales órganos/tejidos no muestran/expresan sustancialmente co-receptores de linfocitos específicos o ligandos de los mismos, y durante las cuales órganos/tejidos pueden trasplantarse en un receptor de manera que generen, en ausencia de teratomas derivados del injerto, células, órganos y tejidos que muestran diferenciación estructural y funcional óptima, tal como, en el caso de injertos renales, producción de orina; y que son óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos en el receptor, sin o con inmunodepresión mínima del receptor.

35 En particular, aunque la presente invención se reduce a la práctica, se descubrieron inesperadamente y se definieron edades gestacionales específicas durante las cuales injertos porcinos renales pueden trasplantarse en un receptor de manera que generen, en ausencia de formación de teratomas derivados del injerto, órganos y tejidos renales productores de orina óptimamente estructuralmente y funcionalmente diferenciados que son óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos en el receptor en ausencia de, o con inmunodepresión mínima del receptor.

45 Además, aunque la presente invención se reduce a la práctica, se descubrieron inesperadamente y se definieron edades gestacionales específicas durante las cuales injertos hepáticos porcinos pueden trasplantarse en un receptor de manera que generen, en ausencia de formación de teratomas derivados del injerto, órganos/tejidos hepáticos óptimamente estructuralmente y funcionalmente diferenciados que serán óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos.

50 Además, aunque la presente invención se reduce a la práctica, se descubrieron inesperadamente y se definieron edades gestacionales específicas durante las cuales injertos porcinos pancreáticos pueden trasplantarse en un receptor de manera que generen, en ausencia de formación de teratomas derivados del injerto, órganos/tejidos pancreáticos estructuralmente y funcionalmente diferenciados que incluyen islotes pancreáticos y células beta productoras de insulina que serán óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos.

55 Adicionalmente, aunque la presente invención se reduce a la práctica, se descubrieron inesperadamente y se definieron edades gestacionales específicas durante las cuales injertos cardíacos pueden trasplantarse en un receptor de manera que generen, en ausencia de formación de teratomas derivados del injerto, células/tejidos cardíacos diferenciados y proliferativos que serán óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos.

60 Además, aunque la presente invención se reduce a la práctica, se descubrieron inesperadamente y se definieron edades gestacionales específicas durante las cuales injertos linfoides porcinos pueden trasplantarse en un receptor de manera que generen, en ausencia de formación de teratoma, células/tejidos mesenquimatosos/del estroma linfoides bien diferenciados y vascularizados que serán tolerados por linfocitos humanos xenorreactivos.

65

5 Así, el trasplante de injertos derivados de órgano/tejido porcino a las edades gestacionales anteriormente mencionadas puede usarse para sustituir/ reparar estructuralmente/funcionalmente órganos/tejidos que muestran fisiología/morfología patológica en receptores de tales injertos, y de ahí que puedan usarse para tratar enfermedades asociadas a tales órganos/tejidos que muestran tal fisiología/morfología patológica, sin ninguna, o con inmunodepresión mínima del receptor.

10 Así, según un aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de tratamiento de un trastorno asociado a fisiología o morfología patológica de órgano o tejido.

15 El procedimiento se efectúa trasplantando en un sujeto en necesidad del mismo un injerto de órgano o tejido de mamífero terapéuticamente eficaz seleccionado: (i) que no expresa o presenta sustancialmente una molécula que pueda estimular o potenciar una respuesta inmunitaria en el sujeto; (ii) a una edad predeterminada de diferenciación suficientemente avanzada de manera que pueda generar órganos/tejidos estructuralmente y funcionalmente diferenciados de esencialmente un único tipo en el sujeto, preferentemente en ausencia de formación de teratomas derivados del injerto, pero suficientemente temprana de manera que se permita que el injerto sea óptimamente tolerado por linfocitos no singénicos; o (iii) preferentemente ambos.

20 Dependiendo del contexto del trasplante, con el fin de facilitar el injerto en el injerto, el procedimiento puede comprender adicionalmente ventajosamente tratar el sujeto con una pauta inmunodepresora antes de, concomitantemente con o tras el trasplante del injerto.

25 Como se usa en el presente documento, "tratar" el trastorno incluye curar, aliviar o estabilizar el trastorno, o inhibir la futura aparición o desarrollo del trastorno.

30 Como se usa en el presente documento, el término "trastorno" se refiere a cualquier enfermedad, o a cualquier afección, estado o síndrome patológico o no deseado, o a cualquier anomalía física, morfológica o fisiológica.

35 Como se usa en el presente documento, el término "injerto terapéuticamente eficaz" se refiere a un injerto que tiene características estructurales y/o funcionales de forma que el trasplante del mismo en el sujeto sirva para tratar el trastorno.

40 Procedimientos de selección de un injerto que no expresa o presenta sustancialmente la molécula, o en la edad predeterminada de diferenciación, se describen adicionalmente en el presente documento más adelante.

45 El trasplante del injerto puede efectuarse de numerosas formas, dependiendo de diversos parámetros tales como, por ejemplo, el tipo, estado o gravedad del trastorno, los parámetros físicos o fisiológicos específicos para el sujeto individual, y/o el desenlace terapéutico deseado. Por ejemplo, dependiendo de la aplicación y el fin, el trasplante del injerto puede efectuarse usando un injerto que se origina de cualquiera de diversas especies de mamífero y/o tipo de órgano o tejido, implantando el injerto en diversas localizaciones anatómicas del sujeto, usando un injerto que consiste en un órgano o tejido completo o parcial, y/o usando un injerto que consiste en diversos números de órganos, tejidos discretos, y/o porciones de los mismos.

50 Un experto habitual en la materia, tal como un médico, en particular un cirujano de trasplantes especializado en el trastorno, poseería la experiencia requerida para seleccionar y trasplantar un injerto adecuado de manera que tratara el trastorno según las enseñanzas de la presente invención.

55 Dependiendo de la aplicación y el fin, el procedimiento puede efectuarse usando un injerto singénico, alógeno o xenógeno derivado esencialmente de cualquier especie de mamífero.

60 Como se usa en el presente documento, un injerto "singénico" se refiere a un injerto que es esencialmente genéticamente idéntico al sujeto o esencialmente a todos los linfocitos del sujeto.

65 Ejemplos de injertos singénicos incluyen un injerto derivado del sujeto (también denominado en la materia un "injerto autólogo"), un clon del sujeto, o un gemelo idéntico del sujeto.

Como se usa en el presente documento, un injerto "no singénico" se refiere a un injerto alógeno o un injerto xenógeno.

60 Como se usa en el presente documento, un "injerto alógeno" se refiere a un injerto derivado de un donante no singénico con el sujeto o no singénico con una proporción sustancial de los linfocitos presentes en el sujeto, siendo el donante de la misma especie que el sujeto o de la misma especie que sustancialmente todos los linfocitos del sujeto.

65 Normalmente, mamíferos no clónicos/no gemelos de la misma especie son alógenos entre sí. Como se usa en el presente documento, un "injerto xenógeno" se refiere a un injerto derivado de un donante no

singénico con el sujeto o no singénico con una proporción sustancial de los linfocitos presentes en el sujeto, siendo el donante de una especie diferente al sujeto o de una especie diferente como una proporción sustancial de los linfocitos presentes en el sujeto.

5 Normalmente, los mamíferos de diferentes especies son xenógenos entre sí.

10 Como se describe e ilustra en la sección de Ejemplos más adelante, el trasplante de un injerto de animal de la presente invención en un receptor puede usarse para generar óptimamente órganos y tejidos estructuralmente y funcionalmente diferenciados, en ausencia de formación de teratoma, que son óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos en el receptor sin o con inmunodepresión mínima del receptor.

Como se usa en el presente documento, un injerto “óptimamente tolerado” es un injerto no rechazado o no sustancialmente infiltrado en el sujeto por linfocitos T no singénicos con el injerto.

15 Como se usa en el presente documento, un injerto que es “rechazado” es un injerto que causa lo que es comúnmente conocido en la técnica como rechazo hiperagudo, rechazo agudo o rechazo crónico. Amplia orientación para determinar el rechazo del injerto se proporciona en la bibliografía de la materia (por ejemplo, se remite a: Kirkpatrick CH. y Rowlands DT Jr., 1992. JAMA. 268, 2952; Higgins RM. y col., 1996. Lancet 348, 1208; Suthanthiran M. y Strom TB., 1996. New Engl. J. Med. 331, 365; Midthun DE y col., 1997. Mayo Clin Proc. 72, 175; Morrison VA. y col., 1994. Am J Med. 97, 14; Hanto DW., 1995. Annu Rev Med. 46, 381; Senderowicz AM. y col., 1997. Ann Intern Med. 126, 882; Vincenti F. y col., 1998. New Engl. J. Med. 338, 161; Dantal J. y col. 1998. Lancet 351, 623). La infiltración de un injerto por linfocitos T de un receptor del injerto normalmente se correlaciona con rechazo del injerto.

25 Como se usa en el presente documento, un “tratamiento inmunodepresor mínimo” del sujeto se refiere a un tratamiento inmunodepresor del sujeto limitado a la administración de un fármaco que pueda bloquear una interacción entre un co-receptor de linfocitos y un ligando relacionado del mismo, o a un tratamiento inmunodepresor del sujeto aplicado durante un único periodo de 20 días o menos.

30 Como se ha descrito anteriormente en este documento, el injerto puede derivarse de diversas especies de mamífero.

Dependiendo de la aplicación y el fin, el injerto es preferentemente un injerto porcino.

35 Como se usa en el presente documento, el término “linfocitos alorreactivos” se refiere a linfocitos que pueden rechazar sustancialmente un injerto alógeno esencialmente completamente diferenciado.

40 Aunque la presente invención se reduce a la práctica, las edades gestacionales de órganos/tejidos porcinos durante las cuales éstos están en una edad predeterminada adecuada de diferenciación para poner en práctica el procedimiento se identificaron, como se describe en la sección de Ejemplos, más adelante.

45 Preferentemente, el injerto porcino se selecciona a una edad de diferenciación correspondiente a 20 a 63 días de gestación, más preferentemente 20 a 56 días de gestación, más preferentemente 20 a 42 días de gestación, más preferentemente 20 a 35 días de gestación, más preferentemente 20 a 28 días de gestación, más preferentemente 24 a 28 días de gestación, y lo más preferentemente 27 a 28 días de gestación.

50 Alternativamente, el injerto porcino puede seleccionarse ventajosamente a una edad de diferenciación correspondiente a 22 a 33 días de gestación, 23 a 32 días de gestación, 24 a 31 días de gestación, 25 a 30 días de gestación, 26 a 29 días de gestación, 22 a 63 días de gestación, 22 a 56 días de gestación, 22 a 42 días de gestación, 22 a 35 días de gestación, 22 a 34 días de gestación, 22 a 32 días de gestación, 22 a 31 días de gestación, 22 a 30 días de gestación, 22 a 29 días de gestación, 22 a 28 días de gestación, o 22 a 27 días de gestación.

55 Con el fin de evitar la formación de teratoma, el injerto porcino se selecciona preferentemente a una edad de diferenciación correspondiente a al menos 22 días de gestación ya que, como se muestra en el Ejemplo 6 de la sección de Ejemplos que sigue, un injerto porcino a una edad de diferenciación correspondiente a una edad gestacional de ya 21 días se arriesga a causar teratomas cuando se trasplanta en un huésped.

60 Como se describe y se muestra en la sección de Ejemplos que sigue, el trasplante en un receptor de injertos porcinos a 27 a 28 días de gestación puede usarse para generar óptimamente órganos y tejidos derivados de injerto funcionalmente y estructuralmente diferenciados, en ausencia de formación de teratomas derivados del injerto, que son óptimamente tolerados por linfocitos humanos xenorreactivos en el receptor, sin o con inmunodepresión mínima del receptor.

65

Como se usa en el presente documento, el término “linfocitos xenorreactivos” se refiere a linfocitos que pueden rechazar sustancialmente un injerto xenógeno de edad adulta.

5 Aunque el procedimiento de la presente invención se reduce a la práctica, la aplicabilidad universal del procedimiento con respecto a diferentes tipos de células/órganos/tejidos se demostró usando injertos renales, hepáticos, pancreáticos y linfoides de origen porcino.

10 Como se describe y se muestra en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos que sigue, el trasplante en un receptor de un injerto renal porcino de la presente invención seleccionado a una edad de diferenciación correspondiente a 27 a 28 días de gestación puede usarse para generar, en ausencia de teratomas derivados del injerto, óptimamente órganos y tejidos renales derivados de injerto funcionalmente y estructuralmente diferenciados que pueden producir orina, y que son óptimamente tolerados por linfocitos humanos xenorreactivos en el receptor, sin o con inmunodepresión mínima del receptor.

15 Como se describe y se muestra en el Ejemplo 6 de la sección de Ejemplos que sigue, el trasplante en un receptor de un injerto hepático porcino de la presente invención seleccionado a una edad de diferenciación correspondiente a 28 días de gestación puede usarse para generar órganos/tejidos hepáticos derivados de injerto funcionalmente y estructuralmente diferenciados, en ausencia de formación de teratomas derivados del injerto, que serán óptimamente tolerados por linfocitos humanos xenorreactivos en el receptor, sin o con inmunodepresión mínima del receptor.

20 Como se describe y se muestra en el Ejemplo 7 de la sección de Ejemplos que sigue, el trasplante en un receptor de un injerto pancreático porcino de la presente invención seleccionado a una edad de diferenciación correspondiente a 27-28 días de gestación puede usarse para generar órganos/tejidos pancreáticos derivados de injerto funcionalmente y estructuralmente diferenciados, que incluyen islotes pancreáticos y células beta productoras de insulina, en ausencia de formación de teratomas derivados del injerto, que serán óptimamente tolerados por linfocitos humanos xenorreactivos en el receptor, sin o con inmunodepresión mínima del receptor.

30 Como se describe y se muestra en el Ejemplo 9 de la sección de Ejemplos que sigue, el trasplante en un receptor de un injerto de órgano/tejido linfóide porcino de la presente invención seleccionado a una edad de diferenciación correspondiente a 28 días de gestación puede usarse para generar, en ausencia de formación de teratomas derivados del injerto, células/tejidos mesenquimatosos/del estroma linfóides derivados de injerto bien diferenciados y vascularizados que serán tolerados por linfocitos humanos xenorreactivos en el receptor.

35 Aunque la presente invención se reduce a la práctica, se descubrió inesperadamente que los órganos/tejidos estructuralmente y funcionalmente diferenciados generados por los injertos mostraban predominantemente vasculatura derivada del sujeto (para más detalles véase por favor la sección de Ejemplos que sigue). Sin quedar ligado a un paradigma, los presentes inventores son de la opinión de que los injertos porcinos a 27 a 28 días de gestación, respectivamente, o injertos derivados de otras especies a edades equivalentes de diferenciación, se injertan óptimamente en el sujeto debido a su capacidad para generar órganos/tejidos que tienen tal vasculatura predominantemente derivada del sujeto. En apoyo de este punto de vista, se ha sugerido en la materia que el grado de vasculatura derivada del huésped en un injerto trasplantado se correlaciona con la tolerancia de un injerto tal.

40 El descubrimiento de que trasplantar órganos/tejidos porcinos a edades de diferenciación correspondientes a tales edades gestacionales tempranas puede usarse para generar en un receptor óptimamente órganos y tejidos derivados de injerto estructuralmente y funcionalmente diferenciados de linaje de injerto que son óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos en el receptor, sin o con inmunodepresión mínima del receptor, en ausencia de formación de teratomas derivados del injerto, era inesperado ya que: (i) la técnica anterior enseñaba que trasplantar órganos/tejidos a edades más avanzadas de diferenciación era óptimo para tal aplicación (por ejemplo, se remite a Otonkoski T. y col., 1999. Transplantation 68, 1674); y (ii) ya que las edades gestacionales más tempranas - y de ahí menos inmunogénicas - de injertos durante las cuales éstos serían capaces de generar órganos/tejidos derivados de injerto óptimamente diferenciados en ausencia de teratomas derivados del injerto eran desconocidas.

55 Los injertos de numerosas especies, distintas de cerdo, a edades óptimas de diferenciación correspondientes a las edades gestacionales porcinas óptimas anteriormente mencionadas también pueden emplearse para poner en práctica el procedimiento de la presente invención. Animales tales como los principales animales domesticados o de ganado, y primates, que se han caracterizado ampliamente con respecto a la correlación de edad de diferenciación con edad gestacional, pueden ser adecuados para poner en práctica el procedimiento. Tales animales incluyen bovinos (por ejemplo, vaca), équidos (por ejemplo, caballo), óvidos (por ejemplo, cabra, ovejas), felinos (por ejemplo, *Felis domestica*), caninos (por ejemplo, *Canis domestica*), roedores (por ejemplo, ratón, rata, conejo, cobaya, jerbo, hámster) y primates (por ejemplo, chimpancé, mono rhesus, mono macaco, títí).

65 Pueden emplearse diversos procedimientos para obtener un injerto a una edad de diferenciación correspondiente a un periodo gestacional específico.

La obtención de un injerto tal se efectúa óptimamente recolectando el injerto de un embrión o feto donante del injerto en desarrollo a una edad de gestación tal.

5 Se entenderá por uno generalmente versado en la materia que la edad gestacional de un organismo es el periodo de tiempo transcurrido tras la fecundación del ovocito que genera el organismo.

10 Alternativamente, un injerto a una edad de diferenciación correspondiente a una edad gestacional específica puede obtenerse por cultivo *in vitro* de células, órganos/tejidos que están en una edad más temprana de diferenciación que el injerto, tales como células precursoras específicas de órgano, de manera que generen un injerto a una edad deseada de diferenciación. Tal diferenciación *in vitro* controlada de células, tejidos u órganos se realiza rutinariamente, por ejemplo, usando cultivo de líneas de citoblastos embrionarios para generar cultivos que contienen células/tejidos/órganos de linajes deseados. Por ejemplo, para la generación de diversos linajes, que incluyen linajes endodérmicos tales como hígado; linajes ectodérmicos tales como cerebro, piel y suprarrenal; y linajes mesodérmicos tales como músculo, cartílago, conducto mülleriano y corazón, se remite, por ejemplo, a: Schuldiner M. y col., 2000. Proc Natl Acad Sci USA. 97:11307-11312 e Itskovitz-Eldor J. y col., 2000. Mol Med 6:88; para diferenciación pancreática de citoblastos embrionarios se remite, por ejemplo, a: Lee S.H., y col., 2000. Nature Biotechnol. 18:675; Lumelsky y col., 2001. Science 292:1389-1394; Soria y col., 2000. Diabetes 49:1-6; Schuldiner M. y col., 2000. Proc Natl Acad Sci U S A. 97:11307-11312. Para diferenciación de linajes pulmonares se remite, por ejemplo, a Otto WR., 1997. Int J Exp Pathol. 78:291-310.

20 Con el fin de tratar óptimamente el trastorno, el trasplante del injerto se efectúa preferentemente de tal forma que se sustituya o repare terapéuticamente el órgano o tejido que muestra fisiología o morfología patológica asociada al trastorno.

25 Por tanto, el injerto se selecciona seleccionado de un tipo de órgano o tejido correspondiente al del órgano o tejido con fisiología o morfología patológica. Por ejemplo, para el tratamiento de un injerto renal, pancreático, hepático o cardíaco, respectivamente. Por ejemplo, para el tratamiento de un trastorno hematológico y/o genético, el injerto es preferentemente un injerto linfoide. Alternativamente, para el tratamiento de un trastorno hematológico y/o genético, el injerto linfoide puede derivarse de cualquier otro tejido linfoide adecuado, dependiendo de la aplicación y el fin, tal como ganglio linfático, placas de Peyer, timo o médula ósea.

35 Como se describe en la sección de Ejemplos más adelante, el trasplante de un injerto seleccionado de un tipo de órgano o tejido correspondientes al del órgano o tejido que presenta fisiología o morfología patológica asociada al trastorno según el protocolo expuesto en este respecto puede usarse para tratar el trastorno.

Como se ha descrito anteriormente en este documento, el trasplante del injerto puede efectuarse por trasplante del mismo en diversas localizaciones anatómicas. Preferentemente, el injerto se trasplanta en una localización anatómica en la que será de óptimo efecto terapéutico.

40 Dependiendo de la aplicación y el fin, el injerto puede trasplantarse en una localización anatómica homotópica (una localización anatómica normal para el tipo de órgano o tejido del injerto), o en una localización anatómica ectópica (una localización anatómica anormal para el tipo de órgano o tejido del injerto). Opcionalmente, cuando se trasplanta el injerto, el órgano o tejido que muestra fisiología o morfología patológica puede extraerse, por ejemplo, de manera que se permita el crecimiento e injerto en el injerto, por ejemplo, en el contexto de sustitución de órgano con trasplante del injerto en una localización anatómica homotópica.

50 Como se usa en el presente documento, una "localización anatómica homotópica" de un injerto cuyo tipo de órgano o tejido existe en forma de múltiples homólogos discretos (por ejemplo, riñones derecho e izquierdo, diferentes dedos en la misma mano, etc.) incluye la localización anatómica de cualquier homólogo tal.

Dependiendo de la aplicación y el fin, el injerto puede implantarse ventajosamente bajo la cápsula renal, o en el riñón, la grasa testicular, la hipodermis, el omento, la vena porta, el hígado, el bazo, la cavidad del corazón, el corazón, el páncreas y/o el espacio intrabdominal.

55 Preferentemente, el trasplante de un injerto renal de la presente invención se efectúa trasplantando el injerto en el espacio intrabdominal, o, más preferentemente en la cápsula renal. Preferentemente, el trasplante en la cápsula renal se efectúa por trasplante subcapsular. El trasplante subcapsular permite ventajosamente la inserción de un catéter que solo requiere una corta extensión a la piel en la que la orina puede drenarse del injerto renal. El trasplante intrabdominal permite ventajosamente que el uréter en desarrollo o la pelvis renal del trasplante de tejido renal cree una anastomosis al aparato excretor del huésped. Como se muestra en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos más adelante, el procedimiento puede ponerse en práctica trasplantando un injerto renal de la presente invención bajo la cápsula renal de un receptor. Alternativamente, el trasplante del injerto renal puede efectuarse trasplantando el injerto en la vena porta, el hígado, el bazo, la grasa testicular, la hipodermis o el omento.

65 El trasplante de un injerto hepático de la presente invención puede efectuarse ventajosamente trasplantando el injerto en la vena porta, el hígado, la cápsula renal, la grasa testicular, la hipodermis, el omento, el bazo y/o el

espacio intrabdominal. Preferentemente, el trasplante de un injerto hepático de la presente invención se efectúa trasplantando el injerto bajo la cápsula renal o en el bazo. Como se muestra en el Ejemplo 6 de la sección de Ejemplos más adelante, el procedimiento puede ponerse en práctica trasplantando un injerto hepático de la presente invención bajo la cápsula renal o en el bazo.

5 El trasplante de un injerto pancreático de la presente invención puede efectuarse ventajosamente trasplantando el injerto en la vena porta, el hígado, el páncreas, la grasa testicular, la hipodermis, el omento y/o el espacio intrabdominal. Preferentemente, el trasplante de un injerto pancreático de la presente invención se efectúa trasplantando el injerto bajo la cápsula renal. Preferentemente, para trasplantar un injerto pancreático en la vena porta, el injerto pancreático es un injerto de islotes pancreáticos. Como se muestra en el Ejemplo 7 de la sección de Ejemplos más adelante, el procedimiento puede ponerse en práctica trasplantando un injerto pancreático de la presente invención bajo la cápsula renal. La orientación para poner en práctica el trasplante terapéutico de injertos pancreáticos según las enseñanzas de la presente invención se proporciona en el Ejemplo 5 de la sección de Ejemplos más adelante.

15 El trasplante de un injerto cardíaco de la presente invención puede efectuarse ventajosamente, dependiendo de la aplicación y el fin, trasplantando el injerto en la cavidad del corazón, el corazón, el miocardio y el espacio intrabdominal. Como se muestra en el Ejemplo 8 de la sección de Ejemplos más adelante, el procedimiento puede ponerse en práctica trasplantando un injerto cardíaco de la presente invención bajo la cápsula renal.

20 Preferentemente, para tratar un trastorno cardíaco asociado a isquemia miocárdica, por ejemplo, debido a un infarto cardíaco, el injerto cardíaco se administra al infarto y/o al área límite del infarto. Como sabrá un experto en la materia, el área infartada es macroscópicamente visible, permitiendo que sea posible tal localización específica de aplicación de los injertos terapéuticos. La determinación precisa y el momento adecuado de una dosis eficaz en este caso particular pueden depender, por ejemplo, del tamaño de un infarto, y el tiempo transcurrido tras la aparición de isquemia miocárdica. En la técnica se da una amplia orientación para la implantación terapéutica de tejidos cardíacos, tales como un injerto cardíaco de la presente invención, en miocardio lesionado según las enseñanzas de la presente invención (se remite, por ejemplo, a: Strauer y col., 2001. Dtsch Med Wochenschr. 126:932; Strauer y col., 2002. Circulation 106:1913; Stamin y col., 2003. Lancet 361:45; Perin y col., 2003. Circulation 107:2294; Assmus y col., 2002. Circulation 106:3009; Britten y col., 2003. Circulation 108:2212; y patente de EE.UU. nº: 5.733.727, 6.395.016 y 6.592.623).

30 El trasplante de un injerto linfoide de la presente invención, tal como un injerto esplénico de la presente invención, puede efectuarse ventajosamente, dependiendo de la aplicación y el fin, trasplantando el injerto en la vena porta, el hígado, la cápsula renal, la hipodermis, el omento, el bazo y el espacio intrabdominal. Como se muestra en el Ejemplo 9 de la sección de Ejemplos más adelante, el procedimiento puede ponerse en práctica trasplantando un injerto linfoide de la presente invención bajo la cápsula renal.

35 Como se ha descrito anteriormente en este documento, dependiendo de la aplicación y el fin, el trasplante del injerto puede efectuarse trasplantando un injerto que consiste en un órgano completo o parcial. El procedimiento puede efectuarse ventajosamente trasplantando un injerto que consiste en un órgano parcial para injertos de órgano a una edad de diferenciación correspondiente a la de una edad gestacional de 5 semanas o más del órgano porcino.

40 Como se muestra en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos más adelante, el trasplante de tales injertos de órgano parcial a edades de diferenciación correspondientes a tales edades gestacionales conduce a injerto funcionante significativamente mejorado y/o diferenciación funcional y estructural del injerto con respecto a trasplantar un injerto de órgano completo.

45 Como se ha descrito anteriormente en este documento, dependiendo de la aplicación y el fin, el trasplante del injerto puede efectuarse trasplantando un injerto que consiste en diversos números de órganos, tejidos discretos y/o porciones de los mismos.

50 Por ejemplo, el trasplante de números cada vez mayores de injertos de órgano o tejido discretos puede emplearse ventajosamente para aumentar el efecto terapéutico fisiológico o físico del injerto a niveles deseados. Por ejemplo, el aumentar el número de órganos/tejidos discretos de un injerto de tejido endocrino (por ejemplo, un injerto de islotes pancreáticos) puede usarse para obtener niveles de secreción de hormona derivada de injerto suficientemente altos (por ejemplo, insulina) de manera que se logre un efecto deseado (por ejemplo, elevada capacidad de secreción de insulina). En el caso de injertos renales, el aumento del número de injertos derivados de órgano o tejido renal discreto puede usarse para obtener números suficientes de órganos renales de manera que se logre, por ejemplo, una capacidad de producción de orina suficientemente alta para aliviar o curar un trastorno renal en el sujeto.

55 Como se ha descrito anteriormente en este documento, el procedimiento de tratamiento del trastorno puede comprender ventajosamente tratar el sujeto con una pauta inmunodepresora, antes de, durante o tras el trasplante del injerto.

60 Pueden usarse diversos tipos de pautas inmunodepresoras para inmunodeprimir al sujeto.

Ejemplos de tipos adecuados de pautas inmunodepresoras incluyen administración de fármacos inmunodepresores, poblaciones de células inductoras de tolerancia y/o irradiación inmunodepresora.

Una amplia orientación para seleccionar y administrar pautas inmunodepresoras adecuadas para trasplante se proporciona en la bibliografía de la materia (por ejemplo, se remite a: Kirkpatrick CH. y Rowlands DT Jr., 1992. JAMA. 268, 2952; Higgins RM. y col., 1996. Lancet 348, 1208; Suthanthiran M. y Strom TB., 1996. New Engl. J. Med. 331, 365; Midthun DE. y col., 1997. Mayo Clin Proc. 72, 175; Morrison VA. y col., 1994. Am J Med. 97, 14; Hanto DW., 1995. Annu Rev Med. 46, 381; Senderowicz AM. y col., 1997. Ann Intern Med. 126, 882; Vincenti F. y col., 1998. New Engl. J. Med. 338, 161; Dantal J. y col. 1998. Lancet 351, 623).

Preferentemente, la pauta inmunodepresora consiste en administrar un fármaco inmunodepresor al sujeto.

Ejemplos de fármacos inmunodepresores adecuados incluyen, pero no se limitan a, CTLA4-Ig, anticuerpos anti-CD40, anticuerpos anti-ligando de CD40, anticuerpos anti-B7, anticuerpos anti-CD3 (por ejemplo, anticuerpo anti-CD3 humano OKT3), metotrexato (MTX), rapamicina, prednisona, metilprednisolona, azatiopreno, ciclosporina A (CsA), tacrolimus, ciclofosfamida y fludarabina, micofenolato mofetilo, daclizumab [un anticuerpo humanizado (Fc de IgG1) anti-cadena alfa de IL2R (CD25)] y anticuerpos anti-linfocitos T conjugados con toxinas (por ejemplo, cadena A del cólera o toxina de *Pseudomonas*).

Preferentemente, el fármaco inmunodepresor puede bloquear la unión de un co-receptor de linfocitos con un ligando de co-receptor de linfocitos relacionado del mismo.

Ejemplos de fármacos adecuados que pueden bloquear la unión de un co-receptor de linfocitos con un ligando de co-receptor de linfocitos relacionado incluyen, pero no se limitan a, CTLA4-Ig, anticuerpos anti-CD40, anticuerpos anti-ligando de CD40, anticuerpos anti-B7-1 ó 2 y anticuerpos anti-CD28.

Tales fármacos de polipéptido son particularmente ventajosos ya que éstos son, a diferencia de los fármacos inmunodepresores comúnmente usados como ciclosporina A, esencialmente no tóxicos y/o no carcinogénicos, y debido a que bloquean pasivamente las interacciones del receptor de la superficie celular, proporcionan inmunodepresión reversible y temporal del sujeto.

Preferentemente, el fármaco que puede bloquear la unión del co-receptor de linfocitos con el ligando de co-receptor de linfocitos relacionado del mismo es CTLA4-Ig. CTLA4-Ig es una proteína de fusión genéticamente manipulada de CTLA4 humano y el dominio Fc de IgG₁. Previene la activación de linfocitos T uniéndose a B7 humano, que coestimula linfocitos T mediante CD28.

Una amplia orientación para administrar fármacos inmunodepresores tales como CTLA4-Ig de manera que se facilite la inmunodepresión de un receptor de trasplante se proporciona en la bibliografía de la materia (por ejemplo, se remite a: Benhamou PY., 2002. Transplantation 73, S40; Najafian N, y Sayegh MH., 2000. Expert Opin Investig Drugs 9, 2147-57).

Preferentemente, la administración del fármaco inmunodepresor al sujeto se efectúa durante un único periodo de tiempo de 1 a 20 días, más preferentemente 1 a 18 días, más preferentemente 1 a 16 días, y lo más preferentemente 1 a 14 días, como se describe en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos que sigue.

Como se describe y se muestra en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos más adelante, el trasplante de un injerto no singénico, tal como un injerto xenógeno, conjuntamente con la administración de CTLA4-Ig a un sujeto inmunocompetente normal según el protocolo expuesto en este respecto puede usarse para generar órganos/tejidos estructuralmente y funcionalmente diferenciados óptimamente tolerados por linfocitos del sujeto.

Como tal, el procedimiento de la presente invención es superior a todos los procedimientos de la técnica anterior para tratar trastornos por trasplante de órganos/tejidos no singénicos o en desarrollo, ya que puede realizarse satisfactoriamente por administración temporal de un bloqueante de la interacción de co-receptor de linfocitos-ligando de co-receptor de linfocitos, en lugar de la administración permanente de agentes inmunodepresores perjudiciales tales como ciclosporina A, el procedimiento convencional empleado en la técnica anterior.

Aunque el procedimiento puede ponerse en práctica para tratar el trastorno en un sujeto de esencialmente cualquier especie de mamífero, el procedimiento se usa preferentemente para tratar el trastorno en un sujeto humano.

El procedimiento puede usarse para tratar esencialmente cualquier trastorno asociado a fisiología o morfología patológica de órgano o tejido que es susceptible a tratamiento mediante trasplante.

Tales trastornos incluyen trastornos renales, pancreáticos, cardíacos, hepáticos, hematológicos, genéticos, pulmonares, cerebrales, gastrointestinales, musculares, endocrinos, óseos, neurales, metabólicos, dérmicos, cosméticos, oftalmológicos y vasculares.

Preferentemente, el procedimiento se usa para tratar un trastorno renal, hepático, pancreático, cardíaco, genético y/o hematológico.

El procedimiento puede usarse para tratar cualquiera de diversos trastornos de tales tipos.

5 Ejemplos de trastornos renales que pueden tratarse usando un injerto renal de la presente invención incluyen insuficiencia renal aguda, síndrome nefrítico agudo, nefropatía analgésica, enfermedad renal ateroembólica, insuficiencia renal crónica, nefritis crónica, síndrome nefrítico congénito, enfermedad renal terminal, síndrome de Goodpasture, glomerulonefritis proliferativa mesangial con IgM, nefritis intersticial, cáncer de riñón, lesión renal, infección renal, lesión renal, cálculos renales, nefritis lúpica, glomerulonefritis membranoproliferativa I, glomerulonefritis membranoproliferativa II, nefropatía membranosa, glomerulonefritis necrotizante, nefroblastoma, nefrocalcinosis, diabetes insípida nefrogénica, nefropatía mediada por IgA, nefrosis, síndrome nefrítico, enfermedad del riñón poliúístico, glomerulonefritis pos-estreptocócica, nefropatía por reflujo, embolia de la arteria renal, estenosis de la arteria renal, necrosis papilar renal, acidosis tubular renal tipo I, acidosis tubular renal tipo II, perfusión renal disminuida y trombosis de la vena renal.

Ejemplos de trastornos pancreáticos que pueden tratarse usando un injerto pancreático de la presente invención incluyen diabetes tipo I o tipo II.

20 Preferentemente, el procedimiento se usa para tratar diabetes tipo I ("diabetes").

Ejemplos de trastornos hepáticos que pueden tratarse usando un injerto hepático de la presente invención incluyen infección por hepatitis C (Rosen HR., 2003, cirrosis hepática, colangitis esclerosante primaria (Crippin JS., 2002. Can J Gastroenterol. 16:700), carcinoma hepatocelular (Molmenti EP, Klintmalm GB., 2001. J Hepatobiliary Pancreat Surg. 8:427-34), enfermedad hepática alcohólica (Podevin P. y col., 2001. J Chir (Paris). 138:147) y hepatitis B (Samuel D., 2000. Acta Gastroenterol Belg. 63:197-9).

30 En el caso de trastornos cardíacos, los trastornos que pueden tratarse usando un injerto cardíaco de la presente invención incluyen insuficiencia cardíaca isquémica (Pouzet B. y col., 2001. J Soc Biol. 195:47-9), arritmia ventricular (Olivari MT, Windle JR., 2000. J Heart Lung Transplant. 19:S38-42), insuficiencia cardíaca (Koerner MM., 2000. Curr Opin Cardiol. 15:178-82), defectos del corazón congénitos (Speziali G. y col., 1998. Mayo Clin Proc. 73:923) y tumores cardíacos (Michler RE, Goldstein DJ., 1997. Semin Oncol. 24:534-9).

35 Se apreciará que como un injerto linfóide de la presente invención puede usarse para generar células/tejidos mesenquimatosos/del estroma linfoides derivados de injerto bien diferenciados y vascularizados, que el trasplante de tales injertos puede usarse para tratar cualquiera de las diversas enfermedades hematológicas y/o genéticas, tales como trastornos de la coagulación/deficiencias del factor de coagulación tales como hemofilia (Liu y col., 1994. Transpl Int. 7:201) y enfermedades de almacenamiento lisosómico/deficiencias enzimáticas tales como enfermedad de Gaucher (Groth CG. y col., Birth Defects Orig Artic Ser. 9:102-5).

40 Se apreciará adicionalmente que, debido a que se permite la generación de tejidos del estroma linfoides derivados de injerto bien diferenciados y vascularizados, el trasplante de un injerto linfóide de la presente invención puede usarse para permitir la diferenciación de tejido linfóide derivado de huésped, y de ahí que pueda usarse para tratar en el huésped una enfermedad asociada a un defecto en el estroma linfóide, tal como un defecto en el estroma linfóide que produce crecimiento y/o diferenciación celular hematológico alterado.

Debido a que se permite la generación de tejidos linfoides bien diferenciados y vascularizados, el trasplante de un injerto linfóide de la presente invención puede usarse para tratar cualquiera de los diversos trastornos asociados a la inmunidad.

50 Como se usa en el presente documento, el término "trastornos asociados a la inmunidad" se refiere a cualquier enfermedad asociada a una inmunodeficiencia, una respuesta inmunitaria patógena y/o una respuesta inmunitaria posiblemente terapéutica.

55 Un experto habitual en la materia se dará cuenta que, debido a la capacidad de tejidos linfoides para soportar el crecimiento y diferenciación de células efectoras inmunes, tales como linfocitos B, linfocitos T, linfocitos citotóxicos espontáneos (NK), granulocitos, macrófagos, además de citoblastos hematopoyéticos (HSC), un injerto linfóide de la presente invención, tal como un injerto esplénico de la presente invención, puede proporcionar funcionalidad efectora inmunitaria, inmunorregulación correctora y soportar la diferenciación de diversos linajes hematopoyéticos, y de ahí que el trasplante de un injerto tal pueda usarse para tratar esencialmente cualquier trastorno asociado a la inmunidad.

65 Ejemplos de enfermedades de inmunodeficiencia que pueden tratarse por trasplante de un injerto linfóide de la presente invención incluyen síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) producido por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), inmunodeficiencias combinadas graves (SCID), tales como deficiencia de adenosina desaminasa (ADA) e inmunodeficiencias resultantes de mielorreducción/mieloablación terapéutica, tales

como en el contexto de terapia de cánceres, tales como tumores malignos hematológicos. Un injerto linfoide de la presente invención permitirá la reconstitución inmunitaria terapéutica de un sujeto inmunodeficiente en tales contextos. El experto en la materia poseerá la experiencia necesaria para tratar una enfermedad de inmunodeficiencia por trasplante de un injerto de órgano/tejido linfoide de la presente invención según las enseñanzas de la presente invención, y tendrá una amplia orientación disponible para poner en práctica este aspecto del procedimiento de la presente invención en la bibliografía de la materia (se remite, por ejemplo, a: Fischer A. y col., 1998. Springer Semin Immunopathol. 19:479-92; Kane L. y col., 2001. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 85:F110; Horwitz ME., 2000. Pediatr Clin North Am. 47:1371; Friedrich W., 1996. Ann Med. 28:115-9; Parkman R., 1993. Leukemia. 7:1100-2). Se apreciará por el experto en la materia que este aspecto del procedimiento de la presente invención servirá para tratar cualquiera de las diversas enfermedades infecciosas en un sujeto cuyo propio sistema inmunitario no organiza respuestas inmunitarias protectoras adecuadas. Tales enfermedades infecciosas incluyen aquellas producidas por patógenos microbianos tales como virus, bacterias, micoplasmas, protozoos, hongos, y similares.

Ejemplos de enfermedades asociadas a una respuesta inmunitaria posiblemente terapéutica también incluyen tumores malignos. El experto en la materia poseerá la experiencia necesaria para tratar una enfermedad hematológica y/o genética por trasplante de un injerto de órgano/tejido linfoide de la presente invención según las enseñanzas de la presente invención, y tendrá una amplia orientación disponible para poner en práctica este aspecto del procedimiento de la presente invención en la bibliografía de la materia (se remite, por ejemplo, a: Toungouz M, Goldman M. y col., 2001. Adv Nephrol Necker Hosp. 31:257-72; Parkman R., 1993. Leukemia. 7:1100-2; Porter DL., 2001. J Hematother Stem Cell Res. 10:465-80).

Ejemplos de enfermedades asociadas a respuestas inmunitarias patógenas incluyen enfermedades autoinmunitarias. Debido a que se proporciona el trasplante de células efectoras inmunitarias inmunorreguladoras de un injerto linfoide adecuado de la presente invención, tal como uno que incluye linfocitos T supresores adecuados, puede usarse para suprimir respuestas inmunitarias patógenas. El experto en la materia poseerá la experiencia necesaria para tratar una enfermedad asociada a una respuesta inmunitaria patológica por trasplante de un injerto de órgano/tejido linfoide de la presente invención según las enseñanzas de la presente invención, y tendrá una amplia orientación disponible para poner en práctica este aspecto del procedimiento de la presente invención en la bibliografía de la materia (se remite, por ejemplo, a: Toungouz M, Goldman M. y col., 2001. Adv Nephrol Necker Hosp. 31:257-72; Moore J, Brooks P., 2001. 23:193-213).

Tras el trasplante, el crecimiento y/o diferenciación del injerto, y el efecto terapéutico del injerto, pueden monitorizarse ventajosamente.

Por ejemplo, como se describe en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos más adelante, la funcionalidad de un injerto renal de la presente invención puede monitorizarse ventajosamente tras el trasplante por análisis de producción de fluido por el injerto, en particular por análisis de fluido tal para metabolito específico de orina o por contenido de producto. Las concentraciones en plasma anteriores de subproductos específicos de orina, tales como, por ejemplo, nitrógeno ureico y creatinina son indicativos de la funcionalidad del injerto.

Como se describe en el Ejemplo 5 de la sección de Ejemplos más adelante, la funcionalidad del injerto de islotes pancreáticos puede monitorizarse ventajosamente analizando niveles de glucosa en suero. La normalización de niveles de glucosa en suero en el suero de un sujeto diabético tras el trasplante de un injerto de islotes pancreáticos es indicativo de funcionalidad del injerto (es decir, secreción de insulina fisiológicamente regulada por el injerto).

La funcionalidad de un injerto esplénico de la presente invención puede monitorizarse fácilmente tras el trasplante mediante numerosos ensayos rutinariamente puestos en práctica por el experto en la materia, que incluyen mediante análisis de proteínas específicas del metabolismo del hígado apropiadas en el suero del sujeto.

Por tanto, la funcionalidad de un injerto cardíaco de la presente invención también puede monitorizarse convenientemente tras el trasplante mediante numerosos procedimientos puestos en práctica por el experto en la materia, que incluyen mediante ecocardiografía, electrocardiografía y análisis de proteínas específicas de la función cardíaca en el suero del sujeto, dependiendo de la aplicación y el fin.

Además, la funcionalidad de un injerto linfoide de la presente invención puede monitorizarse similarmente tras el trasplante, dependiendo de la aplicación y el fin, mediante numerosos procedimientos rutinariamente puestos en práctica por el experto en la materia, por ejemplo, mediante recolección de glóbulos sanguíneos periféricos del sujeto y análisis de los mismos con respecto a tipos de células apropiadas por citometría de flujo activada por fluorescencia (FACS), mediante ensayos de estimulación de linfocitos específicos de antígeno apropiados y mediante ensayo de citocinas, quimiocinas, anticuerpos, factores de coagulación, enzimas de almacenamiento lisosómico apropiadas y similares en el suero del sujeto mediante ELISA, o mediante ensayo de tales moléculas en los glóbulos sanguíneos del sujeto mediante FACS.

Tras el trasplante, la tolerancia inmunológica del sujeto al injerto, y/o el crecimiento y diferenciación del injerto, pueden monitorizarse ventajosamente.

Pueden emplearse diversos procedimientos para evaluar la tolerancia inmunológica del sujeto al injerto.

5 Por ejemplo, la tolerancia puede evaluarse monitorizando la infiltración de leucocitos específica del sujeto o específica de linfocitos T del injerto, monitorizando el origen de la vasculatura del injerto y/o monitorizando el aspecto histológico de estructuras específicas de órgano o tejido. Tal monitorización puede efectuarse ventajosamente como se describe en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos más adelante. La infiltración de leucocitos, neutrófilos, linfocitos citotóxicos espontáneos o linfocitos T del sujeto en el injerto, o la falta de la misma, son normalmente indicativos de injerto funcionante insuficiente u óptimo del injerto en el sujeto, respectivamente.

10 En casos en los que la tolerancia del sujeto del injerto sea insuficiente, ventajosamente puede realizarse tratamiento inmunodepresor auxiliar terapéutico del sujeto, como se ha descrito anteriormente en este documento.

15 Aunque la presente invención se reduce a la práctica, órganos/tejidos a edades definidas de diferenciación correspondientes a una edad gestacional específica encontrada que no expresan o presentan una molécula que pueda estimular o potenciar una respuesta inmunitaria antes de y/o tras el trasplante del mismo en un receptor revelaron inesperadamente que podían generar órganos/tejidos estructuralmente y funcionalmente diferenciados óptimamente tolerados por linfocitos no singénicos cuando se trasplantan en un sujeto.

20 Así, según otro aspecto de la presente invención se proporciona un procedimiento de evaluación de la idoneidad de un órgano o tejido de mamífero a una edad de diferenciación correspondiente a una edad gestacional específica para trasplante de un injerto del órgano o tejido en un sujeto mamífero.

25 El procedimiento se efectúa preferentemente evaluando un trasplante de prueba tomado del órgano o tejido para la expresión o presentación de la molécula que puede estimular o potenciar una respuesta inmunitaria (en lo sucesivo "la molécula") en el sujeto antes de y/o tras el trasplante del trasplante de prueba en un receptor de prueba mamífero.

30 Según las enseñanzas de la presente invención, una trasplante de prueba que se encuentra que no expresa o presenta sustancialmente la molécula antes de y/o tras el trasplante del trasplante de prueba en el receptor de prueba será óptimo para trasplante. En general, cuanto menor sea el nivel de expresión o presentación de la molécula en el trasplante de prueba, más adecuado será el injerto de órgano o tejido para el trasplante. En particular, cuanto menor sea el nivel de expresión o presentación de la molécula en el trasplante de prueba, más óptimamente se diferenciará el injerto estructuralmente, se diferenciará funcionalmente y será tolerado por linfocitos no singénicos tras el trasplante en el sujeto.

35 Se apreciará que como los trasplantes de prueba a edades de diferenciación correspondientes a diversas edades gestacionales pueden probarse para la expresión de la molécula, el procedimiento según este aspecto de la presente invención permite la identificación de una edad óptima de diferenciación del órgano o tejido para trasplante de un injerto del mismo en el sujeto.

40 Según las enseñanzas de la presente invención, la prueba del trasplante de prueba para la presencia de la molécula se efectúa preferentemente antes del trasplante del trasplante de prueba en el receptor de prueba, y/o tras un periodo después del trasplante seleccionado de un intervalo de 1 segundo a 45 días, dependiendo del tipo de molécula probada, como se describe en detalle adicional en el presente documento más adelante.

45 El procedimiento según este aspecto de la presente invención puede ponerse en práctica usando un receptor de prueba de cualquiera de las diversas especies de mamífero, y/o que muestran cualquiera de las diversas características, dependiendo de la aplicación y el fin.

50 Según las enseñanzas de la presente invención, el receptor de prueba es preferentemente un roedor, y/o el sujeto.

Preferentemente, el roedor es un ratón.

55 El uso de un ratón como receptor de prueba es altamente ventajoso ya que esta especie, por numerosos motivos, es de lejos el mamífero experimental más conveniente, económico y eficaz disponible.

Según enseñanzas adicionales de la presente invención, el receptor de prueba posee linfocitos T humanos funcionales.

60 Preferentemente, los linfocitos humanos T son no singénicos con el órgano o tejido.

Como se describe e ilustra enérgicamente en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos más adelante, el procedimiento puede ponerse eficazmente en práctica trasplantando un trasplante de prueba humano en un receptor de prueba portador de linfocitos humanos T no singénicos con el órgano o tejido.

65

Así, el procedimiento de evaluación de la edad de diferenciación de un injerto más adecuada para trasplante de la presente invención es única y óptima con respecto a todos aquellos procedimientos de la técnica anterior, y puede usarse convenientemente para identificar la edad de diferenciación o gestación de esencialmente cualquier tipo de órgano o tejido óptimamente adecuado para trasplante terapéutico de un injerto del mismo en un ser humano.

5 Aunque el procedimiento según este aspecto de la presente invención puede ponerse en práctica usando un injerto derivado de esencialmente cualquier especie de mamífero, el órgano o tejido es preferentemente un órgano o tejido porcino, más preferentemente un órgano o tejido humano.

10 Alternativamente, el procedimiento puede efectuarse ventajosamente usando un órgano o tejido porcino a una edad específica de diferenciación seleccionada correspondiente a 20 a 63 días de gestación, más preferentemente 20 a 56 días de gestación, más preferentemente 20 a 42 días de gestación, más preferentemente 20 a 35 días de gestación, más preferentemente 20 a 28 días de gestación, más preferentemente 24 a 28 días de gestación, y lo más preferentemente 27 a 28 días de gestación.

15 El procedimiento de evaluación de la edad de diferenciación de un injerto adecuado para trasplante de la presente invención puede efectuarse probando el injerto de prueba para cualquiera de los diversos tipos de moléculas que pueden estimular o potenciar una respuesta inmunitaria en el sujeto.

20 Ejemplos de tales tipos de moléculas incluyen citocinas, quimiocinas, mediadores inflamatorios, receptores de células inmunitarias, co-receptores de células inmunitarias, moléculas del MHC, moléculas presentadoras de antígeno, moléculas de adhesión, mediadores de inmunidad innata, mediadores de apoptosis, metaloproteínas, inmunomoduladores, co-receptores de linfocitos y ligandos de co-receptor de linfocitos.

25 Preferentemente, un injerto adecuado para trasplante no expresa o presenta sustancialmente un co-receptor de linfocitos o ligando de co-receptor de linfocitos.

Ejemplos de tales co-receptores de linfocitos y ligandos de co-receptor de linfocitos incluyen CD28, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), CD40, CD40L (ligando CD40, CD154), CD2, CD58 [antígeno-3 asociado a la función de linfocitos (LFA-3)], molécula-1 de adhesión intercelular (ICAM-1) y antígeno-1 asociado a la función de linfocitos (LFA-1).

30 Preferentemente, un injerto adecuado para trasplante no expresa o presenta sustancialmente B7-1, más preferentemente CD40 o CD40L, más preferentemente CD40 y CD40L, y lo más preferentemente B7-1, CD40 y CD40L.

35 Como se ha mencionado anteriormente en este documento, la prueba del trasplante de prueba para la presencia de la molécula se efectúa preferentemente antes del trasplante del trasplante de prueba en el receptor de prueba, y/o tras un periodo después del trasplante seleccionado de un intervalo de 1 segundo a 45 días, dependiendo del tipo de molécula probada.

40 Preferentemente, la prueba del trasplante de prueba para la presencia de CD40 o CD40L se efectúa tanto antes de como tras el trasplante del trasplante de prueba en el receptor de prueba.

45 Preferentemente, la prueba del trasplante de prueba para la presencia de CD40 tras el trasplante del trasplante de prueba en el receptor de prueba se efectúa tras un periodo después del trasplante del trasplante de prueba seleccionado de un intervalo de 1 segundo a 45 días, más preferentemente 11 días a 45 días, más preferentemente 11 días a 42 días, más preferentemente 11 días a 31 días, y lo más preferentemente 14 días a 28 días.

50 Preferentemente, la prueba del trasplante de prueba para la presencia de CD40L tras el trasplante del trasplante de prueba en el receptor de prueba se efectúa tras un periodo después del trasplante del trasplante de prueba seleccionado de un intervalo de: 1 segundo a 45 días; más preferentemente 11 días a 45 días; más preferentemente 14 días a 45 días; más preferentemente 14 días a 31 días; más preferentemente 17 días a 31 días o 14 días a 28 días; más preferentemente 25 días a 31 días; más preferentemente 27 días a 29 días; más preferentemente 27,5 días a 28,5 días; y lo más preferentemente 28 días.

55 Preferentemente, la prueba del trasplante de prueba para la presencia de B7-1 se efectúa antes del trasplante del trasplante de prueba.

60 Como se describe y se muestra en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos más adelante, injertos que no expresan sustancialmente B7-1, CD40 y CD40L en los periodos antes del trasplante/después del trasplante del trasplante de prueba óptimos respectivos expuestos anteriormente en este documento son adecuados para trasplante. En particular, tales injertos pueden generar órganos/tejidos estructuralmente y funcionalmente diferenciados óptimamente tolerados por linfocitos humanos no singénicos/alorreactivos.

65 Aunque no se desea quedar ligado a paradigma, los presentes inventores son de la opinión de que un injerto que no expresa o presenta sustancialmente tales moléculas, que son moléculas de células presentadoras de antígeno

específicas importantes, es óptimamente tolerado por un sujeto alógeno o xenógeno al menos parcialmente como resultado de tales injertos que carecen sustancialmente de células presentadoras de antígeno que se ha propuesto en la materia que son críticas para la activación del rechazo del injerto.

5 Numerosos procedimientos, muy conocidos para el experto en la materia, pueden usarse para analizar un órgano, un tejido o células, tales como el injerto de prueba o una porción del mismo, para la expresión o presentación de una molécula específica.

10 En casos en los que la molécula sea una molécula de proteína o de ARN, la expresión o presentación de la molécula se evalúa preferentemente por análisis de células o tejidos para la presencia de ARNm que codifica la molécula de proteína, o para la presencia de la molécula de ARN, respectivamente.

15 El análisis de una molécula de ARNm o ARN en células o tejidos se efectúa preferentemente por análisis por RT-PCR. El análisis por RT-PCR puede realizarse ventajosamente como se describe e ilustra en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos, más adelante. Alternativamente, el análisis de la presencia de una molécula de ARNm o ARN en células puede realizarse por modificaciones del protocolo de RT-PCR descrito en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos, más adelante (por ejemplo, usando una fase de PCR anidada, RT-PCR competitiva, etc.), por transferencia Northern, o por análisis de micromatrices.

20 Alternativamente, la expresión o presentación de la molécula de proteína puede detectarse directamente detectando directamente la molécula de proteína usando diversas técnicas bioquímicas.

25 Diversos procedimientos de detección de la expresión o presentación de una proteína específica en un órgano, tejido o células son muy conocidos para aquellos expertos habituales en la materia. Tales procedimientos incluyen citometría de flujo por inmunofluorescencia, análisis de inmunotransferencia Western, hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), hibridación de micromatrices, microscopía confocal de inmunofluorescencia, y similares.

30 En casos en los que la molécula sea una proteína se prueban la expresión o presentación de tanto la molécula, además del ARNm que codifica la molécula.

35 En casos en los que la molécula sea una proteína, un injerto óptimo es uno que no expresa sustancialmente la molécula, más preferentemente el ARNm que codifica la molécula, o lo más preferentemente tanto la molécula como el ARNm que codifica la molécula.

40 Según las enseñanzas de la presente invención, la evaluación de la idoneidad del injerto para trasplante puede comprender ventajosamente analizar injertos para la expresión o presentación de niveles sustancialmente menores que órganos/tejidos de tipo injerto de edad adulta de las moléculas relacionadas con la inmunidad enumeradas en la Tabla 3 de la sección de Ejemplos más adelante y en la malla mundial/internet (<http://www.weizmann.ac.il/immunology/reisner/inmunogenicity.xls>).

45 Como se describe e ilustra en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos más adelante, los injertos que expresan niveles sustancialmente menores de tales moléculas relacionadas con la inmunidad que los órganos/tejidos de tipo injerto de edad adulta son más adecuados para el trasplante que los últimos. Un injerto que expresa o muestra niveles sustancialmente menores que los órganos/tejidos de edad adulta del tipo de tejido de órgano de injerto del mayor número posible de tales moléculas relacionadas con la inmunidad puede ser óptimamente adecuado para trasplante.

50 Preferentemente, el análisis de expresión o presentación de tales moléculas relacionadas con la inmunidad en el injerto se efectúa por análisis de hibridación de micromatrices de ARNm derivado de injerto, preferentemente como se describe e ilustra en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos, más adelante.

55 Alternativamente, el análisis de expresión o presentación de tales moléculas relacionadas con la inmunidad en el injerto puede efectuarse usando cualquiera de las técnicas analíticas descritas anteriormente en este documento para el análisis del injerto para la expresión o presentación de la molécula que puede estimular o potenciar una respuesta inmunitaria en el sujeto.

60 Así, la presente invención puede usarse para tratar óptimamente trastornos usando trasplante de injertos derivados de órgano o tejido no singénico o en desarrollo, y para identificar injertos de órgano o tejido óptimamente adecuados para poner en práctica el trasplante terapéutico.

65 El procedimiento de trasplante terapéutico de la presente invención es único y espectacularmente superior con respecto a todos aquellos procedimientos de la técnica anterior, ya que permite por primera vez el tratamiento generalizado óptimo de los muy diversos trastornos susceptibles a trasplante terapéutico en seres humanos por trasplante de aloinjerto y/o xenoinjerto sin, o con inmunodepresión mínima de los receptores del injerto, usando tanto injertos xenógenos o alógenos en desarrollo que están, respectivamente, en suministro esencialmente ilimitado,

como de esencialmente cualquier referencia alógena.

Se espera que durante la vida de esta patente se desarrollen muchas técnicas de diagnóstico médico relevantes y que el alcance del término "procedimiento de evaluación de la edad de diferenciación de un órgano de mamífero más adecuada para trasplante del mismo en un sujeto mamífero" pretenda incluir todas aquellas nuevas tecnologías *a priori*.

Objetivos adicionales, ventajas y características novedosas de la presente invención serán evidentes para un experto habitual en la materia tras examen de los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención como se han descrito anteriormente en este documento y como se reivindican en la sección de reivindicaciones más adelante encuentran soporte experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención en un modo no limitante.

Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Sambrook y col., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel y col., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson y col., "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren y col. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", vol. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías expuestas en las patentes de EE.UU. nº 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", volúmenes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" volúmenes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites y col. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., Nueva York (1980); inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak y col., "Strategies for Protein Purification and Characterization -A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996); todas las cuales incorporan por referencia como si se expusieran completamente en el presente documento. Otras referencias generales se proporcionan en todo este documento. Los procedimientos en este respecto se cree que son muy conocidos en la técnica y se proporcionan para comodidad del lector.

Los ejemplos marcados como ejemplos de referencia contienen una parte que se refiere a tejidos embrionarios humanos que no es parte de la invención.

EJEMPLO 1 de referencia

El trasplante de órganos/tejidos renales humanos o porcinos de edad gestacional temprana genera órganos/tejidos renales estructuralmente y funcionalmente diferenciados tolerados por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos

Enfermedades de órganos/tejidos para las que el trasplante de órgano/tejido de donante alógeno sigue siendo la opción terapéutica óptima, tal como enfermedad renal, son altamente debilitantes y están asociadas a tasas de mortalidad significativas. Sin embargo, el trasplante de órgano/tejido de donante alógeno es frecuentemente imposible de implementar debido a la dificultad de encontrar un donante de órgano/tejido del mismo haplotipo. Además, incluso cuando se encuentre un donante coincidente, con el fin de prevenir el rechazo de injerto, tal trasplante requiere inmunodepresión permanente del receptor del injerto, normalmente mediante la administración de fármacos inmunodepresores tóxicos tales como ciclosporina A. Tales tratamientos inmunodepresores contribuyen a los inconvenientes del trasplante alógeno, ya que éstos son frecuentemente insatisfactorios en prevenir el rechazo del injerto a corto plazo, y son generalmente incapaces de prevenir indefinidamente el rechazo del injerto. Una alternativa al trasplante de aloinjerto implica el trasplante de xenoinjertos, en particular injertos porcinos, que se consideran la alternativa animal óptima a los injertos humanos. Sin embargo, los xenoinjertos generalmente no pueden usarse para trasplante debido a la tolerancia altamente insuficiente de tales injertos por los linfocitos humanos. Así, son altamente deseados órganos/tejidos adecuados para el trasplante terapéutico en seres humanos y tolerados por linfocitos humanos no singénicos, y fuentes adecuadas de tales órganos/tejidos. Una estrategia

propuesta para proporcionar tales órganos/tejidos implica usar injertos a edades de desarrollo tempranas, ya que se ha demostrado que cuanto más temprana sea la edad de desarrollo de un órgano/tejido, mejor será tolerado cuando se trasplante en un huésped no singénico. Sin embargo, hasta la fecha no se han conseguido crecimiento y diferenciación satisfactorios de injertos de órgano/tejido en desarrollo o no singénicos, y tolerancia inmunológica satisfactoria de tales injertos por linfocitos humanos en ausencia de teratomas derivados del injerto.

Mientras se concebía la presente invención, se supuso que existe una edad de desarrollo durante la cual los órganos/tejidos se diferencian suficientemente para comprometerse al desarrollo específico de órganos/tejidos en ausencia de teratomas derivados del injerto, aunque no se diferencian suficientemente de manera que sean óptimamente tolerados cuando se trasplantan en un huésped no singénico. Aunque la presente invención se reduce a la práctica, se descubrió inesperadamente la existencia de edades gestacionales específicas durante las que órganos/tejidos humanos o porcinos pueden trasplantarse en un huésped de manera que generen, en ausencia de teratomas derivados del injerto, órganos/tejidos derivados de injerto estructuralmente y funcionalmente diferenciados que son óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos en el huésped. En particular, se descubrió inesperadamente la existencia de edades gestacionales específicas durante las cuales órganos/tejidos renales humanos o porcinos pueden trasplantarse en un receptor de manera que generen, en ausencia de teratomas derivados del injerto, óptimamente órganos renales estructuralmente y funcionalmente diferenciados que son óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos en el receptor, como se describe a continuación y/o como se ha descrito previamente (Dekel B. y col., 2002. Nature Medicine).

Materiales y métodos:

Preparación de huéspedes de trasplantes murinos: Ratones Balb/c de tres meses de edad (Harlan Olac, Shaw's Farm, Blackthorn, Bicester, Oxon., RU) se usaron como huéspedes para los estudios de trasplante. Para la generación de receptores inmunodeficientes, ratones Balb/c se irradiaron letalmente por irradiación corporal total de dosis fraccionadas (TBI; 3,5 Gy seguido 3 días después por 9,5 Gy) por una fuente de rayos gamma de (60)Co de 150-A (producida por la Comisión de Energía Atómica de Canadá, Kanata, Ontario) con una distancia de piel focal de 75 centímetros y una tasa de dosis de 0,7 Gy/minuto, como se ha descrito previamente (Lubin I. y col., 1994. Blood 83, 2368; Reisner, Y. y Dagan, S., 1998. Trends Biotechnol. 16, 242-246; Segall, H. y col., 1996. Blood 88, 721-730). Células de la médula ósea de ratones NOD/SCID (Centro de Cría de Animales del Instituto Weizmann, Rehovot, Israel) se lavaron de las diáfisis del fémur y tibia de ratones de 4-8 semanas de edad, como se ha descrito previamente (Levite M. y col., 1995. Cell Immunol. 162, 138). Los ratones Balb/c receptores se inmunorreconstituyeron con 3×10^6 células de la médula ósea de ratones NOD/SCID administradas intravenosamente en 1 mililitro de solución salina tamponada con fosfato un día tras la segunda fracción de irradiación corporal total (TBI) como se ha descrito previamente (Reisner, Y. y Dagan, S., 1998. Trends Biotechnol. 16, 242-246; Segall, H. y col., 1996. Blood 88, 721-730). Se ha mostrado que los animales similares a ratones SCID (inmunodeficiencia combinada grave) resultantes permitieron un excelente injerto en células hematopoyéticas o tejidos sólidos humanos funcionantes (Marcus H. y col., 1995. Blood 86, 398; Segall H. y col., 1996. Blood 88, 88; Reisner Y. y Dagan S., 1998. Trends Biotechnol. 16, 242; Bocher WO. y col., 2001. Eur J Immunol. 31, 2071). Los ratones NOD/SCID donantes se obtuvieron del Centro de Cría de Animales del Instituto Weizmann, Rehovot, Israel, y los experimentos con animales se llevaron a cabo según la Guía del Instituto Nacional de Salud para Cuidado y Uso de Animales Experimentales y se aprobaron por el Comité de Cuidado Animal del Instituto Weizmann de Ciencias.

Recolección de tejido renal en desarrollo: Se obtuvieron tejidos renales humanos en desarrollo por raspado con la autorización de un Comité de Helsinki y los tejidos renales en desarrollo se diseccionaron quirúrgicamente de embriones bajo un estereoscopio de disección como se ha descrito previamente (Rogers S. y col., 1998. Kidney Int. 54, 27). Se obtuvieron especímenes de riñón adulto de riñones normales extirpados para carcinoma de células claras de etapa I. Se obtuvieron tejidos renales porcinos de edad gestacional y adultos con la ayuda del Instituto Lahav para Investigación Animal, Kibbutz Lahav. Los tejidos renales porcinos de edad gestacional se aislaron de animales usando técnicas previamente descritas (Rogers S. y col., 1998. Kidney Int. 54, 27). Todos los especímenes para análisis de expresión génica se congelaron criogénicamente en nitrógeno líquido. Los tejidos para trasplante se mantuvieron en condiciones estériles a 4 °C (durante aproximadamente 2 horas) en tanto RPMI 1640 como medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con 10 % de suero bovino fetal (Biological Industries, Beit HaEmek, Israel).

Trasplante de tejido renal en desarrollo: El trasplante de tejido renal bajo la cápsula renal de ratones receptores se realizó como se ha descrito previamente (Dekel, B. y col., 1997. Transplantation 64, 1541-1550). Precursores de riñón humano (a hasta 8 semanas de gestación) o porcino (a hasta 4 semanas de gestación) completo o fragmentos completos o de 1-2 mm de diámetro de tejidos renales en edades tardías de gestación se usaron en los trasplantes. El trasplante se realizó 7-10 días tras la reconstitución de huéspedes irradiados con médula ósea NOD/SCID. Para ensayos de crecimiento, tejidos renales se trasplantaron en ratones receptores SCID. Para trasplante, los tejidos renales se mantuvieron en condiciones estériles a 4 °C durante aproximadamente dos horas en tanto RPMI 1640 como medio Eagle modificado por Dulbecco complementado con 10 % de suero bovino fetal (SBF; Biological Industries, Beit Haemek, Israel). El trasplante de tejidos renales se realizó bajo anestesia general inducida por inyección intraperitoneal de 2,5 % de Avertin en solución salina tamponada con fosfato (10 mililitros por kilogramo de

peso corporal). Ambos riñones del huésped se expusieron mediante una incisión bilateral, se hizo una incisión de 1,5 mm en el extremo caudal de la cápsula renal, y un fragmento de aproximadamente un milímetro cúbico de tejido renal se implantó bajo cada cápsula renal. Los tejidos renales también se trasplantaron intrabdominalmente para controlar el inmunoprivilegio específico del espacio subcapsular renal. En algunos experimentos, tejidos renales se implantaron y se suturaron (sutura 5-0) sobre la almohadilla de grasa testicular conjuntamente con una nefrectomía izquierda. Los ratones trasplantados se trataron posoperatoriamente con ciprofloxacina en su agua de bebida durante 7 días.

Injerto en ratones de CMSP humanas: Uno a tres días tras el trasplante de tejido renal, como se ha descrito anteriormente, 10⁸ CMSP humanas se inyectaron intraperitonealmente en ratones huésped. Los ratones de control no recibieron CMSP humanas. La generación de CMSP humanas, su infusión en ratones receptores y el análisis del injerto en células infundidas se realizaron como se ha descrito previamente (Segall, H. y col., 1996. Blood 88, 721-730). CMSP humanas se generaron de capas leucocíticas obtenidas de voluntarios normales, del siguiente modo. Se revisieron muestras de sangre sobre un cojín de disolución Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Noruega) y se centrifugaron a 2.000 rpm durante 20 minutos. La capa de separación se recogió y se lavó dos veces, y las células se contaron y se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) a la concentración deseada. Para análisis del injerto en linfocitos humano, las células se recuperaron del peritoneo 10 a 14 días tras la infusión de CMSP. Suspensiones de una sola célula se incubaron durante 30 minutos sobre hielo con anticuerpos anti-CD3 humano-PE y CD45-PerCP marcados (antígeno leucocitario pan-humano) (Becton-Dickinson, Mountain View, CA). Después de lavar se realizaron análisis fluorescentes de dos o tres colores de estos antígenos humanos usando un analizador FACScan (Becton-Dickinson). Los datos se recogieron de linfocitos selectivamente seleccionados mediante características de dispersión hacia adelante y lateral convencionales.

En ciertos experimentos, infusiones de PBMC dobles de donantes humanos separados se administraron a ratones receptores del injerto.

Análisis de infiltración, crecimiento y diferenciación del injerto: La infiltración de células inmunitarias humanas, además del crecimiento y desarrollo de injertos derivados de tejido renal en glomérulos y túbulos maduros tras el trasplante, se monitorizó del siguiente modo. Los receptores del injerto se sacrificaron 4-10 semanas después del trasplante, como se indica. Entonces, los riñones de los receptores y sus cápsulas se extrajeron y se fijaron en 10 % de parafina. Los trasplantes se seccionaron y se montaron sobre portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina y las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Para determinar el crecimiento de injertos desde el momento del trasplante hasta el momento de la recogida, se midieron los tamaños antes del trasplante del injerto y en el momento de la recolección (después del trasplante), y se calcularon las relaciones de tamaño del injerto después del trasplante con respecto a antes del trasplante. El tamaño del injerto se determinó según la fórmula *tamaño del injerto* = $L \times W$ en la que L y W representan los ejes largo y corto del injerto, respectivamente. La evaluación del desarrollo del injerto se realizó contando el número de glomérulos y túbulos maduros en 10 campos microscópicos consecutivos ($\times 40$ aumentos) por trasplante en 3 trasplantes por grupo. La determinación de la infiltración de linfocitos T humanos en secciones de injerto se determinó como se ha descrito previamente (Naveh MT. y col., 1992. J Clin Invest. 90, 2434). Brevemente, las secciones de injerto se inmunotiñeron con anticuerpo de conejo anti-CD3 humano (Zymed, San Francisco, CA; linfocitos T pan), como se ha descrito previamente (Dekel, B. y col., 1999. Int. Immunol. 11, 1673-1683) y el número de células positivas para CD3 humano se contó en 10 campos microscópicos consecutivos ($\times 100$ aumentos) por trasplante en 3 trasplantes por grupo. Los bloques de tejido en parafina de trasplantes se cortaron a 4-6 μm de espesor, se desparafinaron en xileno, se rehidrataron y se dispusieron durante 15 min en etanol que contenía 3 % de H₂O₂ para bloquear la peroxidasa endógena. Los portaobjetos se lavaron minuciosamente con agua de grifo y se transfirieron a PBS. Entonces, las secciones se trataron con 1 % de albúmina de suero bovino para prevenir la tinción del fondo y se incubaron durante 1 hora con anticuerpo anti-CD3 a temperatura ambiente en una cámara humidificada. Los portaobjetos se aclararon con solución salina tamponada con fosfato durante 3 minutos y se incubaron con un anticuerpo anti-conejo biotinilado durante 30 minutos y luego se incubaron con estreptavidina conjugada con peroxidasa (StrAvigen; Biogenex, San Ramon, CA) durante 30 minutos. Después de aclarar, la marca de peroxidasa se visualizó por incubación con durante 15 minutos y se contratiñó con hematoxilina de Mayer usando un kit de tinción inmunohistoquímica (Biomed, Foster City, CA), según las instrucciones del fabricante. El reactivo 3-amino-9-etilcarbazol produjo un producto rojo que es soluble en alcohol y puede usarse con un medio de montaje acuoso (gelatina de glicerol de Kaiser). Se realizó un control negativo para tinción de linfocitos T siguiendo todas las etapas anteriormente mencionadas, pero omitiendo la adición de anticuerpo primario. Se encontró que la tinción era uniformemente negativa en trasplantes de ratones de control no infundidos con CMSP humanas.

Análisis de la vascularización de vasos del huésped: Se inmunotiñeron secciones de parafina de cinco micrómetros de espesor con un anticuerpo de rata específico para ratón PECAM-1 (PharMingen, San Diego, California) usando el kit Histostain Plus (Zymed, San Francisco, California), según las instrucciones del fabricante. Los recuentos de vasos se realizaron en regiones similares dentro de injertos renales por campo de alta potencia (5 campos consecutivos por trasplante en 5 trasplantes por grupo).

Recolección y análisis de orina: Se recogió fluido producido por quistes derivados del injerto de tejido renal de edad gestacional temprana y se analizó para contenido de marcador urinario, del siguiente modo. Trasplantes

humanos y porcinos en desarrollo se expusieron quirúrgicamente en ratones anestesiados mediante incisión de la línea media o del flanco izquierdo y se insertó un microcatéter de plástico en un área identificable de concentración de fluido. En el sitio de inserción, las paredes del injerto se suturaron alrededor del catéter usando una sutura de nailon 5-0, y el fluido del injerto se recogió mediante el microcatéter en tubos de PCR de pequeño volumen suturados sobre la piel de los ratones. El fluido drenado se analizó posteriormente para concentraciones de nitrógeno ureico y creatinina.

Análisis por RT-PCR de la expresión de moléculas co-estimulantes en injertos: Entre las múltiples rutas co-estimulantes identificadas, las pruebas sugieren cada vez más que la interacción de los receptores co-estimulantes de linfocitos T CD28 y ligando de CD40 (CD40L, CD154) con sus ligandos respectivos B7-1/-2 y CD40 expresados en células presentadoras de antígeno es crítica para las respuestas de linfocitos T a aloantígenos (Sayegh MH. y Turka LA., 1998. N Engl J Med. 338, 1813). Los experimentos se realizaron así para probar si células inmunitarias humanas alorreactivas rechazaron o no los injertos derivados del tejido renal humano de 7 a 8 semanas edad gestacional alógenos como resultado de la regulación por disminución por tales tejidos de la expresión de las moléculas co-estimulantes B7-1, B7-2, CD40, CD40L y HLA-DR, del siguiente modo. ARN mensajero de injertos derivados del tejido renal de 8, 14 y 22 semanas de edad gestacional se analizó mediante RT-PCR en los siguientes momentos de tiempo: (i) antes del trasplante; (ii) inmediatamente tras el trasplante, pero antes de la infusión de CMSP humanas alorreactivas; y (iii) 2, 4 y 6 semanas tras la reconstitución de ratones con CMSP humanas, del siguiente modo. Los injertos se diseccionaron cuidadosamente del sitio de implantación subcapsular y se aisló ARN total de los injertos diseccionados como se ha descrito previamente (Dekel, B. y col., 1999. Int. Immunol. 11, 1673-1683). Brevemente, los tejidos renales del injerto se homogeneizaron con un homogeneizador de tejido de vidrio-Teflon en Tri-reagent (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH) para el aislamiento de ARN total, según las instrucciones del fabricante. El ARN aislado se secó al aire, se resuspendió en agua sin nucleasa y se cuantificó mediante espectrofotometría. Alícuotas de 1 microgramo de preparación de ARN total se transcribieron de forma inversa en ADNc con transcriptasa inversa AMV usando el kit de RT-PCR Access (Promega Corp., Madison, Wisconsin), según las instrucciones del fabricante. Las secuencias específicas para las moléculas co-estimulantes y para el gen de mantenimiento de control β -actina (Pratt, J.R. y col., 2002. Nature Med. 8, 582-587) se amplificaron posteriormente por PCR a partir del ADNc sintetizado, del siguiente modo. Brevemente, el producto de ADNc de transcripción inversa se diluyó 1:50, 1:100 y 1:500 en agua estéril y la amplificación por PCR se realizó usando ADN polimerasa Tfl termostable en una mezcla de reacción de 50 microlitros que contenía 40 micromolar de cada dNTP, 0,4 micromolar de cada cebador (Tabla 1), Tris HCl 10 milimolar (pH 8,3) y MgCl₂ 1,5 milimolar. Cada muestra se probó al menos tres veces, y las muestras de tejido comparadas se amplificaron por PCR en paralelo usando una única mezcla de reactivos maestra. Con el fin de minimizar la amplificación no específica de secuencias no diana, la temperatura de hibridación de PCR se fijó alta (64 °C), y, con el fin de detectar señales de PCR en la fase lineal de la amplificación de productos, la reacción de PCR se realizó con 20-35 ciclos térmicos. En todos los experimentos, la posibilidad de amplificación de ADN contaminante se descartó mediante reacciones de control usando reacciones de transcripción inversa en las que se omitió la transcriptasa inversa o ADNc de molde. La reacción de productos de PCR se separó electroforéticamente en 1,5 % de geles de agarosa, los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron usando un transiluminador de UV, como se ha descrito previamente (Sharma VK. y col., 1996. Transplantation 62, 1860).

Trasplante de injertos de tejido renal de edad gestacional temprana xenógeno en ratones inmunocompetentes normales conjuntamente con un ligero bloqueo de la coestimulación de ciclo corto:

Para probar la inmunogenicidad de injertos xenógenos de tejido renal de edad gestacional temprana en un mamífero inmunocompetente normal, ratones Balb/c inmunocompetentes se trasplantaron con injertos de tejido renal porcino de 27 a 28 días de edad gestacional, como se ha descrito anteriormente para trasplantes de injerto en ratones inmunorreconstituidos, y se sometieron a un breve bloqueo de la coestimulación por inyección intraperitoneal de 250 microgramos de CTLA4-Ig (amablemente proporcionado por Steffen Jung, Escuela Médica de Hadassa, Jerusalén, Israel) cada 48 horas durante 2 semanas. CTLA4-Ig es una proteína de fusión que comprende la porción extracelular CTLA-4 de ratón fusionada con la región constante de IgG humana que bloquea la interacción co-estimulante del receptor co-estimulante de linfocitos T CD28 con sus ligandos co-estimulantes de células presentadoras de antígeno B7-1 y 2. Los ratones de control se inyectaron con solución salina tamponada con fosfato o inmunoglobulina de control.

Tabla 1. Cebadores de oligonucleótidos usados para la amplificación por PCR de ADNc preparado a partir de tejidos renales en desarrollo humanos.

Secuencias amplificadas	Cebadores de oligonucleótidos (sentido/antisentido)	Longitud del producto de PCR (pb)
B7-1	5'-GACCAAGGAAGTGAAGTGGC-3' (SEC ID N°: 1)/ 5'-AGGAGAGGTGAGGCTCTGGAAAAC-3' (SEC ID N°: 2)	410
B7-2	5'-CACTATGGGACTGAGTAACATTC-3' (SEC ID N°: 3)/ 5'-GCACTGACAGTTCAGAATTCATC-3' (SEC ID N°: 4)	383
CD40	5'-CTCTGCAGTGCCTCTGGGG-3' (SEC ID N°: 5)/ 5'-GATGGTATCAGAAACCCCTGTAGC-3' (SEC ID N°: 6)	410

CD40L	5'-TATCACCCAGATGATTGGGTCAGC-3' (SEC ID N°: 7)/ 5'-CCAGGGTTACCAAGTTGTTGCTCA-3' (SEC ID N°: 8)	349
HLA-DR	5'-ATGAAGGTCTCCGCGGCAGCCC-3'-(SEC ID N°: 9)/ 5'- CTAGCTCATCTCCAAAGAGTTG-3' (SEC ID N°: 10)	215
β -actina	5'-ACCATCAAGCTCTGCGTGACTG-3' (SEC ID N°: 11)/ 5'-GCAGGTCAGTTCAGTTCCAGGTC-3' (SEC ID N°: 12)	310
* Las búsquedas de homología para todas las secuencias de cebadores se realizaron usando la base de datos GenBank de NCBI para garantizar no especificidad de cebadores para genes de ratón.		

Análisis estadístico: Las comparaciones entre grupos se evaluaron por la prueba de la t de Student. Los datos se expresaron como media \pm e.e.m., y se consideraron estadísticamente significativas si los valores de *P* eran 0,05 o menos.

5 **Análisis de micromatrices:** Se realizó preparación de ARNc marcado e hibridación con una matriz Genechip Human Genome HU95A (Affymetrix) como se recomienda por el fabricante de la micromatriz. El análisis de datos por Genechip se realizó como se ha descrito previamente (Zuo, F. y col., 2002. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 6292-6297; Kaminski, N. y col., 2000. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 1778-1783). Para análisis de agrupaciones se usaron los programas CLUSTER, GENE CLUSTER y TREEVIEW (Eisen, M.B. y col., 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 14863-14868) y el paquete de software SCOREGENE (<http://FGUSheba.cs.huji.ac.il/>). Las relaciones en veces se calcularon para cada muestra contra la media geométrica de todas las muestras. Se ha publicado una descripción detallada de los procedimientos de puntuación y el enfoque usado para el análisis de datos de micromatrices (Kaminski N. y Friedman N., 2002. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 27, 125-132).

Resultados experimentales:

15 **La edad gestacional determina el crecimiento y diferenciación:** Se llevó a cabo un experimento inicial para determinar la viabilidad de trasplantes de tejido renal humano adulto en ratones inmunodeficientes. 8 semanas después del trasplante se encontró que todos los trasplantes adultos (5/5) eran escleróticos y no viables. Para evaluar la influencia de la edad de desarrollo sobre el potencial de crecimiento y diferenciación, tejidos renales humanos de 7 a 14 semanas de edad gestacional se trasplantaron en ratones inmunodeficientes (Tabla 2). En general, más del 80 % de los injertos renales humanos de todas las edades de donantes sobrevivieron, y todos los injertos recuperados tuvieron elevado tamaño, sin indicios de neoplasia en ninguno de los injertos recuperados.

25 **Tabla 2. Trasplante de órganos/tejidos renales de edad gestacional humanos o porcinos en receptores portadores de leucocitos humanos no singénicos.**

Origen del injerto	Edad gestacional del injerto	Nº de injertos	Tipo de injerto	Crecimiento del injerto*	Diferenciación renal del injerto **	Diferenciación no renal del injerto	Necrosis
Humano	14 semanas	3	completo	3 / 3	ninguna	ninguna	3 / 3
	14 semanas	8	fragmentos	7 / 8	7 / 7	ninguna	ninguna
	10 semanas	2	completo	2 / 2	ninguna	ninguna	2 / 2
	10 semanas	6	fragmentos	6 / 6	6 / 6	ninguna	ninguna
	8 semanas	5	completo	5 / 5	5 / 5	ninguna	ninguna
	7 semanas	3	completo	3 / 3	3 / 3	ninguna	ninguna
Porcino	8 semanas	7	completo	5 / 7	ninguna	ninguna	5 / 5
	8 semanas	6	fragmentos	6 / 6	6 / 6	ninguna	ninguna
	6 semanas	5	completo	4 / 5	ninguna	ninguna	4 / 4
	6 semanas	6	fragmentos	6 / 6	6 / 6	ninguna	ninguna
	27 a 28 días	12	completo	12 / 12	12 / 12	ninguna	ninguna
	24 a 25 días	9	completo	8 / 9	5 / 8	3 / 8	ninguna
	20 a 21 días	9	completo	6 / 9	3 / 6	3 / 6	ninguna

El crecimiento y diferenciación del trasplante se evaluaron 8 semanas después del trasplante. La diferenciación se clasificó como renal (solo nefronas), no renal (derivados diferenciados distintos de renal) y necrosis (además de nefronas, aparición de áreas necróticas principalmente en el centro del trasplante).

30 Los resultados fueron claramente diferentes cuando injertos renales humanos de 7 y 8 semanas de edad gestacional se compararon con injertos renales humanos de edad gestacional tardía. 8 semanas después del trasplante, injertos derivados de tejido renal de 7 y 8 semanas de edad gestacional (n = 8) habían experimentado un sorprendente crecimiento (la relación de tamaño del trasplante fue 20,1 \pm 2,7). Se observó nefrogénesis completa [5,5 \pm 0,8 glomérulos y 19,3 \pm 2,7 túbulos por campo (x40 aumentos)] en trasplantes derivados de estos injertos, que originalmente contuvieron principalmente citoblastos mesenquimatosos metanefríticos y yemas ureterales, pero no glomérulos. La morfología macroscópica y los aspectos histológicos de un injerto derivado de tejido renal humano de

8 semanas de edad gestacional, 8 semanas después del trasplante, se muestran en las Figuras 1a-b, respectivamente. Más allá de este momento de tiempo gestacional, el trasplante de riñones fetales completos en desarrollo produjo necrosis del injerto central y la viabilidad se redujo. Por tanto, pequeños trozos de tejido renal fetal humano se injertaron en huéspedes inmunodeficientes, como se ha descrito previamente (Dekel, B. y col., 1997. Transplantation 64, 1550-1558; Dekel, B. y col., 2000. Transplantation 69, 1470-1478). Bajo condiciones idénticas, secciones de trasplantes derivadas de tejidos de 10 y 14 semanas de edad gestacional ($n = 14$) tuvieron relaciones de tamaño del trasplante significativamente menores ($14,8 \pm 2,2$ y $12,3 \pm 1,8$, respectivamente, $P < 0,01$), además de recuentos glomerulares y tubulares ($4,2 \pm 0,8$ y $15,3 \pm 2,7$; $3,5 \pm 0,8$ y $11,2 \pm 2,2$ por HPF, respectivamente; $P < 0,05$). Por tanto, a diferencia del trasplante de fragmentos renales fetales humanos más maduros, el injerto de tejidos renales de edad gestacional más temprana condujo a crecimiento y nefrogénesis óptimos.

El mismo enfoque descrito anteriormente se usó para evaluar el crecimiento y posibilidad de diferenciar de tejidos renales porcinos de edad gestacional (Tabla 2). En este caso, trasplantes de tejidos renales porcinos de 6 y 8 semanas de edad gestacional presentaron fibrosis y necrosis central y deterioro del injerto, mientras que injertos seccionados tuvieron una relación de tamaño del trasplante de $10,5 \pm 2,2$ y $8,2 \pm 1,2$, respectivamente, 8 semanas después del trasplante. Para la caracterización de tejidos renales porcinos de edad gestacional temprana se analizaron trasplantes de 20-21, 24-25 y 27-28 días de edad gestacional (datos combinados de 30 trasplantes). Los trasplantes porcinos de 27-28 días de edad gestacional presentaron todos crecimiento significativo con un relación de tamaño del trasplante 8 semanas después del trasplante de $28,3 \pm 4,1$ y diferenciación completa en glomérulos y túbulos maduros ($7,0 \pm 1,0$ glomérulos y $35,5 \pm 5,1$ túbulos por campo microscópico de alta potencia). La morfología macroscópica y los aspectos histológicos de un injerto derivado de tejido renal porcino de 4 semanas de edad gestacional tal se muestran en las Figuras 1c-d, respectivamente. A diferencia, seis de nueve trasplantes porcinos de 20-21 días de edad gestacional dejaron de desarrollarse o habían evolucionado a crecimientos que contenían pocos glomérulos y túbulos, pero que contenían otros derivados diferenciados, tales como vasos sanguíneos (Figura 1e), y cartílago y hueso (Figuras 1e-f). Además, tejidos renales porcinos de 24-25 días de edad gestacional fueron inferiores a trasplantes de 27-28 días de edad gestacional para nefrogénesis, ya que tipos de células no renales y agrupaciones de células desorganizadas se encontraron en tres de los nueve trasplantes (Figuras 1h-j). Estos hallazgos complementan los recientes datos *in vitro* (Oliver, J.A. y col., 2002. Am. J. Physiol. Renal Physiol. 283, F799-809), que indican ambos que pronto en la gestación el riñón en desarrollo contiene células progenitoras pluripotentes, o citoblastos renales embrionarios, con la capacidad para generar muchos tipos de células.

La vascularización derivada de huésped específica para injertos derivados de tejido renal de edad gestacional temprana está asociada con tolerancia inmunitaria del injerto: La capacidad de trasplantes para crecer como tejidos en huéspedes no singénicos depende principalmente de su capacidad para sostener la angiogénesis en tales huéspedes (Gritsch, H.A. y col., 1994. Transplantation 57, 906-917). En el caso de xenotrasplante, la barrera inmunológica está condicionada, en gran medida, por el modo en el que el trasplante deriva su suministro de sangre (Casalho, M. y Platt, J.L., 2001. Immunity 14, 437-446). Para determinar la capacidad de ratones receptores para soportar la angiogénesis de injertos derivados de tejido renal humano o porcino de edad gestacional temprana avascular por crecimiento hacia adentro de vasos del receptor, la expresión de PECAM de ratón (CD31), un marcador de células endoteliales en germinación, se analizó inmunohistoquímicamente en trasplantes en desarrollo. Las cifras de vasos inmunorreactivos que reflejaban el número total combinado de vasos capilares y mayores de origen huésped se realizaron por campo microscópico de alta potencia (Vermeulen, P.B. y col., 1996. Eur. J. Cancer 32A, 2474-2484). 4 semanas después del trasplante se encontraron $23,5 \pm 4,0$ y $21,3 \pm 3,2$ vasos de origen huésped por campo microscópico de alta potencia que suministraban los trasplantes humanos y porcinos en desarrollo, respectivamente. Entre estos injertos de tejido humano y porcino, todos los vasos externos se tiñeron positivos para CD31 de ratón (Figuras 2a y b, respectivamente). Además, se detectaron capilares de tamaño medio y pequeño de origen huésped en ambos glomérulos (Figuras 2c y 2d) y parénquima (Figuras 2e y f) de los trasplantes humanos y porcinos de edad gestacional. En trasplantes que se originan de tejidos renales humanos de 16 semanas de edad gestacional y porcinos de 8 semanas de edad gestacional vascularizados maduros hubo un cifra de vasos positiva para CD31 de ratón significativamente reducida ($10,2 \pm 1,8$ y $11,5 \pm 2,2$, respectivamente, $P < 0,001$) compuesta principalmente por vasos mayores externos, pero no células endoteliales en glomérulos y capilares pequeños (Figuras 2g y h). Las secciones de control de tejidos renales humanos y porcinos vascularizados no mostraron vasos derivados de huéspedes positivos para CD31 (Figuras 2i-j, respectivamente). Así, ratones receptores tienen una contribución significativamente mayor a la vasculogénesis de injertos derivados de tejido renal humano y porcino de edad gestacional temprana que incluyen la formación de la microcirculación de los mismos.

Los injertos renales humanos y porcinos de edad gestacional temprana se diferencian en órganos renales funcionales que producen orina diluida: Se encontró que injertos derivados de tejido renal de edad gestacional temprana formaban grandes quistes llenos de fluidos. Las Figuras 3a y b, respectivamente representan la aparición de tales quistes en injertos derivados de tejido renal humano de 8 semanas de edad gestacional y porcino de 4 semanas de edad gestacional, respectivamente. Se observó que tales quistes se formaban en particular en injertos abdominales en los que no se limitó el crecimiento por el espacio subcapsular renal. Para evaluar si el fluido en estos quistes representó o no subproductos de función renal, el fluido de los quistes de injertos derivados de tejido renal humano de 8 semanas de edad gestacional ($n = 2$) y porcino de 4 semanas de edad gestacional ($n = 4$) se recogió analizó para contenido de nitrógeno ureico y creatinina, 6-8 semanas después del trasplante. Como los

trasplantes no pueden usar el aparato excretor del huésped para el drenaje de orina, el fluido se drenó por inserción de un microcatéter permanente en los injertos renales en desarrollo. Se encontró que los niveles promedio (mg/dl) de nitrógeno ureico y creatinina eran mayores en el fluido de los quistes en comparación con aquellos encontrados en los sueros de ratones trasplantados (518 ± 169 frente a 45 ± 8 y $7,2 \pm 1,9$ frente a $0,46 \pm 0,048$, respectivamente; $P < 0,001$), que indica que los trasplantes humanos y porcinos habían producido orina. Estos resultados son según la demostración de que los precursores de riñón murino pueden desarrollarse en nefronas funcionales (Rogers, S.A. y col., 1998. *Kidney Int.* 54, 27-37; Rogers, S.A. y col., 2001. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280, R132-136; Rogers, S.A. y Hammerman, M.R., 2001. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280, R1865-1869; Rogers, S.A. y Hammerman, M.R., 2001. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281, R661-665). Los niveles de nitrógeno ureico y creatinina en el fluido de los quistes fueron significativamente menores en comparación con orina de vejiga nativa (518 ± 169 frente a $4,279 \pm 402$ y $7,2 \pm 1,9$ frente a 54 ± 6 , respectivamente; $P < 0,001$). La orina diluida en el fluido de los quistes es compatible con la reducida capacidad de los riñones de edad gestacional temprana para concentrar orina.

15 Injertos derivados de tejido renal humano o porcino de edad gestacional temprana son menos susceptibles a linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos que injertos de edad de desarrollo tardía: La cuestión de si injertos derivados de tejido renal de edad gestacional temprana tienen o no una ventaja inmunológica con respecto a injertos derivados de tejido de edad gestacional tardía se trató del siguiente modo. Experimentos preliminares para establecer condiciones experimentales de referencia demostraron que el número mínimo de CMSP infundidas que pueden inducir rechazo completo de injertos derivados de tejido renal humano adulto injertado de forma funcionante en ratones receptores fue 10^8 células (datos no mostrados). Cuatro semanas después del trasplante de fragmentos de riñón humano adulto en receptores inmunodeficientes junto con 100×10^6 CMSP humanas alorreactivas se observó una enorme infiltración linfocítica, destrucción de tejido y rechazo, como se ha descrito previamente (Dekel, B. y col., 1997. *Transplantation* 64, 1541-1550; Dekel, B. y col., 1999. *Int. Immunol.* 11, 1673-1683). 4 semanas después del trasplante, los injertos que se originaron de injertos de tejido renal de 14 semanas de edad gestacional mostraron un promedio de $39,8 \pm 7,8$ linfocitos T humanos de donante por campo microscópico de alta potencia. A pesar de la presencia de linfocitos T en estos injertos no se produjo rechazo temprano similar al de trasplantes adultos, y el crecimiento de trasplantes de 14, 10, 8 y 7 semanas de edad gestacional tuvo lugar durante el primer mes (Dekel, B. y col., 1997. *Transplantation* 64, 1550-1558; Dekel, B. y col., 2000. *Transplantation* 69, 1470-1478), como se muestra en las Figuras 4a-d, respectivamente. Sin embargo, el análisis de infiltración de linfocitos T en injertos derivados de tejido renal de 14 semanas de edad gestacional en momentos de tiempo posteriores (6-8 semanas después del trasplante) reveló los efectos perjudiciales de las células infiltrantes, ya que el deterioro del injerto, en forma de destrucción de túbulos y glomérulos, fue evidente (Figuras 4e-f, respectivamente), y el crecimiento del trasplante se detuvo significativamente en comparación con trasplantes de animales que no se sometieron a infusión de CMSP humanas (Figura 4a). Se obtuvieron resultados similares para injertos renales humanos de 10 semanas de edad gestacional (Figura 4b). A diferencia, tras la infusión de 100×10^6 células humanas en el peritoneo del huésped, injertos derivados de tejido renal de 8 ó 7 semanas de edad gestacional presentaron glomérulos y túbulos preservados sin infiltración de linfocitos T humanos del donante (Figuras 4g-h, respectivamente) y crecieron similarmente a trasplantes de ratones de control (Figuras 4c-d, respectivamente), y de ahí que no mostraran signos evidentes de destrucción o rechazo. Además, cuando el protocolo experimental se alteró de manera que dos inóculos de 100×10^6 CMSP humanas alorreactivas de diferentes donantes se infundieron separados 6 semanas, las células inmunitarias no rechazaron el injerto renal humano de 8 semanas de edad gestacional, pero se rechazaron injertos renales humanos de 14 semanas de edad gestacional trasplantados conjuntamente con CMSP del segundo donante (Figuras 5a-b, respectivamente). Así, la inmunogenicidad del tejido diferenciado, que se desarrolló durante 6 semanas tras la implantación de tejidos renales de 8 semanas de edad gestacional, se redujo todavía más en comparación con tejidos renales de 14 semanas de edad gestacional.

El análisis de la infiltración de linfocitos T también se realizó en trasplantes de tejido renal porcino en huéspedes sometidos a infusión intraperitoneal de 100×10^6 CMSP humanas. Los experimentos preliminares para establecer condiciones experimentales de referencia demostraron que el número mínimo de CMSP infundidas que pueden inducir rechazo completo del injerto renal derivado de tejidos adultos porcinos injertados en ratones receptores fue 10^8 (datos no mostrados). En el plazo de 3 semanas, cinco de seis injertos derivados de tejido renal porcino adulto se infiltraron y la lesión y destrucción histológicas fueron evidentes (datos no mostrados). La infiltración de linfocitos analizada por tinción con H&E y la destrucción de tejido de parénquima renal en presencia de infiltrado de linfocitos T humanos en el injerto renal derivado de tejido de edad adulta 4 semanas después del trasplante se muestran en las Figuras 6a-b y Figura 6c, respectivamente.

En injertos derivados de tejido renal porcino de 8 semanas de edad gestacional, la infiltración de linfocitos T humanos fue fácilmente detectable en los seis injertos con un promedio de $40,5 \pm 6,75$ linfocitos por campo microscópico de alta potencia, 4 semanas después del trasplante. Los trasplantes de tejidos renales de 8 y 6 semanas de edad gestacional mostraron signos de rechazo, como se demuestra por su bajo tamaño después del trasplante con respecto a antes del trasplante (Figuras 7a-b, respectivamente) con respecto al de injertos derivados de tejido renal de 3 y 4 semanas de edad gestacional 6 u 8 semanas después del trasplante (Figuras 7c-d, respectivamente). El análisis en momentos de tiempo posteriores indicaron que cinco de seis injertos derivados de tejido renal de 8 semanas de edad gestacional mostraron signos de rechazo en forma de lesión de tejido concomitante con infiltración de linfocitos T, como se demuestra por tinción inmunohistoquímica con anticuerpo anti-

CD3 humano, y por tinción histoquímica con H&E (Figuras 8a-b, y 8c, respectivamente) de secciones de injerto. Estos resultados, y hallazgos similares de otros experimentos con injertos derivados de tejido renal porcino de 6 semanas de edad gestacional, mostraron que las CMSP humanas xenógenas indujeron rechazo de los trasplantes renales porcinos en desarrollo en estas edades de organogénesis. En marcado contraste, injertos derivados de
 5 tejido renal porcino de 28 y 21 días de edad gestacional no fueron rechazados (Figuras 7c-d, respectivamente), ni tales injertos muestran infiltración de linfocitos T, como se demuestra por un injerto derivado de tejido renal porcino de 28 días de edad gestacional en las Figuras 9a-b. Además, trasplantes de injertos de tejido renal de 28 días de edad gestacional en huéspedes sometidos a una segunda infusión de 100×10^6 CMSP humanas xenógenas, 4
 10 semanas después del trasplante, no fueron rechazados, mientras que injertos de tejido renal de 8 semanas de edad gestacional trasplantados simultáneamente con estas células fueron eventualmente rechazados (Figuras 10a-b, respectivamente).

Moléculas co-estimulantes en células presentadoras de antígeno de donante son cruciales en la respuesta aloinmunitaria (Boussiotis, V.A. y col., 1996. J. Exp. Med. 184, 365-376; Schwartz, R.H., 1996. J. Exp. Med. 184, 1-8; Sayegh, M.H. y Turka, L.A., 1998. N. Engl. J. Med. 338, 1813-1821; Li, Y. y col., 1999. Nature Med. 5, 1298-1302). Por tanto, se analizaron la expresión de ARNm de las moléculas co-estimulantes B7-1, B7-2, CD40, CD40L y HLA-DR antes y después del trasplante de tejido renal humano en desarrollo en ausencia y presencia de linfocitos humanos alorreactivos. Los resultados obtenidos demostraron expresión diferencial de moléculas co-estimulantes en tanto tejidos renales humanos adultos normales como trasplantados a diferentes edades gestacionales, con una
 15 deficiencia distinta (especialmente CD40 y B7-1) en trasplantes derivados de tejido renal de 8 semanas de edad gestacional con respecto a 14 y 22 semanas (Figuras 11a-c, respectivamente). La expresión de ARNm de CD40 o CD40L en injertos derivados de tejido renal de 8 semanas de edad gestacional no se detectó por análisis por PCR hasta 6 semanas después del trasplante (Figura 11a). A diferencia, tal expresión se detectó en injertos derivados de
 20 tejido renal de 14 y 22 semanas de edad gestacional 4 semanas después del trasplante (Figuras 11a-c, respectivamente). Además, se encontró que la expresión de B7-1 tras el trasplante e infusión de PBMC era significativamente menor en injertos derivados de tejido renal de 8 semanas de edad gestacional (Figura 11a) en comparación con injertos derivados de tejido renal de 14 y 22 semanas de edad gestacional (Figuras 11a-c, respectivamente). Este patrón de expresión génica de moléculas co-estimulantes está de acuerdo con los datos *in vivo* que demuestran la completa ausencia de respuestas inmunitarias por efectores alógenos humanos contra
 25 trasplantes de tejido renal humano de fetos humanos de 7 u 8 semanas y así proporciona un mecanismo subyacente a la tolerancia inmunitaria alógena a tales tejidos conseguidos.

Ventaja de injertos derivados de tejido renal de edad gestacional temprana en ratones inmunocompetentes:

La inmunogenicidad óptimamente baja de los tejidos renales porcinos de edad gestacional temprana se demostró
 35 adicionalmente trasplantando tejidos renales porcinos adultos o de 27 a 28 días de edad gestacional en ratones Balb/c inmunocompetentes. La evaluación de injertos de tejido renal adulto (n = 10) y de 27 a 28 días de edad gestacional (n = 10) después de 2 semanas mostró rechazo de ambos tejidos. Tras el tratamiento de ciclo corto con CTLA4-Ig, una proteína de fusión de inmunoglobulina que afecta directamente el reconocimiento por linfocitos T de B7 en células presentadoras de antígeno (Linsley, P.S. y col., 1991. J. Exp. Med. 174, 561-569), 2 a 4 semanas
 40 después del trasplante, todos los injertos adultos (8/8) tuvieron una morfología alterada, tejido necrótico y un alto grado de infiltración de linfocitos. A diferencia, al mismo momento de tiempo, la infusión de CTLA4-Ig produjo crecimiento y diferenciación de 6 de los 10 trasplantes de edad gestacional temprana, que no se observó en los animales sin tratar, que indica la ventaja inmunitaria de los trasplantes derivados de tejido renal de edad gestacional temprana con respecto a trasplantes derivados de tejido renal adulto desarrollado en huéspedes completamente
 45 inmunocompetentes.

Disminución de la expresión de múltiples genes relacionados con la inmunidad en tejido renal de edad gestacional temprana:

Para investigar propiedades inmunogénicas inherentes del tejido renal de edad gestacional temprana que pudieran explicar su disminuida inmunogenicidad con respecto a tejido más maduro, la expresión
 50 génica global en tejidos renales humanos de edad gestacional temprana y de edad gestacional adulta se analizó por análisis de micromatrices. Además, se analizaron 231 genes que tienen funciones relacionadas con la inmunidad directa (la lista completa de genes puede encontrarse en la malla mundial/internet en <http://www.weizmann.ac.il/immunology/reisner/inmunogenicity.xls>). Éstos incluyeron genes que codifican moléculas de HLa, citocinas, quimiocinas, receptores de quimiocina, mediadores de la apoptosis, moléculas de adhesión,
 55 metaloproteinasas, moléculas de inmunidad innata y otros inmunomoduladores. La agrupación jerárquica (Eisen, M.B. y col., 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 14863-14868) de todos los genes basándose en similitud en la expresión génica entre los grupos experimentales reveló dos agrupaciones principales, que separan los tejidos adultos de fetales. Además, los genes relacionados con la inmunidad se agruparon según la edad gestacional con una agrupación de genes dentro del tejido renal de edad gestacional más temprana y una agrupación de genes dentro del tejido renal adulto en lados opuestos de un dendrograma de agrupación jerárquica (Figura 12a). Los patrones de expresión génica "inmunitaria" se presentan usando el programa PLOTTOPTGENE (Zuo, F. y col., 2002. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 6292-6297) (Figura 12b). Tales análisis descubrieron inesperadamente que 68 genes se cambiaron significativamente entre tejidos adultos y fetales (P < 0,05, número total de clasificaciones erróneas (TNoM) = 0). Los perfiles de expresión de estos genes demostraron aquellos elevados en los tejidos
 60 adultos (n = 57 genes; Figura 12c, arriba) y aquellos disminuidos (n = 11 genes; Figura 12c, abajo). Ejemplos de los genes relacionados con la inmunidad más significativamente cambiados incluyen aquellos que codifican moléculas

que participan en tanto la respuesta inmunitaria adquirida como la innata (Tabla 3).

Discusión: Los resultados presentemente descritos muestran que los injertos derivados de tejido renal humano de 7 a 8 semanas de edad gestacional e injertos derivados de tejido renal porcino de 20 a 28 días de edad gestacional trasplantados en ratones inmunodeficientes sobreviven, crecen y experimentan nefrogénesis completa, formando un órgano funcional que puede producir orina. Células de edad gestacional temprana dejan de madurar exclusivamente en estructuras renales diferenciadas y forman derivados diferenciados no renales y agrupaciones de células desorganizadas. Además, se logró organogénesis renal óptima por trasplante de injertos de edad gestacional temprana de órganos completos. A estas edades gestacionales tempranas, tanto tejidos renales humanos como porcinos contienen citoblastos mesenquimatosos renales y ramas de yemas ureterales, pero no glomérulos, enfatizando su sorprendente potencial para diferenciarse después del trasplante. Una observación clave de los resultados anteriormente descritos es que el crecimiento y desarrollo de tales tejidos renales de edad de desarrollo temprano se facilita por vasculatura derivada del huésped.

Tabla 3. Genes relacionados con la inmunidad diferencialmente expresados en tejido renal humano de edad gestacional temprana frente a adulta.

Categoría de genes	Gen diferencialmente expresado
HLA	MHC clase I, C
	MHC clase I, A
	MHC clase I, E
	MHC clase II, DPβ1
Quimiocinas/adhesión	RANTES
	proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1)
	proteína-2 quimiotáctica de monocitos (MCP-2)
	E-selectina
Citocinas	osteopontina
	interleucina-15 (IL-15)
	prointerleucina-1β
	receptor de interleucina-1 (IL-1)
Inmunidad innata	componente del complemento C1r
	componente del complemento 2
	factor de proteína de control del complemento
	receptor-1 de manosa
Apoptosis	proteína asociada a receptor-1 de TNF (TRADD)
	ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL)
	proteína-2 reguladora de la apoptosis similar a caspasa
	cisteína apoptósica Mch4

Se sabe desde hace más de cuatro décadas que los tejidos embrionarios son menos inmunogénicos en comparación con sus homólogos adultos (Medawar, P.B., 1953. Symp. Soc. Exp. Biol. 7, 320-323). Así, la definición presentemente descrita del momento de tiempo más temprano en la gestación renal humana o porcina durante el cual son posibles la diferenciación normal y posterior función renal puede también precisar el momento ideal para recoger el tejido menos propenso a rechazo inmunitario por respuestas aloinmunitarias/xenoinmunitarias. Por consiguiente, la aceptación del injerto puede reflejar el desarrollo progresivo de una compleja matriz de moléculas de la superficie celular y factores solubles que determinan el reconocimiento inmunitario en el órgano gestacional. En los resultados presentemente descritos, el análisis de micromatrices establece que el desarrollo de madurez inmunológica en el riñón humano es un evento bastante tardío en la gestación ya que tejidos renales de edad gestacional temprana están limitados en la expresión de múltiples genes relacionados con la inmunidad. Así, se encontró inesperadamente que 13 de los 57 genes que estaban significativamente regulados por incremento en tejidos renales de edad adulta frente a gestacional pertenecen a los sistema de HLA clase I y clase II. Además, se mostró que moléculas que median en el tráfico de leucocitos, tales como las quimiocinas RANTES y MCP-1 (Nelson, P.J. y Krensky, A.M., 2001. Immunity 14, 377-386), la molécula de adhesión E-selectina (Tedder, T.F. y col., 1995. FASEB J. 9, 866-873), citocinas pro-inflamatorias tales como osteopontina (O'Regan, A.W. y col., 2000. Immunol. Today 21, 475-478; Ashkar, S. y col., 2000. Science 287, 860-863; Xie, Y. y col., 2001. Kidney Int. 60, 1645-1657) y genes del complemento, se asociaron a inmunidad innata (Pratt, J.R. y col., 2002. Nature Med. 8, 582-587), también se encontró inesperadamente que se asociaban a la inmunogenicidad reducida de tejidos renales de edad gestacional temprana con respecto a tejidos más maduros.

La inmunogenicidad de los tejidos renales en desarrollo se evaluó usando dos modelos inmunológicos diferentes. En

el primer modelo, injertos se implantan en inmunodeficientes reconstituidos con CMSP humanas. Se ha documentado bien el significativo nivel de inmunidad específica para ser humano generada en este modelo tras la infusión de CMSP humanas (Segall, H. y col., 1996. Blood 88, 721-730; Reisner, Y. y Dagan, S., 1998. Trends Biotechnol. 16, 242-246). En este modelo, tanto infusiones primarias como secundarias de CMSP humanas, obtenidas de donantes separados y de ahí que representen dos repertorios de linfocitos T independientes, no fueron capaces de rechazar injertos derivados de tejidos renales humanos o porcinos de edad gestacional temprana. Aunque el análisis de genes global indica que la tolerancia inmunitaria de tales injertos derivados de tejido de edad gestacional temprana está probablemente asociada a la regulación por disminución de múltiples rutas inmunitarias, la reducción en la expresión de CD40 y B7-1 observada en tales injertos implica una posible ausencia o inmadurez de células presentadoras de antígeno hematopoyéticas del donante. Además, la reducida inmunogenicidad podría también asociarse al agotamiento observado de células endoteliales del donante, mostrado recientemente que funcionan como células presentadoras de antígeno y/o como dianas para citotoxicidad mediada por linfocitos T en alorreconocimiento directo (Kreisel, D. y col., 2002. Nature Med. 8, 233-239). Se ha mostrado que piel humana manipulada con tejido alógeno, que carece de células endoteliales de donante, y así limitado en sus capacidades presentadoras de antígeno, funciona similarmente a los tejidos renales de edad gestacional temprana en un modelo humanizado de rechazo de piel (Briscoe, D.M. y col., 1999. Transplantation 67, 1590-1599).

En el segundo modelo, tejidos renales se trasplantaron en huéspedes inmunocompetentes normales. El rechazo en tales huéspedes puede desencadenarse por células presentadoras de antígeno del donante transferidas al implante, o, alternativamente, por sensibilización cruzada contra células presentadoras de antígeno huésped cargadas con antígenos del donante de un modo similar al procedimiento normal para la presentación de antígenos bacterianos o virales (Sayegh, M.H. y Turka, L.A., 1998. N. Engl. J. Med. 338, 1813-1821; Benichou, G., 1999. J. Immunol. 162, 352-358). Debido a que los tejidos renales de edad gestacional temprana carecen posiblemente de células presentadoras de antígeno maduras, además de una reducción relativa en receptores de recirculación y citocinas o quimiocinas específicas, se probó la hipótesis de que el bloqueo de sensibilización cruzada puede ser suficiente para aliviar el rechazo observado de estos implantes. Los resultados indicaron que el rechazo inmunitario de injertos de tejido renal de edad gestacional temprana podría obviarse por bloqueo co-estimulante de ciclo corto con CTLA4-Ig, un protocolo que fracasó en prevenir el rechazo de los injertos derivados de tejido renales adultos desarrollados. Tales resultados resaltaron la reducida inmunogenicidad de tejidos de edad gestacional temprana con respecto a tejidos de edad gestacional tardía. Estos resultados pueden extrapolarse y usarse para diseñar pautas inmunodepresoras para trasplante de tanto órganos/tejidos renales en desarrollo alógenos como xenógenos en sujetos humanos.

Finalmente, como los tejidos renales de edad gestacional temprana generan órganos renales funcionales que producen orina por separado del huésped, tales injertos pueden usarse en combinación con anastomosis urinaria con el aparato urinario del huésped para tratar enfermedades renales, por ejemplo, para corregir aberraciones bioquímicas en un individuo urémico. El aumento en el número de trasplantes y/o la administración de factores de crecimiento humanos específicos puede usarse para soportar la sustitución funcional.

Conclusión: Los resultados anteriormente descritos demostraron inesperadamente y convincentemente que injertos derivados de órgano/tejido humano de 7 a 8 semanas de edad gestacional, o injertos derivados de órgano/tejido porcino de 20 a 28 días de edad gestacional, pueden generar, en ausencia de teratomas derivados del injerto, órganos/tejidos vascularizados por el huésped estructuralmente y funcionalmente diferenciados, que son óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos. En particular, estos resultados demostraron inesperadamente y convincentemente que los injertos derivados de tejido renal humano o porcino a las edades gestacionales respectivas anteriormente mencionadas tienen todas tales capacidades, incluyendo aquellas de generación de órganos renales productores de orina.

Como tal, el procedimiento de trasplante de órgano/tejido general anteriormente descrito es abrumadoramente superior a todos aquellos procedimientos de la técnica anterior, ya que vence las limitaciones críticas de los últimos; concretamente: (i) uso de injertos de órgano/tejido insatisfactoriamente tolerados por linfocitos humanos alógenos/xenógenos; (ii) incapacidad de injertos de órgano/tejido para generar órganos/tejidos estructuralmente y funcionalmente diferenciados, en particular incapacidad de injertos renales para diferenciarse en órganos renales productores de orina; y/o (iii) uso de injertos de órgano/tejido no disponibles en cantidades suficientes.

EJEMPLO 2 de referencia

Tratamiento de enfermedad renal humana por trasplante de órganos/tejidos renales humanos o porcinos de edad gestacional temprana sin o con inmunodepresión mínima de receptores del injerto

Como se muestra en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos anterior, injertos derivados de órgano/tejido humano de 7 a 8 semanas de edad gestacional, o injertos derivados de órgano/tejido porcino de 20 a 28 días de edad gestacional, trasplantados en un huésped pueden generar órganos/tejidos estructuralmente y funcionalmente diferenciados óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos. En particular, se mostró en este respecto que trasplantes renales humanos o porcinos en las edades gestacionales respectivas anteriormente mencionadas presentan todas aquellas capacidades, que incluye aquellas de generación de órganos renales

productores de orina. Así, mientras se concebía la presente invención, se supuso que el trasplante de injertos derivados de órgano/tejido humano o porcino a las edades gestacionales respectivas anteriormente mencionadas podría usarse para tratar enfermedades de tales órganos/tejidos en seres humanos. En particular, se supuso que el trasplante de los injertos renales anteriormente mencionados podría usarse para tratar enfermedad renal en seres humanos, como se describe a continuación.

Materiales y métodos:

Una cantidad adecuada de tejido renal humano de 7 a 8 semanas de edad gestacional o de tejido renal porcino de 20 a 28 días de edad gestacional se recoge como se describe en el Ejemplo 1, anteriormente, y un número terapéuticamente eficaz de injertos se implanta en una localización anatómica adecuada para trasplante de riñón en un sujeto humano que tiene una enfermedad renal tratable por trasplante de riñón. Opcionalmente, se administra tratamiento de bloqueo de la co-estimulación de ciclo corto al sujeto en forma de administración de CTLA4-Ig, como se describe en el Ejemplo 1 anteriormente. El crecimiento y la diferenciación de injerto(s) en órgano(s) renal(es) funcional(es) se monitoriza hasta que se detecta la producción de orina, momento en el que se realiza anastomosis urinaria entre el injerto y el aparato urinario del sujeto de manera que se permita el drenaje de la orina producida por el injerto mediante el aparato urinario del sujeto. Alternativamente, o conjuntamente con la anastomosis urinaria, el drenaje de la orina producida por el injerto se efectúa mediante un catéter, como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos, anteriormente.

EJEMPLO 3 de referencia

El trasplante de injertos pancreáticos humanos y animales de edad gestacional temprana en un huésped genera órganos/tejidos pancreáticos que muestran crecimiento de 10 veces

Como se describe en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos anterior, órganos/tejidos humanos o porcinos de edad gestacional temprana trasplantados en un huésped pueden generar órganos/tejidos integrados en el huésped estructuralmente y funcionalmente diferenciados, óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos/xenoreactivos. Así, mientras se concebía la presente invención, se supuso que trasplantar órganos/tejidos pancreáticos humanos o animales de edad gestacional temprana en un huésped generaría órganos/tejidos pancreáticos que muestran desarrollo significativo, del siguiente modo.

Materiales y métodos:

Tejidos pancreáticos de donante: Tejidos pancreáticos humanos de 12 a 16 semanas de edad gestacional se obtuvieron tras raspado, con tiempo de isquemia caliente inferior a 30 minutos. Después de la disección, los tejidos pancreáticos se mantuvieron a 4 °C en disolución UW durante menos de 45 minutos en condiciones estériles. El protocolo del estudio fue autorizado por el comité de Helsinki del hospital (Centro Médico Kaplan, Rehovot, Israel).

Tejidos pancreáticos animales a 12 a 14 días de edad gestacional se microdisecionaron de embriones de ratón bajo el microscopio óptico. Los tejidos se mantuvieron a 4 °C en disolución de medio RPMI 1640 antes del trasplante.

Procedimiento de trasplante: El trasplante de órganos/tejidos pancreáticos humanos y animales en edades tempranas del desarrollo gestacional se realizó como se describe en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos anterior con modificaciones. Para el trasplante bajo la cápsula renal, el riñón del huésped se expone mediante una incisión lateral izquierda, se hace una incisión de 1,5 milímetros en el extremo caudal de la cápsula renal, y los tejidos pancreáticos del donante se injertan bajo la cápsula renal en fragmentos de [1-2] × [1-2] milímetros.

Análisis del desarrollo del trasplante: El crecimiento y desarrollo de órganos/tejidos pancreáticos trasplantados se analizó como se describe en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos anterior.

Resultados experimentales:

Cuatro injertos derivados de órgano/tejido pancreático humano de 12 a 16 semanas de edad gestacional se trasplantaron bajo la cápsula renal en 4 ratones SCID y 4 normales. Cada tamaño de fragmento en el trasplante fue 1-2 milímetros de diámetro. En todos los ratones inmunocompetentes, el rechazo se detectó a partir de 5 días después del trasplante como se ha determinado mediante análisis histológico que indica necrosis de injerto y destrucción de tejido. En todos los ratones inmunodeficientes se observó la aceptación del injerto, como se ha determinado por crecimiento del injerto y la ausencia de signos de rechazo tras el examen histológico y macroscópico. En un injerto derivado de tejido pancreático humano de 12 semanas de edad gestacional recogido 8 semanas después del trasplante, el tamaño del injerto había aumentado 10 veces (2 × 2 milímetros antes del trasplante a 8 × 5 milímetros en la recogida; Figura 13).

Órganos/tejidos pancreáticos de ratón de 14, 13 y 12 días de edad gestacional se trasplantaron bajo la cápsula renal en ratones singénicos inmunodeficientes (Balb/c). En un injerto derivado de tejido de 12 días de edad gestacional

recogido 2 semanas después del trasplante, el tamaño del injerto había aumentado 10 veces (1 × 1 milímetro antes del trasplante a 5 × 3 milímetros después del trasplante).

Conclusión: Órganos/tejidos pancreáticos humanos o animales de edad gestacional temprana trasplantados en huéspedes generan órganos/tejidos pancreáticos que muestran desarrollo significativo.

5

EJEMPLO 4

Generación de ratones diabéticos

10 **Métodos y materiales:** La diabetes se induce en huéspedes de ratón por tratamiento con estreptozotocina, como se ha descrito previamente (Soria y col., 2000. Diabetes 49, 1-6). Brevemente, la diabetes se induce en huéspedes de ratón mediante una única inyección intraperitoneal de 200 mg de estreptozotocina (Sigma) recientemente disuelta en tampón citrato (pH = 4,5) por kilogramo de peso corporal. Entonces se confirma la aparición de diabetes y se monitoriza por la presencia de pérdida de peso, poliuria y niveles de glucosa en sangre inferiores a 500 mg/dl. La sangre para las pruebas de glucosa se obtiene por corte en la cola y se mide entre 9 y 11 A.M. bajo condiciones no en ayunas y se analiza con un glucosímetro portátil. Dos semanas tras la inyección de estreptozotocina, receptores diabéticos se injertan con tejidos pancreáticos del donante, y se monitorizan los niveles de glucosa como se ha descrito anteriormente con el fin de determinar la restauración del control glucémico.

20 **EJEMPLO 5 de referencia**

Tratamiento de diabetes por trasplante de tejido pancreático humano o porcino de edad gestacional temprana en receptores humanos diabéticos sin o con inmunodepresión mínima de receptores

25 La diabetes es una enfermedad de enorme impacto médico y económico; sin embargo, el tratamiento de esta enfermedad por inyección diaria de insulina, la terapia convencional de la técnica anterior, no previene satisfactoriamente o alivia sus consecuencias debilitantes o letales. Un enfoque intentado para vencer esta limitación ha sido el tratamiento de diabetes por trasplante de islotes pancreáticos de donantes cadavéricos adultos. Sin embargo, esta estrategia no puede practicarse rutinariamente debido a los insuficientes números de páncreas de donantes alógenos inmunológicamente coincidentes de los que aislar los números suficientes de islotes requeridos. Como se muestra en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos anterior, injertos derivados de órgano/tejido humano de 7 a 8 semanas de edad gestacional, o injertos derivados de órgano/tejido porcino de 20 a 28 días de edad gestacional, trasplantados en huéspedes generan órganos/tejidos estructuralmente y funcionalmente diferenciados de tipo injerto óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos. Como se muestra en el Ejemplo 3 de la sección de Ejemplos anterior, el trasplante de órganos/tejidos pancreáticos humanos o animales de edad gestacional temprana en un huésped genera órganos/tejidos pancreáticos que muestran desarrollo significativo. Así, mientras se concebía la presente invención, se supuso que el trasplante de órganos/tejidos pancreáticos humanos o porcinos a las edades gestacionales respectivas anteriormente mencionadas podría usarse para tratar diabetes en seres humanos, como se describe a continuación.

40

Materiales y métodos:

Una cantidad adecuada de islotes pancreáticos de tejido pancreático humano de 7 a 8 semanas de edad gestacional o de tejido pancreático porcino de 20 a 28 días de edad gestacional se aísla y se trasplanta en un receptor humano diabético según técnicas del estado de la materia, como se ha descrito previamente [Institutos Nacionales de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales (NIDDK; <http://www.niddk.nih.gov>)]. Brevemente, se usa ultrasonidos para guiar la colocación de un pequeño catéter a través del abdomen superior y en el hígado del sujeto. Entonces, los islotes pancreáticos se inyectan por el catéter en el hígado. El receptor recibe un anestésico local; sin embargo, si el receptor no puede tolerar la anestesia local, se usa anestesia general, y el trasplante se realiza por una pequeña incisión. Normalmente, para un receptor de 70 kilogramos, se administran aproximadamente un millón de islotes pancreáticos. Dura algún tiempo que las células administradas se unan a nuevos vasos sanguíneos y empiecen a liberar insulina, y de ahí que tras el trasplante los niveles de glucosa en sangre del receptor se monitoricen de cerca y se administre insulina exógena según se necesite hasta que se alcance el control glucémico. Opcionalmente, para prevenir el rechazo del injerto, el receptor se inmunodeprime temporalmente por bloqueo de ciclo corto de la coestimulación en forma de administración de CTLA4-Ig, como se describe en el Ejemplo 1 anterior.

55

EJEMPLO 6 de referencia

60 **El trasplante de injertos de hígado humano de 7 semanas de edad gestacional o porcino de 28 días de edad gestacional genera, en ausencia de teratomas derivados del injerto, órganos/tejidos hepáticos estructuralmente y funcionalmente diferenciados que serán óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos: base para el tratamiento óptimo de enfermedades hepáticas**

65 El trasplante de órgano/tejido de hígado de donante alógeno sigue siendo la opción terapéutica óptima en caso de insuficiencia hepática. Sin embargo, el trasplante terapéutico de injertos de órgano/tejido de hígado derivado de un donante alógeno es frecuentemente imposible de implementar debido a barreras de coincidencia del haplotipo.

Además, incluso cuando se encuentre un donante coincidente, con el fin de prevenir el rechazo del injerto, tal trasplante requiere inmunodepresión permanente del receptor del injerto, normalmente mediante la administración de fármacos inmunodepresores tóxicos tales como ciclosporina A. Tales tratamientos inmunodepresores contribuyen a los inconvenientes del trasplante alógeno, ya que éstos son frecuentemente insatisfactorios en prevenir el rechazo del injerto a corto plazo, y son generalmente incapaces de prevenir indefinidamente el rechazo del injerto. Una alternativa al trasplante de aloinjerto implica el trasplante de xenoinjertos, en particular injertos porcinos, que se consideran la alternativa animal óptima a los injertos humanos. Sin embargo, los xenoinjertos generalmente no pueden usarse para trasplante debido a la tolerancia altamente insuficiente de tales injertos por los linfocitos humanos. Así, son altamente deseados órganos/tejidos hepáticos adecuados para el trasplante terapéutico en seres humanos y tolerados por linfocitos humanos no singénicos, y fuentes adecuadas de tales órganos/tejidos. Una potente estrategia para proporcionar órganos/tejidos hepáticos para trasplante implica usar injertos de tales órganos/tejidos en edades de desarrollo tempranas, ya que se ha demostrado que cuanto más temprana sea la edad de desarrollo de un órgano/tejido, mejor será tolerado cuando se trasplante en un huésped no singénico. Sin embargo, hasta la fecha no se han conseguido crecimiento y diferenciación satisfactorios de injertos de órgano/tejido hepático no singénico en desarrollo, y tolerancia inmunológica satisfactoria de tales injertos por linfocitos humanos en ausencia de teratomas derivados del injerto.

Mientras se concebía la presente invención, se supuso que existe una edad de desarrollo durante la cual los órganos/tejidos hepáticos se diferencian suficientemente para comprometerse al desarrollo específico de hígado en ausencia de teratomas derivados del injerto, aunque no se diferencian suficientemente de manera que sean óptimamente tolerados cuando se trasplantan en un huésped no singénico. Aunque la presente invención se reduce a la práctica, se descubrió inesperadamente la existencia de edades gestacionales específicas durante las cuales órganos/tejidos hepáticos humanos y porcinos pueden trasplantarse en un huésped de manera que generen, en ausencia de teratomas derivados del injerto, órganos/tejidos estructuralmente y funcionalmente diferenciados hepáticos que serán óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos, como se describe a continuación.

Materiales y métodos:

Recolección de órganos/tejidos hepáticos humanos de edad gestacional: Se obtuvieron órganos/tejidos hepáticos humanos de edad gestacional para trasplante por extracción de fragmentos de órganos/tejidos tras abortos voluntarios realizados mecánicamente por aspiración a una edad gestacional de 7 semanas, después de obtener el consentimiento informado. El tiempo de isquemia caliente de las muestras recogidas se mantuvo por debajo de 30 minutos, y tras la disección, los precursores de órgano se mantuvieron a 40 grados centígrados en disolución UW o PBS durante menos de 45 minutos bajo condiciones estériles. El protocolo del estudio fue autorizado por el comité de Helsinki del hospital (Centro Médico Kaplan, Rehovot, Israel).

Recolección de órganos/tejidos hepáticos porcinos de edad gestacional: Se obtuvieron órganos/tejidos hepáticos porcinos de edad gestacional para trasplante con la ayuda del Instituto Lahav para investigación animal, Kibbutz Lahav. Se recogieron tejidos en desarrollo a una edad gestacional de 28 días de cerdas preñadas operadas bajo anestesia general. El protocolo del estudio fue autorizado por el comité ético del instituto local. Se extrajeron tejidos para trasplante bajo un microscopio óptico y se mantuvieron en condiciones estériles a 40 grados centígrados durante aproximadamente dos horas en RPMI 1640 (Biological Industries, Bet HaEmek, Israel) antes del trasplante.

Procedimientos de trasplante: Se realizaron trasplantes en receptores NOD/SCID bajo anestesia general inducida por inyección intraperitoneal de 2,5 % de Avertin en PBS (10 ml/kg). Para el trasplante bajo la cápsula renal, el riñón del huésped se expuso mediante una incisión lateral izquierda. Se hizo una incisión de 1,5 mm en el extremo caudal de la cápsula renal, y fragmentos de 1-2 mm de diámetro de injertos de hígado de edad gestacional se implantaron bajo la cápsula renal. Para trasplante intra-bazo, tejido de hígado de edad gestacional se picó a fragmentos de 1 mm en PBS estéril. El bazo del huésped se expuso mediante una incisión lateral izquierda y una suspensión de fragmentos de 1 mm de diámetro de hígado de edad gestacional se inyectó en el polo inferior del bazo. La hemostasia se logró por ligación con sutura por debajo del sitio de inyección.

Análisis histológico: Se fijaron tejidos por incubación durante la noche en 4 por ciento de paraformaldehído en PBS, los tejidos fijados se procesaron mediante alcoholes graduados, mediante xilenos, y se incorporaron en parafina. Se cortaron y montaron secciones de cuatro micrómetros de espesor de tejidos incorporados en portaobjetos de vidrio positivamente cargados. Las secciones de tejido montadas en portaobjetos se desparafinaron en xileno tras la rehidratación en alcoholes graduados. La peroxidasa endógena se inactivó en 0,6 por ciento de peróxido de hidrógeno en 70 por ciento de metanol durante 20 minutos. Cuando se necesitó se aplicó recuperación de antígeno hirviendo en microondas o pretratamiento de proteasa. Para la inmunotinción se incubaron portaobjetos en una cámara humidificada durante 60 minutos con anticuerpo primario, tras la aplicación del sistema DAKO Envision TM+, peroxidasa de rábano picante (HRP). Se usaron reactivos de diaminobencidina (DAB) o aminoetilcarbasol (AEC) como cromógenos. Los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina y se montaron.

Se obtuvo anticuerpo anti-albúmina porcina de Bethyl Laboratories; se usó anticuerpo anti-Ki67 como marcador de proliferación celular, y se usó colorante de ácido peryódico de Schiff (PAS) como marcador de la síntesis de

glucógeno.

Más detalles referentes a los protocolos experimentales descritos en este ejemplo pueden proporcionarse bajo Materiales y métodos en el Ejemplo 1 de esta sección, anteriormente.

5

Resultados experimentales:

Xenoinjertos hepáticos porcinos de 28 días de edad gestacional, pero no 21 días, se injertan y muestran diferenciación hepática funcional y estructural: Injertos derivados de hígado porcino de 21 días de edad gestacional trasplantados en receptores de ratón NOD/SCID portadores de CMSP humanas xenorreactivas mostraron un claro desarrollo de teratoma (Figura 14a) con amplia diferenciación de cartilago (Figura 14b) cuando se examinaron 7 semanas después del trasplante, que indica claramente por primera vez que la edad gestacional óptima para el trasplante de tales tejidos para obtener diferenciación hepática adecuada en ausencia de teratomas es superior al día 21 de gestación. A diferencia, injertos derivados de hígado porcino de 28 días de edad gestacional trasplantados en bazos de tales ratones que se examinaron 6 semanas después del trasplante mostraron diferenciación de hígado estructural y funcional específica, 6 semanas después del trasplante. Las secciones de injerto de tejido teñidas con H&E, ácido peryódico de Schiff o anticuerpo anti-albúmina porcina (Figuras 15a, 15b, y 15c, respectivamente) todas mostraron marcada diferenciación de estructuras lobulares hepáticas. La funcionalidad hepática se demostró por síntesis/almacenamiento de glucógeno, y por síntesis de albúmina (Figuras 15b y 15c, respectivamente). Además, la tinción de secciones con anticuerpo específico para el marcador de proliferación Ki67 demostró la clara capacidad proliferativa de los hepatocitos derivados de injerto. Similarmente, tales injertos trasplantados bajo la cápsula renal de tales receptores analizados 6 semanas después del trasplante también mostraron función hepática, como se demuestra por síntesis/almacenamiento de glucógeno, y síntesis de albúmina, como se ha determinado por tinción de secciones de injerto de tejido usando ácido peryódico de Schiff, y anticuerpo anti-albúmina porcina (Figuras 16a y 16b, respectivamente).

Aloinjertos hepáticos humanos de 7 semanas de edad gestacional se injertan y muestran diferenciación hepática funcional y estructural: Injertos derivados de hígado humano de 7 semanas de edad gestacional trasplantados bajo la cápsula renal de ratones NOD/SCID mostraron diferenciación de hígado estructural y funcional específica, 6 semanas después del trasplante. Las secciones de injerto de tejido teñidas con H&E o ácido peryódico de Schiff mostraron diferenciación marcada de los conductos biliares, y síntesis/almacenamiento de glucógeno (Figuras 17a, y 17b, respectivamente).

Conclusión: Los resultados anteriormente descritos demuestran convincentemente que injertos derivados de hígado humano de 7 semanas de edad gestacional, o injertos derivados de hígado porcino de 28 días de edad gestacional, pero no 21 días, pueden generar, en ausencia de teratomas derivados del injerto, órganos/tejidos hepáticos estructuralmente y funcionalmente diferenciados que serán óptimamente tolerados por linfocitos humanos alógenos/xenógenos. Como tales, los resultados anteriormente descritos demuestran que injertos derivados de hígado humano de 7 semanas de edad gestacional, o injertos derivados de hígado porcino de 28 días, pueden usarse para realizar óptimamente el trasplante terapéutico de tejidos/órganos hepáticos alógenos y xenógenos, respectivamente, con respecto a todos los procedimientos de la técnica anterior.

EJEMPLO 7 de referencia

El trasplante de injertos pancreáticos humanos de 8 semanas de edad gestacional, o porcinos de 27 a 28 días de edad gestacional, genera, en ausencia de teratomas derivados del injerto, órganos/tejidos pancreáticos productores de insulina que serán óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos: base para el tratamiento óptimo de diabetes

El trasplante de órgano/tejido pancreático de donante alógeno sigue siendo la opción terapéutica óptima en caso de insuficiencia pancreática. Sin embargo, el trasplante terapéutico de injertos de órgano/tejido pancreático derivados de un donante alógeno es frecuentemente imposible de implementar debido a barreras de coincidencia de haplotipo. Además, incluso cuando se encuentre un donante coincidente, con el fin de prevenir el rechazo del injerto, tal trasplante requiere inmunodepresión permanente del receptor del injerto, normalmente mediante la administración de fármacos inmunodepresores tóxicos tales como ciclosporina A. Tales tratamientos inmunodepresores contribuyen a los inconvenientes del trasplante alógeno, ya que éstos son frecuentemente insatisfactorios en prevenir el rechazo del injerto a corto plazo, y son generalmente incapaces de prevenir indefinidamente el rechazo del injerto. Una alternativa al trasplante de aloinjerto implica el trasplante de xenoinjertos, en particular injertos porcinos, que se considera la alternativa animal óptima a los injertos humanos. Sin embargo, los xenoinjertos generalmente no pueden usarse para trasplante debido a la tolerancia altamente insuficiente de tales injertos por linfocitos humanos. Así, son altamente deseados órganos/tejidos pancreáticos adecuados para el trasplante terapéutico en seres humanos y tolerados por linfocitos humanos no singénicos, y fuentes adecuadas de tales órganos/tejidos. Una potente estrategia para proporcionar órganos/tejidos pancreáticos para trasplante implica usar injertos de tales órganos/tejidos en edades de desarrollo tempranas, ya que se ha demostrado que cuanto más temprana sea la edad de desarrollo de un órgano/tejido, mejor será tolerado cuando se trasplante en un huésped no singénico. Sin embargo, hasta la fecha no se ha conseguido la generación de tejidos/órganos derivados de injerto pancreático que

muestran crecimiento y diferenciación satisfactorios en ausencia de teratomas derivados del injerto, y tolerancia inmunológica satisfactoria por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos, sin o con inmunodepresión mínima.

Mientras se concebía la presente invención, se supuso que existe una edad de desarrollo durante la cual los órganos/tejidos pancreáticos se diferencian suficientemente para comprometerse al desarrollo específico de páncreas en ausencia de teratomas derivados del injerto, aunque no se diferencian suficientemente de manera que sean óptimamente tolerados cuando se trasplantan en un huésped no singénico. Aunque la presente invención se reduce a la práctica, se descubrió inesperadamente la existencia de edades gestacionales específicas durante las cuales órganos/tejidos pancreáticos humanos o porcinos pueden trasplantarse en un huésped de manera que generen, en ausencia de teratomas derivados del injerto, órganos/tejidos productores de insulina estructuralmente y funcionalmente diferenciados que serán óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos, como se describe a continuación.

Materiales y métodos:

Recolección de órganos/tejidos pancreáticos humanos de edad gestacional: Se obtuvieron órganos/tejidos pancreáticos humanos de edad gestacional para trasplante por extracción de fragmentos de órganos/tejidos tras abortos voluntarios realizados mecánicamente por aspiración a una edad gestacional de 8 semanas, después de obtener el consentimiento informado. El tiempo de isquemia caliente de las muestras recogidas se mantuvo por debajo de 30 minutos, y tras la disección, los precursores de órgano se mantuvieron a 40 grados centígrados en disolución UW o PBS durante menos de 45 minutos bajo condiciones estériles. El protocolo del estudio fue autorizado por el comité de Helsinki del hospital (Centro Médico Kaplan, Rehovot, Israel).

Recolección de órganos/tejidos pancreáticos porcinos de edad gestacional: Se obtuvieron órganos/tejidos pancreáticos porcinos de edad gestacional para trasplante con la ayuda del Instituto Lahav para investigación animal, Kibbutz Lahav. Se recogieron tejidos en desarrollo a una edad gestacional de 27-28 días de cerdas preñadas operadas bajo anestesia general. El protocolo del estudio fue autorizado por el comité ético del instituto local. Se extrajeron tejidos para trasplante bajo un microscopio óptico y se mantuvieron en condiciones estériles a 40 grados centígrados durante aproximadamente dos horas en RPMI 1640 (Biological Industries, Bet HaEmek, Israel) antes del trasplante.

Procedimiento de trasplante: Se realizaron trasplantes en quimeras Balb/c × NOD/SCID o ratones NOD/SCID bajo anestesia general inducida por inyección intraperitoneal de 2,5 % de Avertin en PBS (10 ml/kg). Para el trasplante bajo la cápsula renal, el riñón del huésped se expuso mediante una incisión lateral izquierda. Se hizo una incisión de 1,5 mm en el extremo caudal de la cápsula renal, y fragmentos de 1-2 mm de diámetro de tejido pancreático de edad gestacional se implantaron bajo la cápsula renal.

Análisis histológico: Se usó el clon del anticuerpo anti-citoqueratina MNF 116 (no reactivo de forma cruzada con tejidos de ratón) para inmunotinción de epitelio porcino; y el clon de anticuerpo anti-insulina y anticuerpo anti-vimentina humana V9 (no reactivos de forma cruzada con tejidos de ratón; usados para tinción de células mesenquimatosas humanas) se obtuvieron de DAKO. Los tejidos se fijaron por incubación durante la noche en 4 por ciento de paraformaldehído en PBS, los tejidos fijados se procesaron mediante alcoholes graduados, mediante xilenos, y se incorporaron en parafina. Se cortaron y montaron secciones de cuatro micrómetros de espesor de tejidos incorporados en portaobjetos de vidrio positivamente cargados. Las secciones de tejido montadas en portaobjetos se desparafinaron en xileno tras la rehidratación en alcoholes graduados. La peroxidasa endógena se inactivó en 0,6 por ciento de peróxido de hidrógeno en 70 por ciento de metanol durante 20 minutos. Cuando se necesitó se aplicó recuperación de antígeno hirviendo en microondas o pretratamiento de proteasa. Para la inmunotinción se incubaron portaobjetos en una cámara humidificada durante 60 minutos con anticuerpo primario, tras la aplicación del sistema DAKO Envision TM+, peroxidasa de rábano picante (HRP). Se usaron reactivos de diaminobencidina (DAB) o aminoetilcarbasol (AEC) como cromógenos. Los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina y se montaron.

Resultados experimentales:

Trasplante de xenoinjertos pancreáticos porcinos de 27 a 28 días de edad gestacional se injertan y muestran diferenciación pancreática funcional y estructural: Injertos derivados de páncreas porcino de 27 a 28 días de edad gestacional trasplantados bajo la cápsula renal de ratones NOD/SCID mostraron claramente diferenciación de páncreas estructural y funcional específica, 6 semanas después del trasplante. Los injertos derivados de hígado porcino de 28 días de edad gestacional trasplantados en bazos de tales ratones que se examinaron 5 semanas después del trasplante mostraron crecimiento pancreático significativo, como puede apreciarse de una fotografía de injerto completo (Figura 18a). La diferenciación estructural pancreática fue claramente evidente 6 semanas después del trasplante por un injerto derivado de tejido pancreático porcino de 27 días de edad gestacional como se ha determinado mediante secciones de injerto de tejido teñidas con H&E que mostraron diferenciación de estructuras lobulares pancreáticas con estructuras pancreáticas de conductos y acinosas (Figuras 18b-c). La diferenciación funcional pancreática también fue evidente 6 semanas después del trasplante en secciones de tejido de un injerto derivado de tejido de 27 días de edad gestacional en forma de síntesis de péptidos de insulina y pancreáticos (Figuras 19a y 19b, respectivamente). Como puede observarse adicionalmente en la Figura 19c, la inmunotinción de

un injerto derivado de tejido pancreático porcino de 28 días de edad gestacional con anticuerpo anti-citoqueratina mostró claramente diferenciación de epitelios de conductos pancreáticos derivados de injerto.

Aloinjertos pancreático humanos de 8 semanas de edad gestacional se injertan y muestran diferenciación pancreática funcional y estructural:

Injertos derivados de tejido pancreático humano de 8 semanas de edad gestacional trasplantado bajo la cápsula renal de ratones NOD/SCID portadores de linfocitos humanos alorreactivos mostraron claramente diferenciación de páncreas estructural y funcional específica, 6 semanas después del trasplante. La funcionalidad pancreática del injerto se demostró convincentemente por diferenciación de células beta positivas para insulina dentro de islotes pancreáticos (Figuras 20a-b). Además, injertos derivados de tejido pancreático humano de 8 semanas de edad gestacional trasplantados bajo la cápsula renal de quimeras de Balb/c x NOD/SCID portadoras de CMSP humanas alorreactivas también mostraron claramente diferenciación de páncreas estructural y funcional específica, como se muestra mediante diferenciación de células mesenquimatosas humanas positivas para vimentina (Figuras 20c-d).

Conclusión: Los resultados anteriormente descritos demuestran convincentemente que injertos derivados de tejido pancreático humano de 8 semanas de edad gestacional, o porcino de 27 a 28 días de edad gestacional, pueden generar, en ausencia de teratomas derivados del injerto, órganos/tejidos pancreáticos productores de insulina estructuralmente y funcionalmente diferenciados que serán óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos. Como tales, los resultados anteriormente descritos demuestran que injertos derivados de tejido pancreático humano de 8 semanas de edad gestacional, o injertos derivados de tejido pancreático porcino de 27 a 28 días, pueden usarse para realizar óptimamente trasplante terapéutico de tejidos/órganos pancreáticos alógenos/xenógenos respectivamente, con respecto a todos los procedimientos de la técnica anterior.

EJEMPLO 8

El trasplante de injertos derivados de tejido cardíaco humano de 9 semanas de edad gestacional genera, en ausencia de teratomas derivados del injerto, células/tejidos que muestran un fenotipo cardíaco proliferativo que será óptimamente tolerado por linfocitos humanos alorreactivos: base para el tratamiento óptimo de enfermedades cardíacas

El trasplante de órgano/tejido cardíaco de donante alógeno sigue siendo la opción terapéutica óptima en caso de insuficiencia cardíaca. Sin embargo, el trasplante terapéutico de injertos derivados de órgano/tejido cardíaco de un donante alógeno es frecuentemente imposible de implementar debido a barreras de coincidencia de haplotipo. Además, incluso cuando se encuentre un donante coincidente, con el fin de prevenir el rechazo del injerto, tal trasplante requiere inmunodepresión permanente del receptor del injerto, normalmente mediante la administración de fármacos inmunodepresores tóxicos tales como ciclosporina A. Tales tratamientos inmunodepresores contribuyen a los inconvenientes del trasplante alógeno, ya que éstos son frecuentemente insatisfactorios en prevenir el rechazo del injerto a corto plazo, y son generalmente incapaces de prevenir indefinidamente el rechazo del injerto. Así, son altamente deseados órganos/tejidos cardíacos adecuados para el trasplante terapéutico en seres humanos y tolerados por linfocitos humanos no singénicos, y fuentes adecuadas de tales órganos/tejidos. Una potente estrategia para proporcionar órganos/tejidos cardíacos para trasplante implica usar injertos de tales órganos/tejidos en edades de desarrollo tempranas, ya que se ha demostrado que cuanto más temprana sea la edad de desarrollo de un órgano/tejido, mejor será tolerado cuando se trasplante en un huésped no singénico. Sin embargo, hasta la fecha no se han conseguido crecimiento y diferenciación satisfactorios de injertos de órgano/tejido cardíaco no singénicos en desarrollo, y tolerancia inmunológica satisfactoria de tales injertos por linfocitos humanos en ausencia de teratomas derivados del injerto.

Mientras se concebía la presente invención, se supuso que existe una edad de desarrollo durante la cual los órganos/tejidos cardíacos se diferencian suficientemente para comprometerse al desarrollo específico de corazón en ausencia de formación de teratomas derivados del injerto, aunque no se diferencian suficientemente de manera que sean óptimamente tolerados cuando se trasplantan en un huésped no singénico. Aunque la presente invención se reduce a la práctica, se descubrió inesperadamente la existencia de edades gestacionales específicas durante las cuales órganos/tejidos cardíacos humanos pueden trasplantarse en un huésped de manera que generen, en ausencia de teratomas derivados del injerto, órganos/tejidos que muestran un fenotipo cardíaco proliferativo que serán óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos, como se describe a continuación.

Materiales y métodos:

Recolección de órganos/tejidos cardíacos humanos de edad gestacional: Se obtuvieron órganos/tejidos cardíacos humanos de edad gestacional para trasplante por extracción de fragmentos de órganos/tejidos tras abortos voluntarios realizados mecánicamente por aspiración a una edad gestacional de 9 semanas, después de obtener el consentimiento informado. El tiempo de isquemia caliente de las muestras recogidas se mantuvo por debajo de 30 minutos, y tras la disección, los precursores de órgano se mantuvieron a 40 grados centígrados en disolución UW o PBS durante menos de 45 minutos bajo condiciones estériles. El protocolo del estudio fue autorizado por el comité de Helsinki del hospital (Centro Médico Kaplan, Rehovot, Israel).

Procedimientos de trasplante: Se realizaron trasplantes en receptores NOD/SCID bajo anestesia general inducida

por inyección intraperitoneal de 2,5 % de Avertin en PBS (10 ml/kg). Para el trasplante bajo la cápsula renal, el riñón del huésped se expuso mediante una incisión lateral izquierda. Se hizo una incisión de 1,5 mm en el extremo caudal de la cápsula renal, y fragmentos de 1-2 mm de diámetro de los injertos de corazón de edad gestacional se implantaron bajo la cápsula renal.

5 **Análisis histológico:** Se usaron anticuerpo anti-alfa-actina sarcómera y anticuerpo anti-proteína del neurofilamento, respectivamente, para teñir células cardiomiocíticas y células ganglionares basales. Los tejidos se fijaron por incubación durante la noche en 4 por ciento de paraformaldehído en PBS, los tejidos fijados se procesaron mediante alcoholes graduados, mediante xilenos, y se incorporaron en parafina. Se cortaron y montaron secciones de cuatro micrómetros de espesor de tejidos incorporados en portaobjetos de vidrio positivamente cargados. Las secciones de tejido montadas en portaobjetos se desparafinaron en xileno tras la rehidratación en alcoholes graduados. La peroxidasa endógena se inactivó en 0,6 por ciento de peróxido de hidrógeno en 70 por ciento de metanol durante 20 minutos. Cuando se necesitó se aplicó recuperación de antígeno hirviendo en microondas o pretratamiento de proteasa. Para la inmunotinción se incubaron portaobjetos en una cámara humidificada durante 60 minutos con anticuerpo primario, tras la aplicación del sistema DAKO Envision TM+, peroxidasa de rábano picante (HRP). Se usaron reactivos de diaminobencidina (DAB) o aminoetilcarbasol (AEC) como cromógenos. Los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina y se montaron.

20 **Resultados experimentales:**

25 **Aloinjertos de tejido cardíaco humano de 9 semanas de edad gestacional se injertan y muestran un fenotipo cardíaco proliferativo:** Injertos derivados de tejido cardíaco humano de 9 semanas de edad gestacional trasplantados bajo la cápsula renal de ratones portadores de CMSP humanas alorreactivas mostraron claramente un fenotipo cardíaco proliferativo 6 semanas después del trasplante. La diferenciación cardíaca de los injertos en forma de diferenciación de células cardiomiocíticas y células ganglionares basales se mostró claramente en secciones de injerto de tejido teñidas con anticuerpo anti-alfa-actina sarcómera o anticuerpo anti-proteína del neurofilamento (Figuras 21a y 21b, respectivamente).

30 **Conclusión:** Los resultados anteriormente descritos demuestran convincentemente que injertos derivados de tejido cardíaco humano de 9 semanas de edad gestacional pueden generar, en ausencia de teratomas derivados del injerto, células/tejidos derivados de injerto que muestran un fenotipo cardíaco proliferativo que serán óptimamente tolerados por linfocitos humanos alógenos. Como tales, los resultados anteriormente descritos demuestran que injertos derivados de órgano/tejido cardíaco humano de 9 semanas de edad gestacional pueden usarse para realizar óptimamente el trasplante terapéutico de órganos/tejidos cardíacos alógenos, respectivamente, con respecto a todos los procedimientos de la técnica anterior.

35 **EJEMPLO 9**

40 **El trasplante de injertos derivados de órgano/tejido linfoide porcino de 28 días de edad gestacional genera, en ausencia de teratomas derivados del injerto, tejidos mesenquimatosos/del estroma linfoides bien diferenciados y vascularizados que serán óptimamente tolerados por linfocitos humanos xenorreactivos: base para el tratamiento óptimo de enfermedades genéticas y/o hematológicas**

45 El trasplante de órganos/tejidos linfoides que pueden generar estroma linfoide de origen xenógeno, en particular de origen porcino, que se consideran la alternativa animal óptima a injertos humanos, es una opción terapéutica posiblemente óptima para enfermedades hematológicas y/o genéticas, que incluye aquellas asociadas a un trastorno de coagulación/deficiencia del factor de coagulación/disfunción tal como hemofilia, aquellas asociadas a una deficiencia/disfunción enzimática, tal como enfermedad de Gaucher, y/o aquellas asociadas a un defecto del estroma linfoide. Sin embargo, los xenoinjertos generalmente no pueden usarse para trasplante debido a la tolerancia altamente insuficiente de tales injertos por linfocitos humanos. Así, son altamente deseados órganos/tejidos linfoides adecuados para el trasplante terapéutico en seres humanos y tolerados por linfocitos humanos xenógenos, y fuentes adecuadas de tales órganos/tejidos. Una potente estrategia para proporcionar tales órganos/tejidos linfoides para trasplante implica usar injertos de tales órganos/tejidos en edades de desarrollo tempranas, ya que se ha demostrado que cuanto más temprana sea la edad de desarrollo de un órgano/tejido, mejor será tolerado cuando se trasplante en un huésped no singénico. Sin embargo, hasta la fecha no se han conseguido crecimiento y diferenciación satisfactorios de injertos de órgano/tejido linfoide xenógeno en desarrollo, y tolerancia inmunológica satisfactoria de tales injertos por linfocitos humanos xenorreactivos en ausencia de teratomas derivados del injerto.

60 Mientras se concebía la presente invención, se supuso que existe una edad de desarrollo durante la cual los órganos/tejidos linfoides se diferencian suficientemente para comprometerse al desarrollo específico de órgano/tejido linfoide en ausencia de teratomas derivados del injerto, aunque no se diferencian suficientemente de manera que sean óptimamente tolerados cuando se trasplantan en un huésped no singénico. Aunque la presente invención se reduce a la práctica, se descubrió inesperadamente la existencia de edades gestacionales específicas durante las cuales órganos/tejidos linfoides porcinos pueden trasplantarse en un huésped de manera que generen, en ausencia de teratomas derivados del injerto, tejidos mesenquimatosos/del estroma linfoides bien diferenciados y

vascularizados que serán óptimamente tolerados por linfocitos humanos xenorreactivos, como se describe a continuación.

Materiales y métodos:

5 **Recolección de órganos/tejidos esplénicos porcinos de edad gestacional:** Se obtuvieron órganos/tejidos esplénicos porcinos de edad gestacional para trasplante con la ayuda del Instituto Lahav para investigación animal, Kibbutz Lahav. Los tejidos en desarrollo se recogieron a una edad gestacional de 28 días de cerdas preñadas operadas bajo anestesia general. El protocolo del estudio fue autorizado por el comité ético del instituto local. Se extrajeron tejidos para trasplante bajo un microscopio óptico y se mantuvieron en condiciones estériles a 40 grados centígrados durante aproximadamente dos horas en RPMI 1640 (Biological Industries, Bet HaEmek, Israel) antes del trasplante.

15 **Procedimientos de trasplante:** Se realizaron trasplantes de injerto de tejido esplénico en ratones NOD/SCID bajo anestesia general inducida por inyección intraperitoneal de 2,5 % de Avertin en PBS (10 ml/kg). Para el trasplante bajo la cápsula renal, el riñón del huésped se expuso mediante una incisión lateral izquierda. Se hizo una incisión de 1,5 mm en el extremo caudal de la cápsula renal, y fragmentos de 1-2 mm de diámetro de injertos de tejido esplénico de edad gestacional se implantaron bajo la cápsula renal.

20 **Análisis histológico:** Se usó tinción con H&E para identificar diferenciación esplénica. Los tejidos se fijaron por incubación durante la noche en 4 por ciento de paraformaldehído en PBS, los tejidos fijados se procesaron mediante alcoholes graduados, mediante xilenos, y se incorporaron en parafina. Se cortaron y montaron secciones de cuatro micrómetros de espesor de tejidos incorporados en portaobjetos de vidrio positivamente cargados. Las secciones de tejido montadas en portaobjetos se desparafinaron en xileno tras la rehidratación en alcoholes graduados. La peroxidasa endógena se inactivó en 0,6 por ciento de peróxido de hidrógeno en 70 por ciento de metanol durante 20 minutos.

Resultados experimentales:

30 **Xenoinjertos esplénicos porcinos de 28 días de edad gestacional se injertan y muestran diferenciación esplénica:** El análisis, 6 semanas después del trasplante, de secciones teñidas con H&E de injertos derivados de tejido esplénico porcino de 28 días de edad gestacional trasplantado bajo la cápsula renal de ratones mostró claramente la generación de tejidos mesenquimatosos/del estroma linfoides bien diferenciados y vascularizados que serán óptimamente tolerados por linfocitos humanos xenógenos (Figura 22).

35 **Conclusión:** Los resultados anteriormente descritos demuestran convincentemente que injertos de órgano/tejido linfoide porcino de 28 días de edad gestacional pueden generar, en ausencia de teratomas derivados del injerto, tejidos mesenquimatosos/del estroma linfoides derivados de injerto bien diferenciados y vascularizados que serán óptimamente tolerados por linfocitos humanos xenorreactivos. Como tales, los resultados anteriormente descritos demuestran que injertos de órgano/tejido linfoide porcino de 28 días pueden usarse para realizar óptimamente el trasplante terapéutico de tejidos linfoides xenógenos con respecto a todos los procedimientos de la técnica anterior, por ejemplo para el tratamiento de enfermedades hematológicas y/o genéticas, que incluyen aquellas asociadas a un trastorno de la coagulación/deficiencia de factor de coagulación/disfunción tal como hemofilia, aquellas asociadas a una deficiencia/disfunción enzimática, tales como enfermedad de Gaucher, y/o aquellas asociadas a un defecto del estroma linfoide.

45 Se aprecia que ciertas características de la invención, que se describen, por claridad, en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. En cambio, diversas características de la invención que se describen, por brevedad, en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

50 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Reisner, Yair Dekel, Benjamin
 <120> PROCEDIMIENTOS DE TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD POR TRASPLANTE DE ÓRGANOS O
 55 TEJIDOS ALÓGENOS O XENÓGENOS
 <130> 27542
 <160> 12
 <170> PatentIn versión 3.1
 <210> 1
 60 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de ADN monocatenario
 65 <400> 1
 gaccaaggaa gtaaagtggc 20

<210> 2
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador de ADN monocatenario
 <400> 2
 aggagagggtg aggctctgga aaac 24
 10 <210> 3
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de ADN monocatenario
 15 <400> 3
 cactatggga ctgagtaaca ttc 23
 <210> 4
 <211> 23
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de ADN monocatenario
 <400> 4
 gcactgacag ttcagaattc atc 23
 25 <210> 5
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Cebador de ADN monocatenario
 <400> 5
 ctctgcagtg cgtcctctgg gg 22
 <210> 6
 <211> 24
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de ADN monocatenario
 <400> 6
 40 gatggtatca gaaaccctg tagc 24
 <210> 7
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Cebador de ADN monocatenario
 <400> 7
 50 tatcaccag atgattgggt cagc 24
 <210> 8
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Cebador de ADN monocatenario
 <400> 8
 ccagggttac caactgttg ctca 24
 <210> 9
 <211> 22
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador de ADN monocatenario
 <400> 9
 65 atgaaggtct ccgcggcagc cc 22
 <210> 10

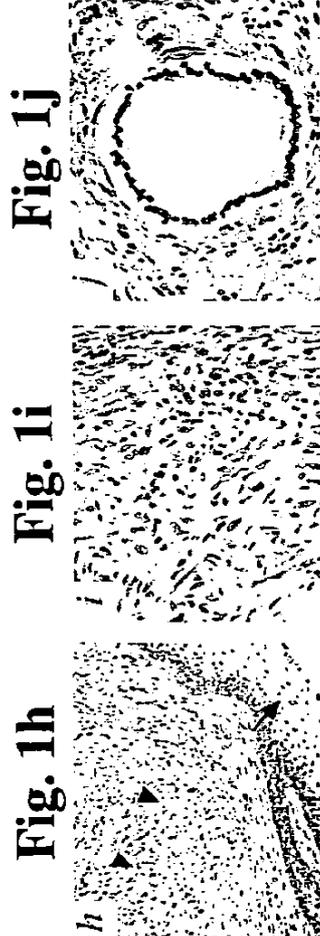
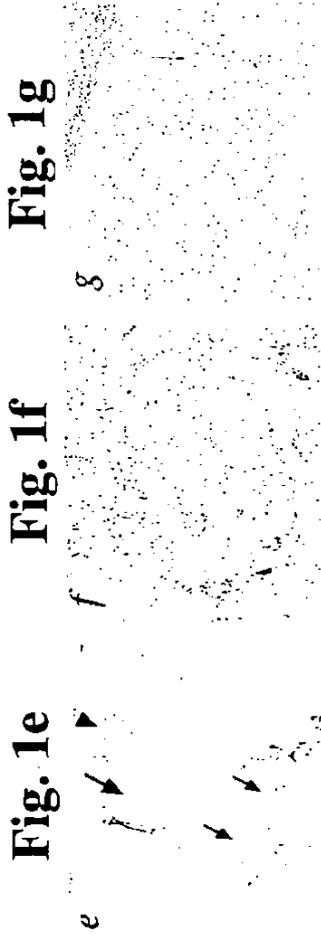
ES 2 445 523 T3

<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
5 <223> Cebador de ADN monocatenario
<400> 10
ctagctcatc tccaaagagt tg 22
<210> 11
<211> 22
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador de ADN monocatenario
<400> 11
15 accatcaagc tctgcgtgac tg 22
<210> 12
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
20 <220>
<223> Cebador de ADN monocatenario
<400> 12
gcaggtcagt tcagttccag gtc 23
25

REIVINDICACIONES

1. Un injerto de órgano pancreático completo o parcial, porcino y de edad gestacional, para su uso en el tratamiento de un trastorno pancreático asociado a una fisiología o morfología patológicas de órgano o tejido, no expresando o presentando el injerto de órgano pancreático completo o parcial seleccionado al menos una molécula que pueda estimular o potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto, en el que dicha al menos una molécula es un co-receptor de linfocitos o ligando de co-receptor de linfocitos, y en donde dicho injerto de órgano completo o parcial porcino está seleccionado a una edad específica de diferenciación correspondiente a 20 a 42 días de gestación.
2. El injerto de órgano pancreático completo o parcial según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un trastorno pancreático asociado a una fisiología o morfología patológicas de órgano o tejido de la reivindicación 1, en donde dicho sujeto es un ser humano.
3. El injerto de órgano pancreático completo o parcial según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un trastorno pancreático asociado a una fisiología o morfología patológicas de órgano o tejido de la reivindicación 1, que comprende además el uso de un fármaco inmunodepresor, promovándose así el injerto de dicho injerto de órgano completo o parcial en dicho sujeto.
4. El injerto de órgano pancreático completo o parcial según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un trastorno pancreático asociado a una fisiología o morfología patológicas de órgano o tejido de la reivindicación 3, en donde dicho fármaco inmunodepresor es capaz de bloquear la unión de un co-receptor de linfocitos con un ligando de dicho co-receptor de linfocitos.
5. El injerto de órgano pancreático completo o parcial según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un trastorno pancreático asociado a una fisiología o morfología patológicas de órgano o tejido de la reivindicación 4, en donde dicho fármaco inmunodepresor es CTLA4-Ig.
6. El injerto de órgano pancreático completo o parcial según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un trastorno pancreático asociado a una fisiología o morfología patológicas de órgano o tejido de la reivindicación 1, en donde dicho co-receptor de linfocitos o ligando de co-receptor de linfocitos está seleccionado del grupo que consiste en B7-1, CD40 y CD40L.
7. El injerto de órgano pancreático completo o parcial según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un trastorno pancreático asociado a una fisiología o morfología patológicas de órgano o tejido de la reivindicación 1, en donde dicha selección de dicho injerto de órgano completo o parcial se efectúa mediante análisis por RT-PCR de dicho órgano completo o parcial.
8. El injerto de órgano pancreático completo o parcial según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un trastorno pancreático asociado a una fisiología o morfología patológicas de órgano o tejido de la reivindicación 1, en donde dicho trastorno pancreático es diabetes.
9. El injerto de órgano pancreático completo o parcial según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un trastorno pancreático asociado a una fisiología o morfología patológicas de órgano o tejido de la reivindicación 1, en donde dicho injerto de órgano completo o parcial es un injerto de islotes pancreáticos.
10. El injerto de órgano pancreático completo o parcial según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un trastorno pancreático asociado a una fisiología o morfología patológicas de órgano o tejido de la reivindicación 1, en donde dicho injerto de órgano completo o parcial porcino está seleccionado a una edad específica de diferenciación correspondiente a 42 días de gestación.
11. El injerto de órgano pancreático completo o parcial según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un trastorno pancreático asociado a una fisiología o morfología patológicas de órgano o tejido de la reivindicación 1, en donde dicho injerto se implanta en la hipodermis.
12. El injerto de órgano pancreático completo o parcial según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un trastorno pancreático asociado a una fisiología o morfología patológicas de órgano o tejido de la reivindicación 1, en donde dicho injerto se implanta en una localización anatómica de dicho sujeto seleccionada del grupo que consiste en la vena porta, el hígado, el páncreas, la cápsula renal, la grasa testicular, la hipodermis y el espacio intraabdominal.
13. El injerto de órgano pancreático completo o parcial según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un trastorno pancreático asociado a una fisiología o morfología patológicas de órgano o tejido de la reivindicación 1, en donde cuando se trasplanta dicho injerto, se extirpa el órgano o el tejido que muestran fisiología o morfología patológicas.

14. El injerto de órgano pancreático completo o parcial según la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de un trastorno pancreático asociado a una fisiología o morfología patológicas de órgano o tejido de la reivindicación 1, en donde dicho injerto de órgano pancreático completo o parcial es un injerto de islotes pancreáticos.



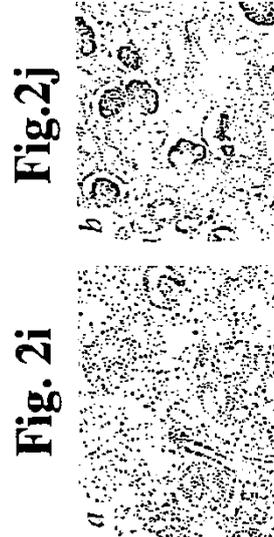
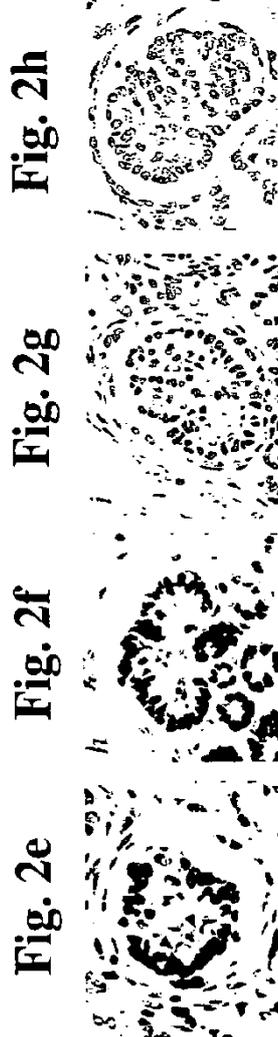
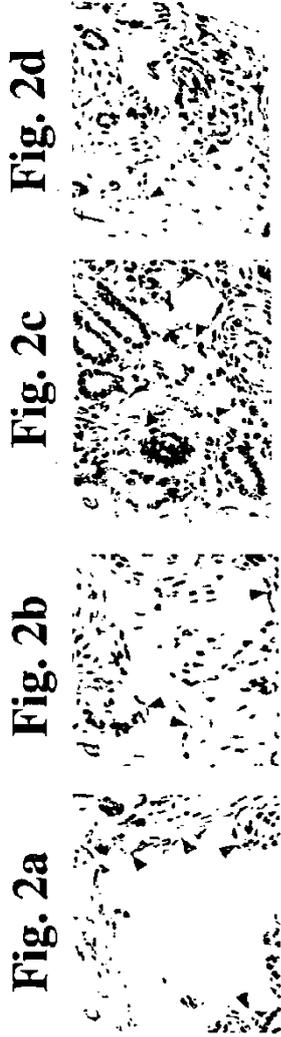


Fig. 3a

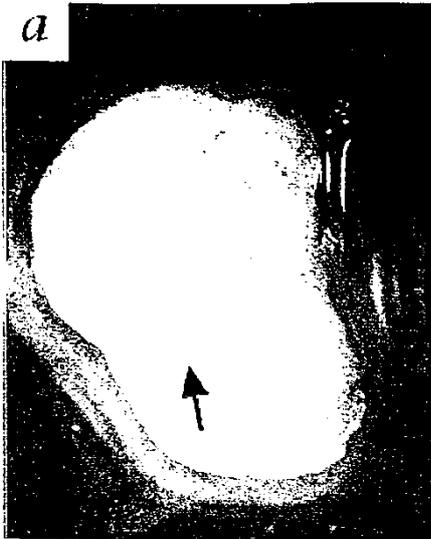


Fig. 3b



Fig. 4b

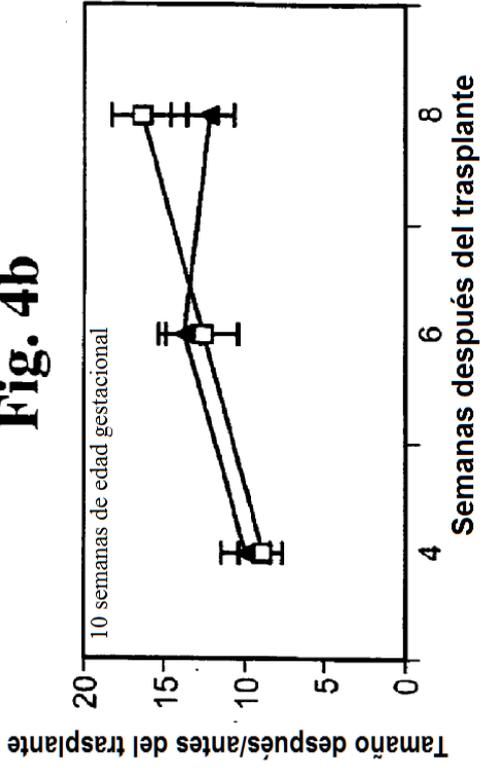


Fig. 4d

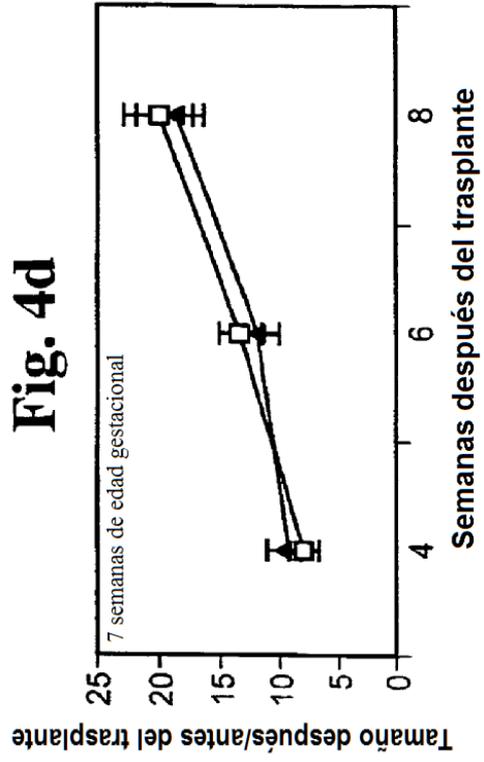


Fig. 4a

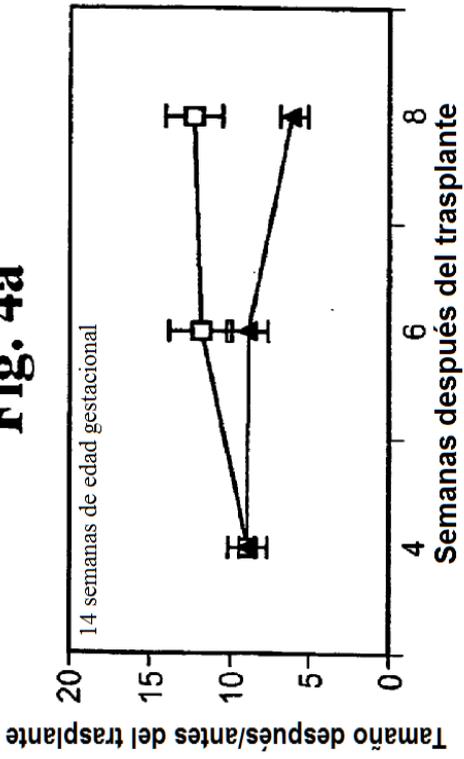


Fig. 4c

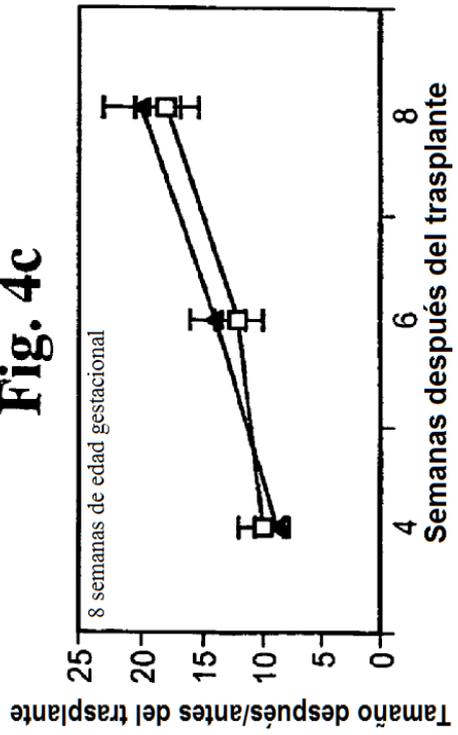


Fig. 4e



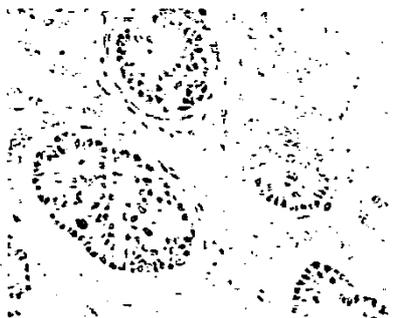
Fig. 4f



Fig. 4g



Fig. 4h



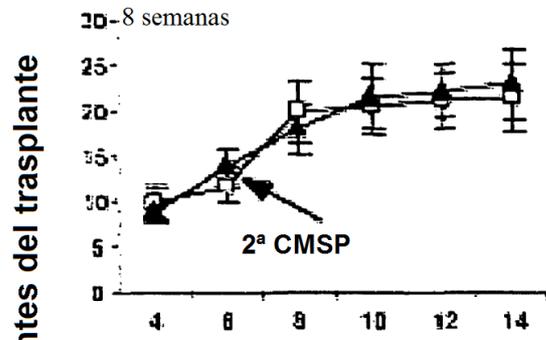


Fig. 5a

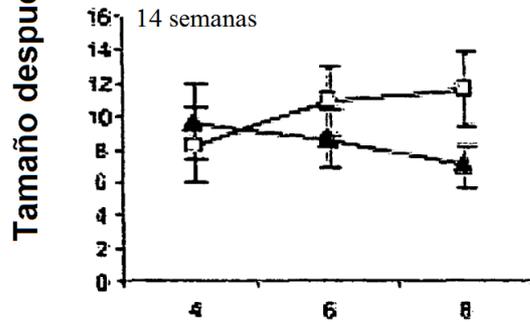


Fig. 5b

Semanas después del trasplante

Fig. 6a

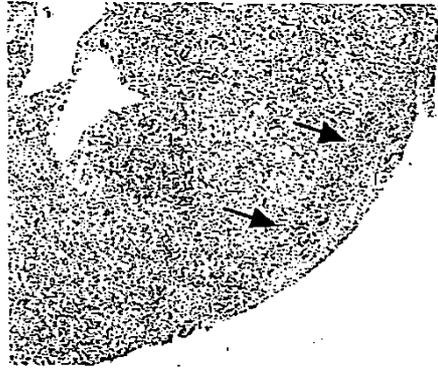


Fig. 6b

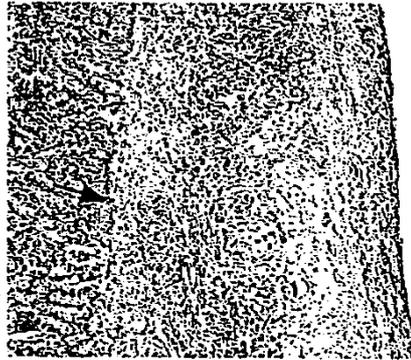
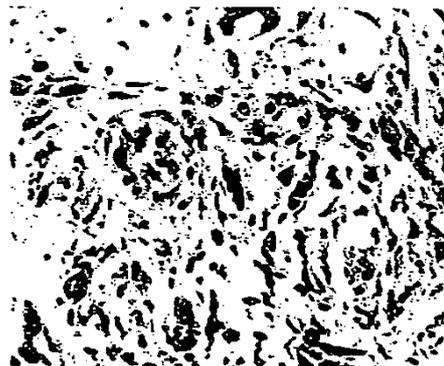


Fig. 6c



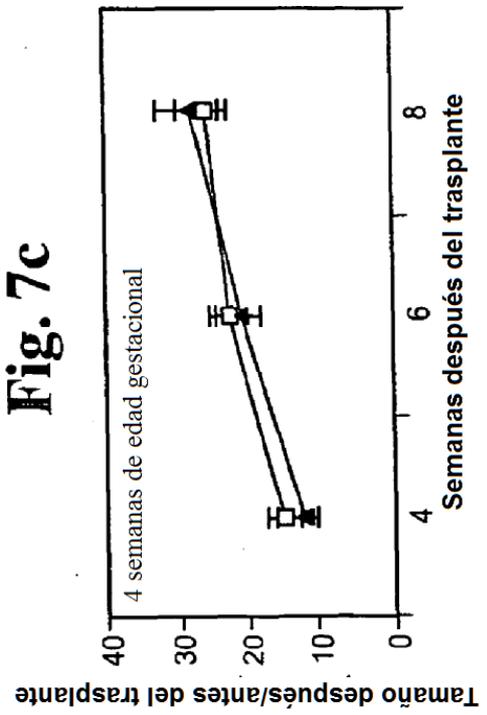
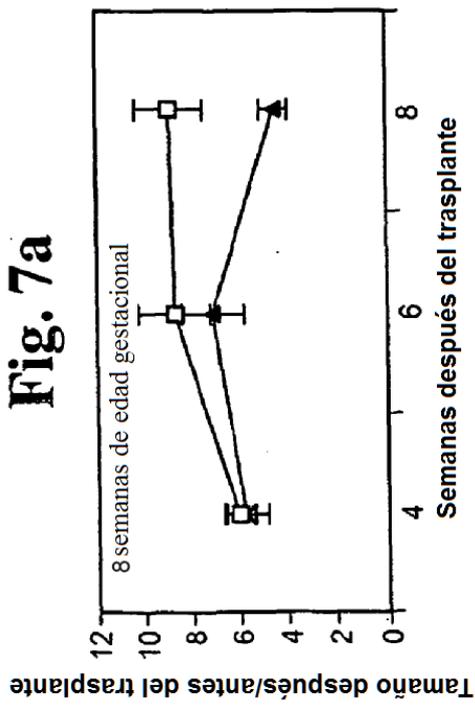
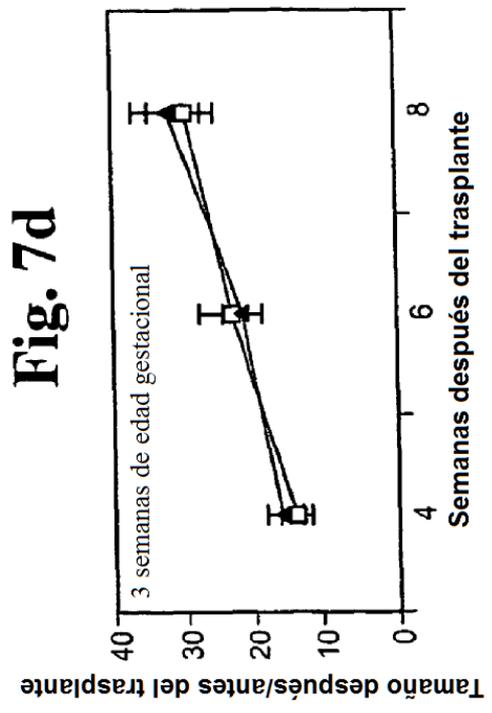
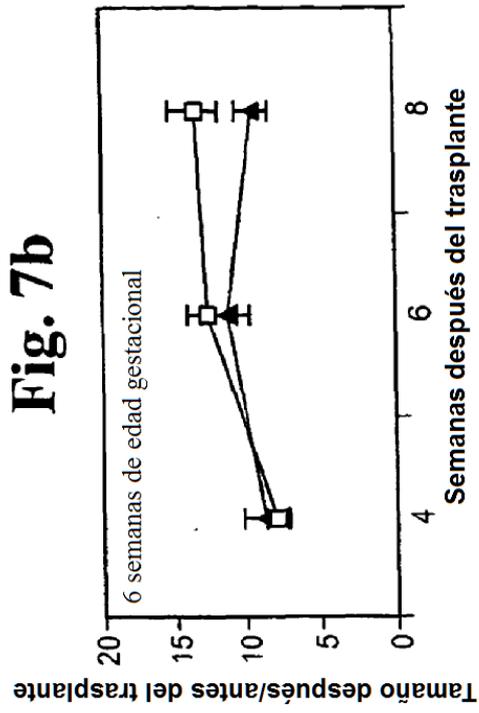


Fig. 8a



Fig. 8b

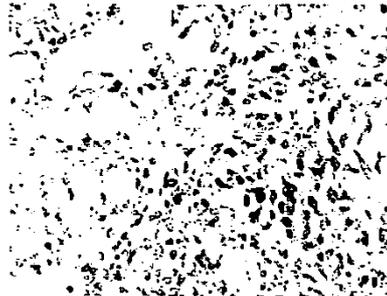


Fig. 8c

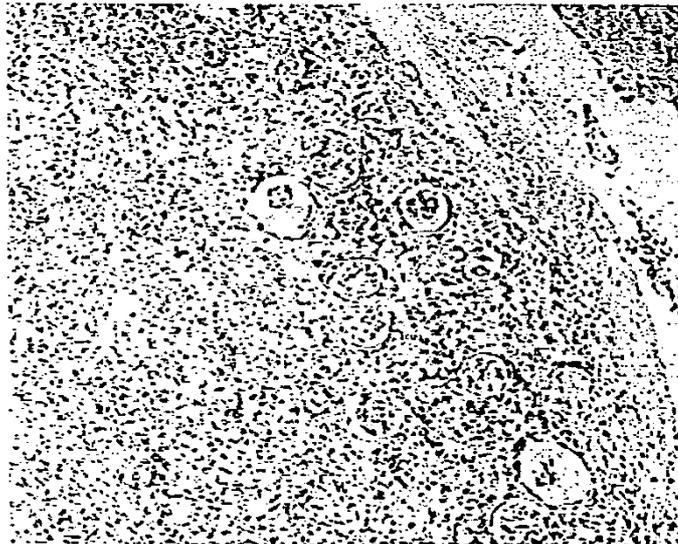


Fig. 9a



Fig. 9b

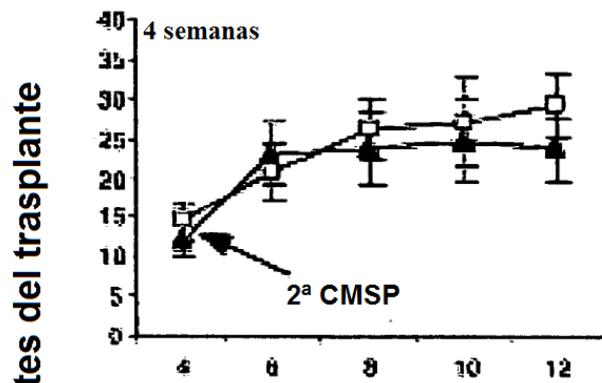


Fig. 10a

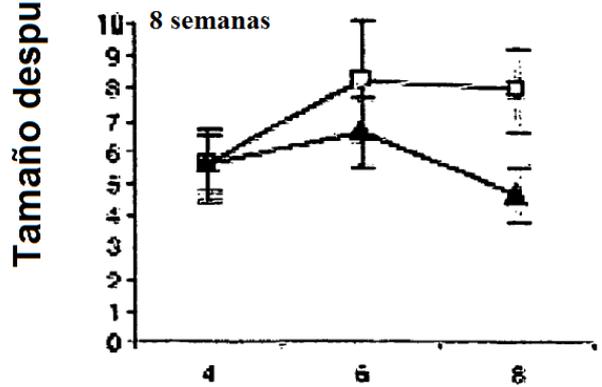


Fig. 10b

Semanas después del trasplante

Fig. 11a

Fig. 11b

Fig. 11c

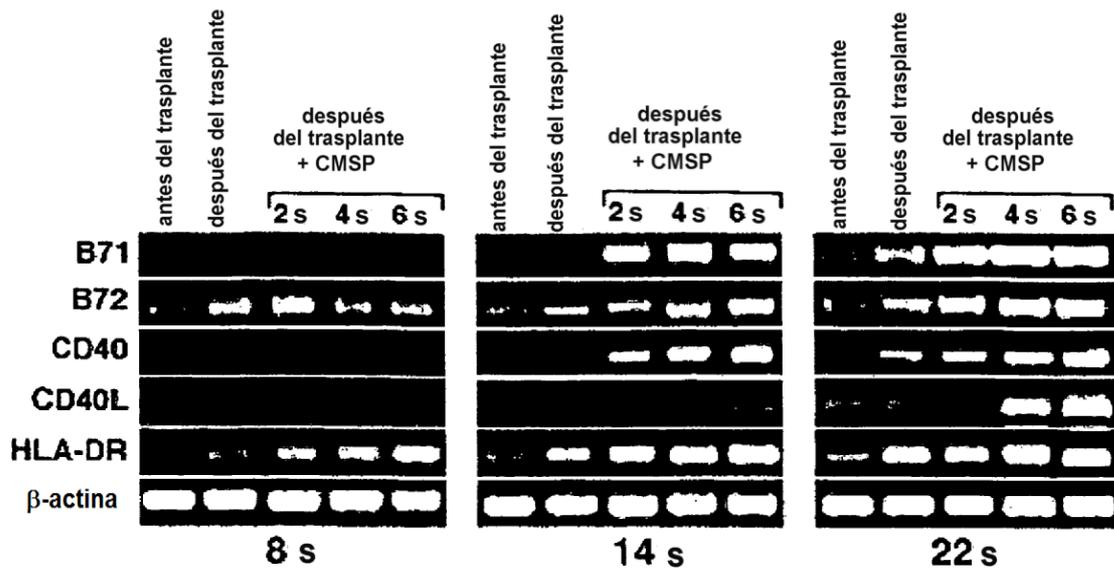


Fig. 12a

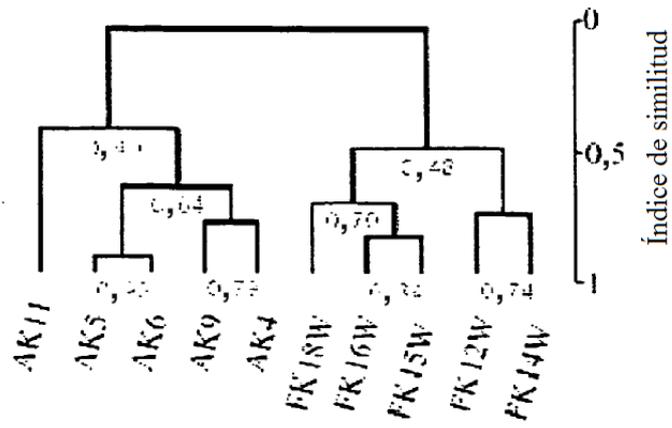


Fig. 12b



Fig. 12c

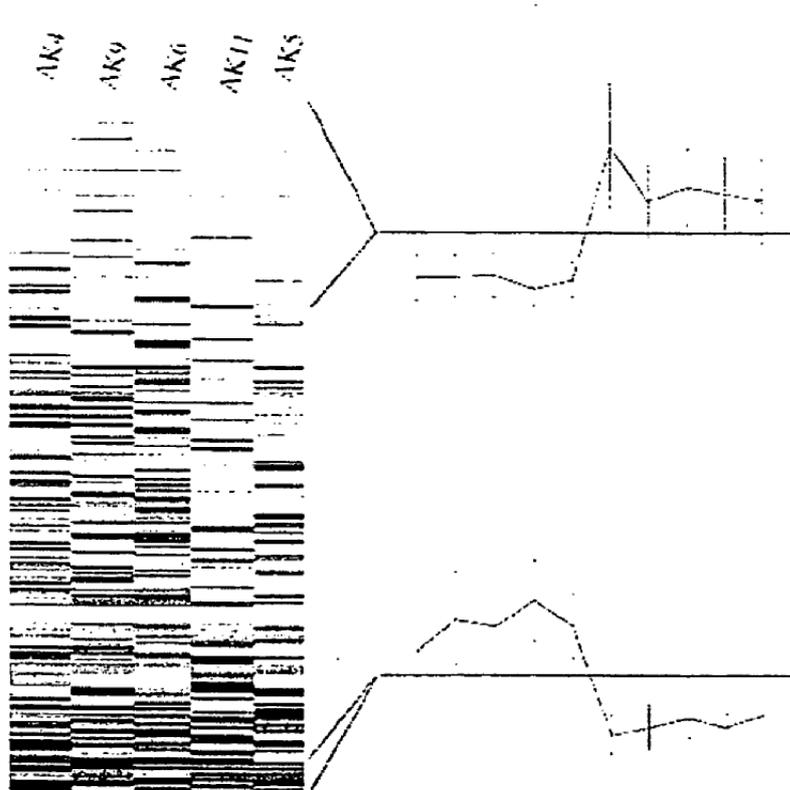


Fig. 13



Fig. 14a

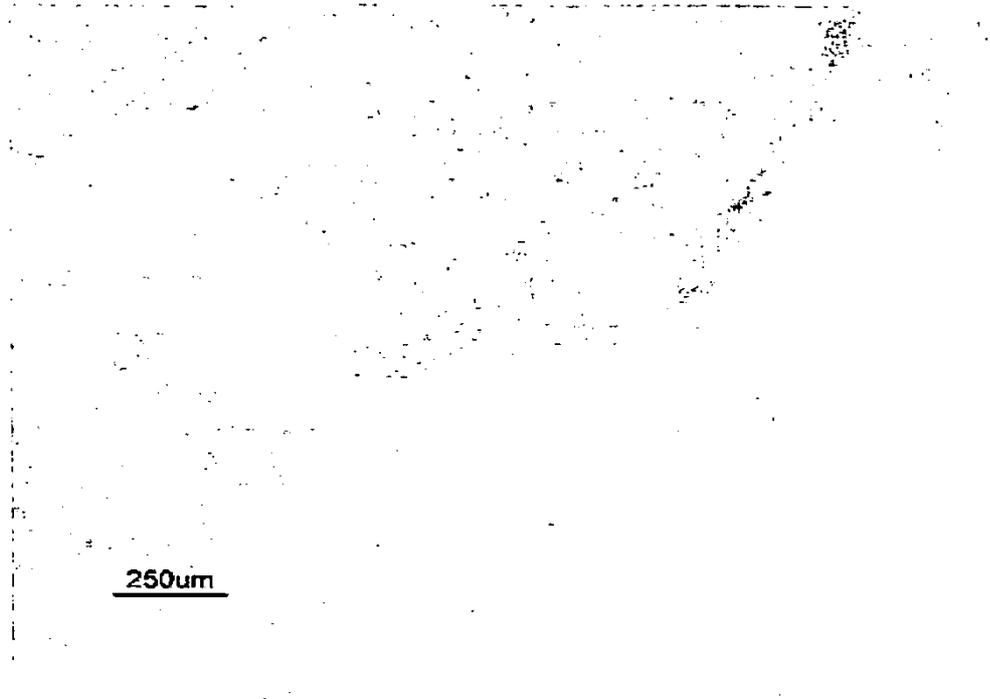


Fig. 14b

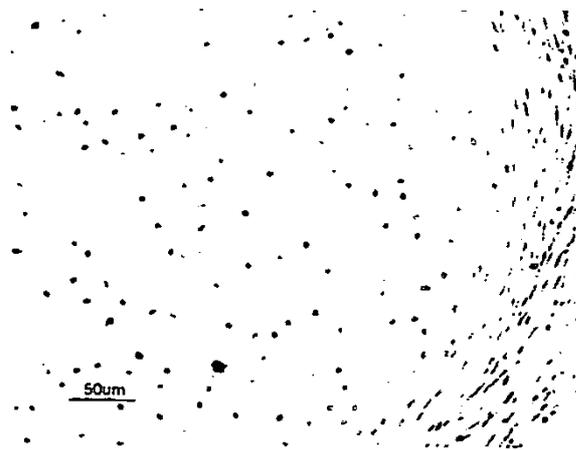


Fig. 15b



Fig. 15d



Fig. 15a



Fig. 15c



Fig. 16a

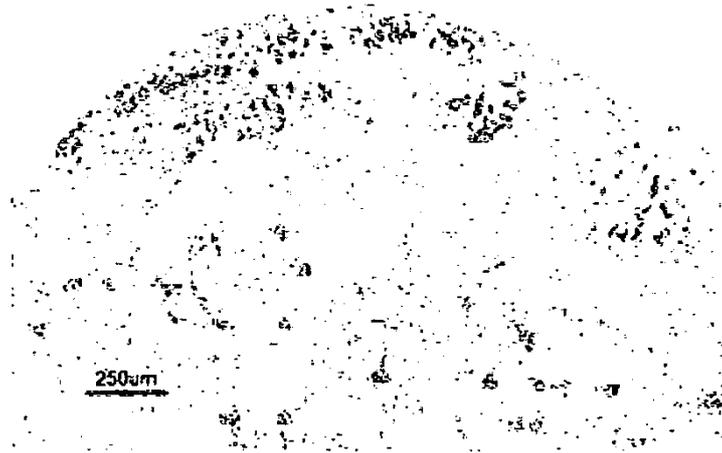


Fig. 16b



Fig. 17a

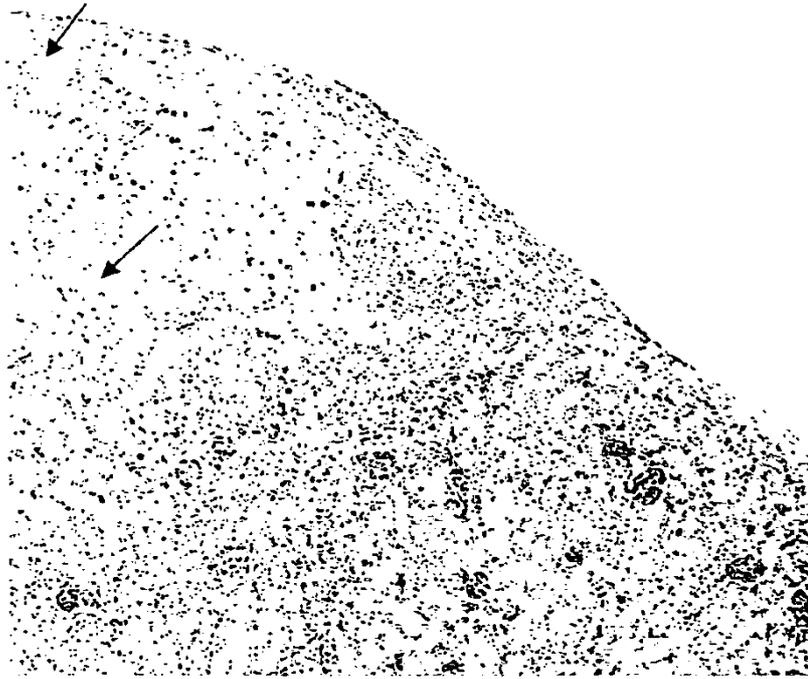


Fig. 17b

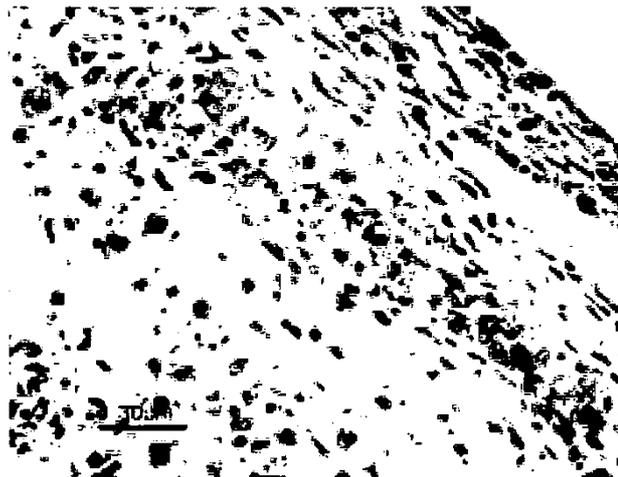


Fig. 18a



Fig. 18b

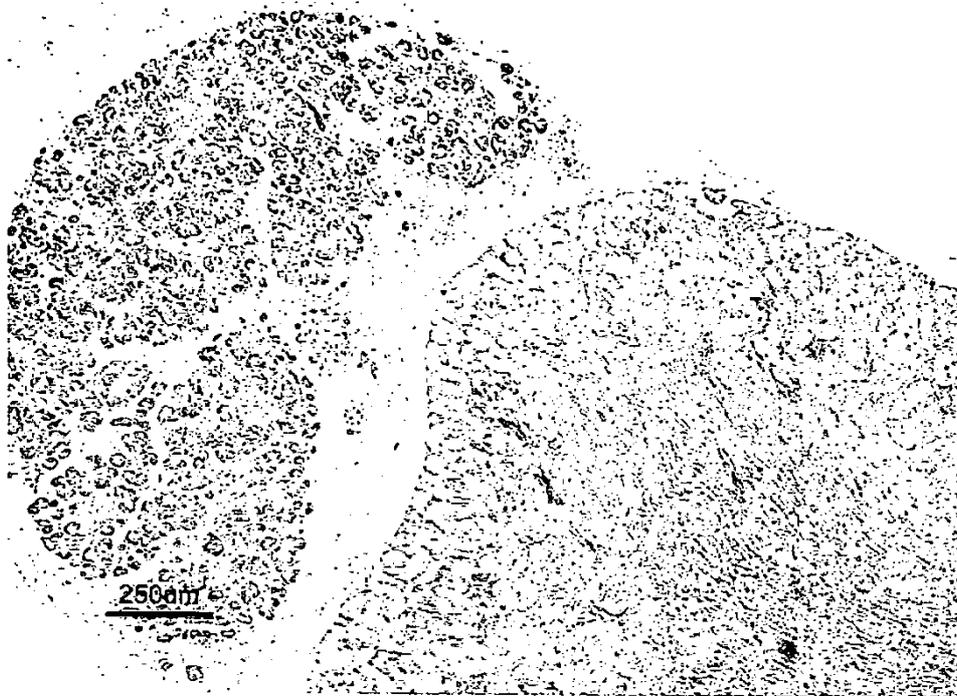


Fig. 18c

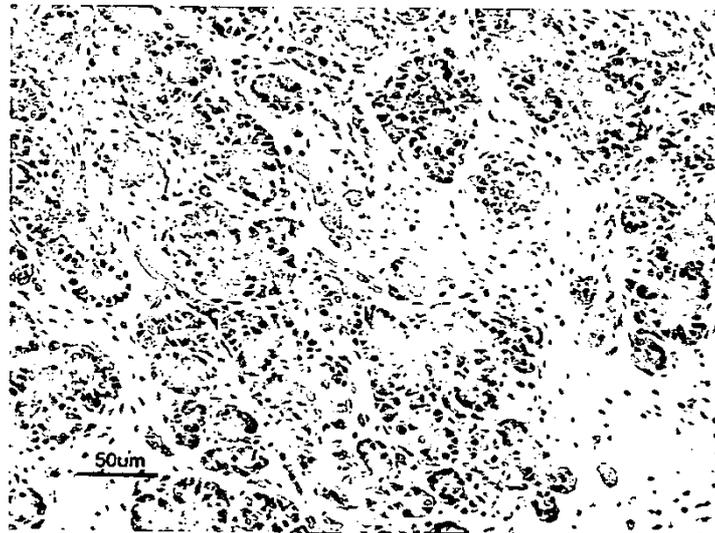


Fig. 19a



Fig. 19b



Fig. 19c



Fig. 20b

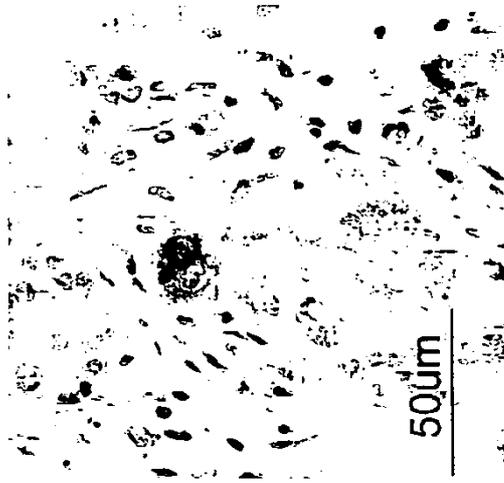


Fig. 20a

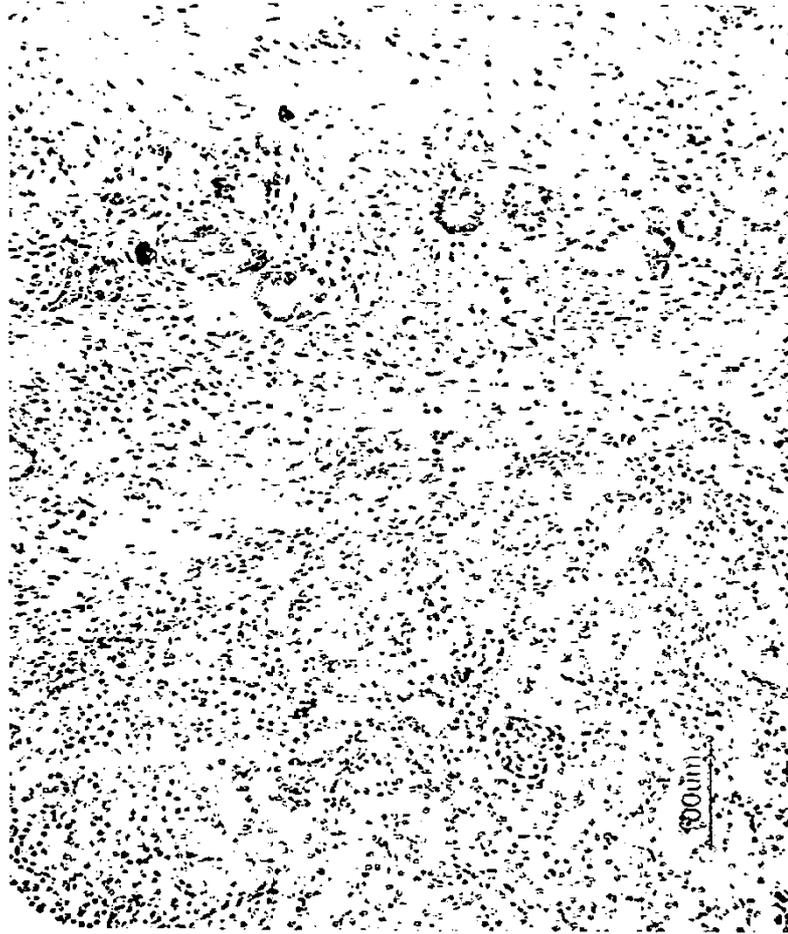


Fig. 20c

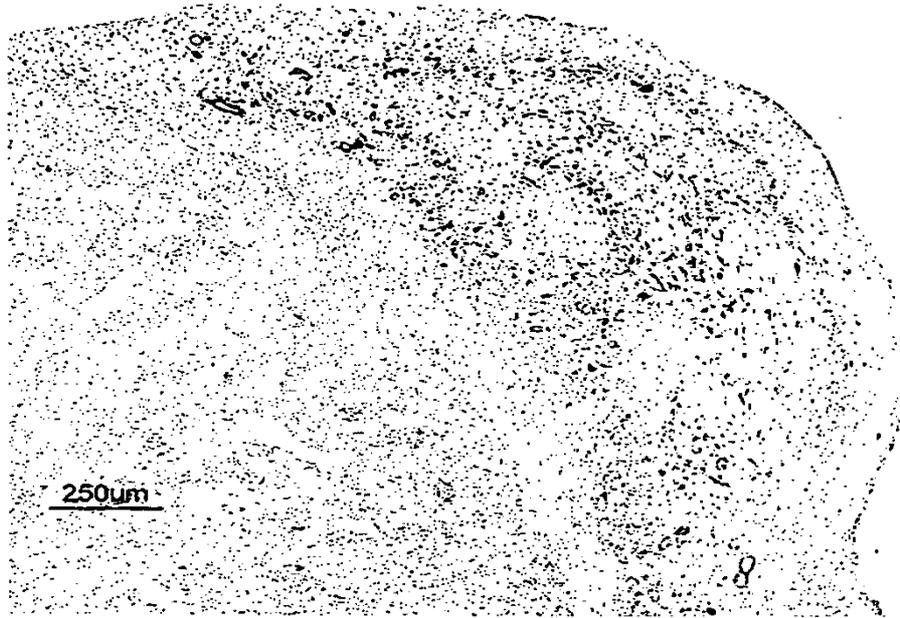


Fig. 20d



Fig. 21a

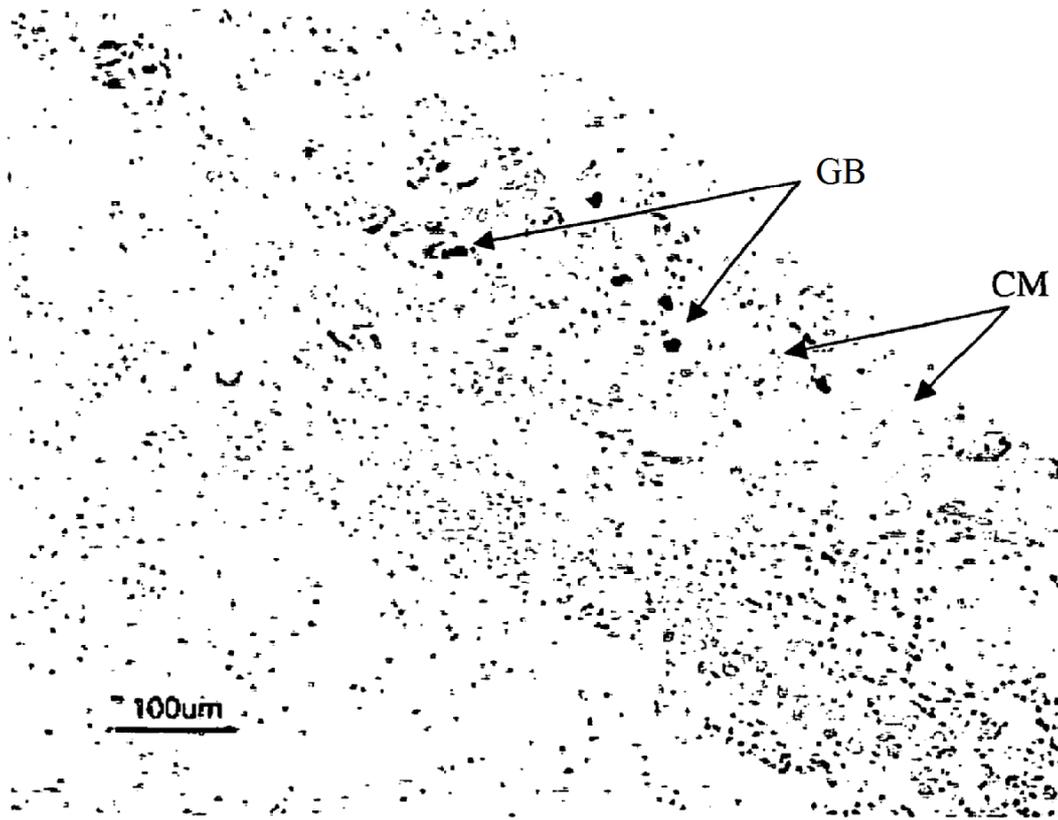


Fig. 21b



Fig. 21c

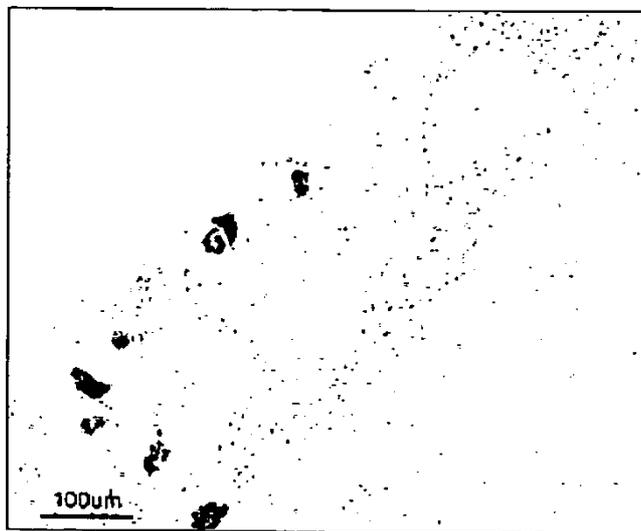


Fig. 22

