

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 507 093**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/436** (2006.01)  
**C12N 5/07** (2010.01)  
**A61F 2/02** (2006.01)  
**A61K 35/39** (2006.01)  
**A61K 35/28** (2006.01)  
**A61K 35/42** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2005 E 05796118 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.07.2014 EP 1809734**

54 Título: **Tratamiento de enfermedad mediante trasplante de injertos no singénicos en desarrollo**

30 Prioridad:

**04.10.2004 US 614968 P**  
**28.11.2004 IL 16542504**

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

**14.10.2014**

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO., LTD. (100.0%)**  
**At the Weizmann Institute of Science, P.O. Box 95 7610002 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**REISNER, YAIR;**  
**DEKEL, BENJAMIN;**  
**EVENTOV-FRIEDMAN, SMADAR;**  
**KATCHMAN, HELENA;**  
**SHEZEN, ELIAS;**  
**ARONOVICH, ANNA y**  
**TCHORSH, DALIT**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 507 093 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**

Tratamiento de enfermedad mediante trasplante de injertos no singénicos en desarrollo

5 La presente invención se refiere al uso de un injerto de tejido/órgano vascularizado pancreático de mamífero no humano para la fabricación de un medicamento de acuerdo con la reivindicación 1.

10 La presente divulgación se refiere a métodos para proporcionar funciones específicas de tejido/órgano a un sujeto mediante el trasplante de órganos en desarrollo. Más particularmente, la presente divulgación se refiere a métodos para tratar enfermedades pancreáticas, hematológicas/metabólicas y pulmonares en mamíferos mediante trasplante de órganos/tejidos xenogénicos/allogénicos porcinos/humanos pancreáticos, linfoides/hematopoyéticos o pulmonares en desarrollo, respectivamente.

15 Las enfermedades pancreáticas tales como diabetes, enfermedades hematológicas/metabólicas tales como hemofilia A y enfermedad de Gaucher, y enfermedades pulmonares tales como insuficiencia pulmonar son enfermedades de gran impacto médico y económico para las que no están disponibles tratamientos satisfactorios/óptimos.

20 La diabetes es una enfermedad debilitante y potencialmente letal que se desarrolla en casi el 5 por ciento de la población mundial. Solamente en los Estados Unidos, se estima que 18 millones de personas tienen diabetes mellitus, y cada año se diagnostica la enfermedad a aproximadamente 1 millón de americanos de 20 años de edad o mayores. Es la sexta causa principal de muerte en los Estados Unidos y es responsable de más de 200.000 muertes al año. Las personas con diabetes tienen una escasez de insulina o una capacidad reducida para usar la insulina, la hormona que regula los niveles de glucosa en sangre. En los mamíferos el páncreas es responsable de la producción y secreción de insulina. La terapia convencional para diabetes, inyecciones diarias de insulina, no evita satisfactoriamente las consecuencias debilitantes y letales de esta enfermedad.

30 La insuficiencia pulmonar es una afección altamente debilitante y potencialmente letal que puede surgir de numerosos tipos de enfermedades, incluyendo fibrosis quística, enfisema, fibrosis pulmonar o hipertensión pulmonar. Aunque puede emplearse el trasplante de pulmón como un último recurso para tratar dichas enfermedades, hay un suministro insuficiente de órganos de donantes, muriendo un cuarto de los candidatos en la lista de espera y estando el límite para la inscripción con frecuencia establecido a los 60 años de edad. La mortalidad postoperatoria a los dos meses es de aproximadamente el 15 por ciento y está relacionada con disfunción del injerto, infección, complicaciones bronquiales. La supervivencia a los cinco años aún es solamente de aproximadamente el 50 por ciento.

40 El defecto genético que provoca la hemofilia A afecta a aproximadamente uno de cada 10.000 hombres. Debido a la deficiencia de coagulación resultante, las personas aquejadas con la enfermedad padecen episodios de sangrado grave debido a pequeñas lesiones, sangrado interno y hemorragia de las articulaciones, lo que conduce a artropatía, la causa principal de morbilidad en la hemofilia. Los niveles normales de factor VIII promedian entre 50 y 200 ng/ml de plasma sanguíneo (Mannucci, P. M. en Practical Laboratory Hematology, ed. Koepke, J. A., Churchill Livingstone, N. Y., pp: 347-371, 1990); sin embargo, los pacientes que padecen hemofilia A de leve a moderada normalmente tienen niveles en plasma por debajo de 2-60 ng/ml, mientras que los niveles por debajo de aproximadamente 2 ng/ml dan como resultado hemofilia grave.

45 El tratamiento de enfermedades hematológicas/metabólicas tales como hemofilia A y enfermedad de Gaucher se efectúa generalmente mediante terapia de reemplazo enzimático. Sin embargo, la terapia de reemplazo enzimático tiene numerosas desventajas significativas, incluyendo la necesidad de administrar la enzima de reemplazo mediante inyección, un proceso doloroso, inconveniente y caro. La administración de dosis discontinuas de una enzima de reemplazo además no consigue alcanzar los niveles fisiológicos ajustados continuamente de la enzima de acuerdo con las necesidades fisiológicas, como se conseguirían por una población de células productoras de enzimas normales. Por lo tanto, la terapia de reemplazo enzimático de enfermedades hematológicas/metabólicas no consigue en muchos casos alcanzar un tratamiento de enfermedad satisfactorio/óptimo.

55 El trasplante de injertos pancreáticos o pulmonares completamente diferenciados de haplotipo coincidente de donantes de estadio postgestacional es un procedimiento médico, que salva vidas, elegido para reemplazar órganos lesionados o enfermos tales como páncreas o pulmón. Dicha modalidad de tratamiento, sin embargo, padece desventajas considerables. El trasplante allogénico de órganos/tejidos pancreáticos o pulmonares diferenciados es imposible de implementar en una gran cantidad de casos debido a la ausencia de disponibilidad de donantes de trasplante inmunológicamente coincidentes adecuados. Además, el uso de donantes humanos para proporcionar órganos/tejidos para trasplante con frecuencia presenta riesgos para la salud y dilemas éticos. Por lo tanto, un gran número de pacientes que se beneficiarían de otro modo del trasplante terapéutico sucumbe a enfermedades asociadas con la insuficiencia pancreática o pulmonar mientras esperan donantes de trasplante coincidentes. Además, incluso cuando se encuentran donantes de trasplante de haplotipo coincidente adecuado, generalmente se requieren tratamientos inmunosupresores permanentes y perjudiciales, tales como la administración diaria de ciclosporina A para evitar el rechazo del injerto. El uso de fármacos tales como ciclosporina A puede no ser deseable

pero el beneficio de un trasplante que salve una vida compensa el riesgo de tratamiento inmunosupresor. La terapia inmunosupresora no obstante es altamente indeseable debido a que esta provoca efectos secundarios graves tales como carcinogenicidad, nefrotoxicidad y susceptibilidad aumentada a infecciones oportunistas. Los tratamientos inmunosupresores contribuyen a las desventajas del trasplante alogénico ya que estos con frecuencia no tiene éxito en la prevención del rechazo a corto plazo, y son generalmente incapaces de evitar el rechazo a largo plazo. El rechazo agudo de injertos trasplantados es con frecuencia letal.

Un trasplante alternativo al aloinjerto implica el trasplante de xenoinjerto, es decir, trasplante de injertos derivados de animales, en particular injertos porcinos, que están bien establecidos como una alternativa animal potencial a los injertos humanos. Las grandes ventajas de usar xenoinjertos para el trasplante son su disponibilidad a petición para todos los pacientes que necesiten trasplante, así como evitar la carga médica y ética de recolectar injertos de donantes humanos vivos o muertos. Sin embargo, hasta la fecha, los injertos de órgano/tejido xenogénicos se han descartado para el trasplante humano debido a su incompatibilidad inmunológica hasta la fecha insalvable con receptores humanos.

Una estrategia potencialmente eficaz para tratar enfermedades resultantes de o asociadas con la actividad anómala de al menos una biomolécula (por ejemplo, enfermedades monogénicas, hematológicas, metabólicas) tales como la hemofilia A y enfermedad de Gaucher implicaría el trasplante de donante no singénico de órganos/tejidos linfoides, tales como el bazo, que son potencialmente capaces de generar niveles terapéuticos de diferentes productos génicos tales como factor VIII o glucocerebrosidasa que son respectivamente deficientes en dichas enfermedades. Como se ha descrito anteriormente, sin embargo, el estado de la técnica del trasplante terapéutico generalmente sigue estando asociado con desventajas críticas.

Por lo tanto, a la vista de los beneficios curativos potenciales únicos de la terapia de trasplante, hay claramente una necesidad urgente y duradera de órganos/tejidos no singénicos pancreáticos, pulmonares y linfoides/hematopoyéticos derivados de donantes que puedan obtenerse en cantidades suficientes, y que se toleren de forma óptima inmunológicamente, para hacer factible el trasplante terapéutico rutinario y óptimamente eficaz de dichos órganos/tejidos.

Una estrategia que se ha propuesto para conseguir este objetivo implica el uso de injertos de estadio gestacional para el trasplante. Dicho enfoque es prometedor ya que se ha mostrado que la tolerancia inmunológica a injertos derivados del tejido de estadio gestacional es mejor que a los injertos derivados de tejidos del estadio adulto (Dekel B. *et al.*, 1997. *Transplantation* 64, 1550; Dekel B. *et al.*, 1997. *Transplantation* 64, 1541; Dekel B. *et al.*, 1999. *Int Immunol.* 11, 1673; Hammerman MR., 2000. *Pediatr Nephrol.* 14, 513). Además, el crecimiento potenciado y el potencial de diferenciación de los injertos de estadio gestacional en relación con injertos diferenciados es altamente deseable para generar injertos integrados en el hospedador, óptimamente funcionales. Por ejemplo, las células de islotes pancreáticos fetales, tales como células beta productoras de insulina, presentan crecimiento y diferenciación celular potenciados en relación con células beta de islotes diferenciados.

El potencial de injertos de estadio gestacional porcinos renales (Dekel B. *et al.*, 2003. *Nat Med* 9: 53-60; Hammerman MR., 2004. *Am J Transplant.* 4 Supl 6: 14-24), pancreáticos (Korsgren O. *et al.*, 1991. *Diabetologia* 34: 379-86; Beattie GM. *et al.*, 1997. *Diabetes* 46: 244-8; Fox A. *et al.*, 2002. *Xenotransplantation* 9: 382-92; Korbitt GS. *et al.*, 1996. *The Journal of Clinical Investigation* 97: 2119-29; Amaratunga A. *et al.*, 2003. *Xenotransplantation* 10: 622-7), hepáticos (Kokudo N. *et al.*, 1996. *Cell Transplantation* 5: S21-2; Takebe K. *et al.*, 1996. *Cell Transplant* 5: S31-3), neuronales (Larsson LC. *et al.*, 2001. *Exp Neurol* 172: 100-14; Larsson LC. *et al.*, 2003. *Transplantation* 75: 1448-54; Armstrong RJ. *et al.*, 2002. *Exp Neurol* 175: 98-111) para generar órganos/tejidos funcionales después del trasplante en hospedadores no singénicos se ha descrito exhaustivamente. El potencial de injertos de estadio gestacional humanos pulmonares (Angioi K. *et al.*, 2002. *The Journal of Surgical Research* 102: 85-94), cardíacos o intestinales (Angioi K. *et al.*, 2002. *The Journal of Surgical Research* 102: 85-94; Lim FY. *et al.*, 2003. *Journal of Pediatric Surgery* 38: 834-9) para generar órganos/tejidos que tienen función específica de órgano después del trasplante en hospedadores no singénicos también se ha demostrado.

Por lo tanto, se han descrito diversos enfoques en la técnica anterior para el uso de injertos de órganos/tejidos pancreáticos en desarrollo para su trasplante terapéutico.

Por ejemplo, se ha mostrado que los islotes fetales humanos incluyendo las células secretoras de insulina más tempranas, trasplantados en ratones desnudos y ratas presentan crecimiento y desarrollo continuado, incluyendo producción de las otras hormonas pancreáticas: glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático (Usadel *et al.*, 1980. *Diabetes* 29 Supl 1: 74-9). De forma similar, se ha mostrado que los injertos derivados de páncreas embrionario humano trasplantados a ratones NOD/SCID, han generado células beta humanas productoras de insulina derivadas de injertos (Castaing M. *et al.*, 2001. *Diabetologia* 44: 2066). Los trasplantes de islotes porcinos de estadio gestacional en ratones pueden presentar un programa de diferenciación similar, con temporalización similar, a los tejidos no trasplantados normales.

Otros ejemplos incluyen el trasplante de células de islotes de estadio gestacional en ratones desnudos (Korsgren O. *et al.*, 1991. *Diabetologia* 34: 379-86; Otonkoski T. *et al.*, 1999. *Transplantation* 68, 1674), de páncreas fetal en

5 ratones inmunodeficientes (Fox A. *et al.*, 2002. Xenotransplantation 9: 382-92; Amaratunga A. *et al.*, 2003. Xenotransplantation 10: 622-7), de islotes fetales humanos en ratones desnudos y ratas (Beattie GM. *et al.*, 1997. Diabetes 46: 244-8); y de tejido de islotes fetales porcinos en ratones desnudos (Korbutt GS. *et al.*, 1996. J Clin Invest. 97: 2119-29). Otro enfoque implica el trasplante de grupos de células de tipo islote porcino fetal en monos cynomolgus (Soderlund J. *et al.*, 1999. Transplantation 67: 784-91). Otro enfoque más implica el trasplante intratesticular de islotes porcinos neonatales en sabuesos no inmunosuprimidos (Gores PF. *et al.*, 2003. Transplantation 75: 613-8).

10 Adicionalmente, se han realizado intentos de trasplantar tejidos pancreáticos fetales porcinos a receptores humanos diabéticos (Groth CG. *et al.*, 1998. Transplantation Proceedings 30: 3809-10; Groth CG. *et al.*, 1999. J Mol Med. 77, 153; Reinholt FP. *et al.*, 1998. Xenotransplantation 5: 222-5; Korsgren O. *et al.*, 1992. Transplantation Proceedings 24:352-3; Groth CG. *et al.*, 1994. Lancet 344: 1402-4).

15 El documento US 2003/0198628 de Hammerman desvela un método para el trasplante de páncreas que comprende implantar en un hospedador un páncreas embrionario. En una realización el páncreas se recoge de un embrión porcino de aproximadamente el día E20 a aproximadamente el día E38, siendo el día de recogida más preferido aproximadamente el día E29.

20 Las Solicitudes de Patente de Estados Unidos N° 20040082064 y 20040136972 para algunos de los inventores de la presente solicitud sugieren el tratamiento de enfermedad pancreática en seres humanos mediante el trasplante de injertos de órgano/tejido pancreático porcino en un estadio del desarrollo de 20-28 días de gestación, y enseñan que 27-28 días de gestación es el estadio gestacional óptimo de cualquier tipo de injerto de órgano/tejido porcino para el trasplante terapéutico.

25 Se han descrito diversos enfoques de la técnica anterior en la técnica anterior para el uso de injertos de órgano/tejido pulmonar en desarrollo para trasplante terapéutico.

30 En un enfoque, se trasplantaron injertos pulmonares humanos en un estadio gestacional de 6-10 semanas en ratones inmunodeficientes (Angioi K. *et al.*, 2002. The Journal of Surgical Research 102: 85-94).

En otro enfoque, se trasplantaron fragmentos de pulmón de fetos humanos a las 10 a 14 semanas de gestación en ratones inmunodeficientes (Groscurth P, Tondury G., 1982. Anat Embryol (Berl). 165: 291-302).

35 Con respecto al trasplante de injertos de órganos/tejidos linfoides/hematopoyéticos, la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20040136972 para algunos de los inventores de la presente solicitud afirma que todos los tipos de injertos de órganos/tejidos porcinos en un estadio del desarrollo de 27-28 días, específicamente incluyendo injertos de órganos/tejidos esplénicos, son óptimos para el trasplante terapéutico.

40 Sin embargo, todos los enfoques anteriores que implicaban trasplante de órganos/tejidos pancreáticos, pulmonares o linfoides/hematopoyéticos no singénicos en desarrollo padecen algunos de o todos los siguientes inconvenientes:

- (i) tolerancia subóptima por linfocitos hospedadores no singénicos;
- (ii) diferenciación de injerto estructural y funcional subóptima, por ejemplo con respecto a producción de insulina por injertos de órganos/tejidos pancreáticos;
- 45 (iii) vascularización del injerto predominantemente derivada del injerto, a diferencia de derivada del hospedador, conduciendo de este modo a rechazo inmunitario;
- (iv) crecimiento subóptimo;
- (v) disponibilidad inadecuada de órganos/tejidos trasplantables; y/o
- 50 (vi) seguridad subóptima para administración humana, notablemente con respecto a evitar la generación de teratomas derivados de injerto.

55 Los enfoques anteriores que emplean injertos no singénicos en desarrollo han sido uniformemente subóptimos ya que el tiempo de gestación óptimo para implantación basado en el riesgo de teratoma, potencial de crecimiento e inmunogenicidad, todos los cuales podrían variar entre diferentes órganos en el desarrollo fetal, no estaban suficientemente caracterizados.

60 Existe por lo tanto una necesidad ampliamente reconocida de, y sería ampliamente ventajoso tener, un método para tratar enfermedades humanas susceptibles de trasplante terapéutico por trasplante de órganos/tejidos pancreáticos no singénicos en desarrollo, desprovistos de las limitaciones anteriores.

65 EVENTOV-Friedman Smadar *et al.* se refieren a un hígado, páncreas y pulmón de cerdo embrionario como una fuente de trasplante: la organogénesis óptima sin teratoma depende de ventanas temporales distintas, "Proceedings of the national academy of sciences of USA, national academy of science, Washington DC, Estados Unidos, vol. 102, n° 8, 22 de febrero de 2005, p.2928-2933".

EVENTOV-Friedman Smadar *et al.* se refieren a un trasplante de tejido pancreático de cerdo embrionario para el

tratamiento de diabetes "Plos medicine 2006 US, vol. 3, nº 7, 2006, páginas 1165-1177".

5 El documento US 5961972 desvela un método para promover la proliferación de células pancreáticas porcinas embrionarias de una edad gestacional de menos de 35 días, que comprende poner en contacto las células con un agente proliferador embrionario que promueve la proliferación de las células.

DEKEL Benjamin *et al* se refieren a precursores de riñón tempranos humanos y porcinos como una nueva fuente para trasplante "Nature medicine, nature publishing group, NY, Estados Unidos, vol. 9, nº 1, 1 de enero de 2003".

10 El documento WO 03/022123 se refiere un método para tratar una enfermedad renal en un sujeto, comprendiendo el método trasplantar al sujeto un injerto de tejido nefrítico humano que está en un estadio de diferenciación correspondiente a 4 a 10 semanas de gestación, tratando de este modo la enfermedad renal en el sujeto.

15 TUCH B. E. se refiere a la inversión de diabetes por optimización de páncreas fetal humano de los requisitos en el ratón desnudo hiperglucémico, "Transplantation (Baltimore), vol.51, nº 3, 1991, páginas 557-562".

20 ROGERS S. A. *et al* se refieren a injerto de células de islotes y control de diabetes en ratas después del trasplante de primordio pancreático de cerdo, "American journal of physiology: endocrinology and metabolism, American physiological society, Bethesda, MD, Estados Unidos, vol. 286, nº 4, 1 de abril de 2004, páginas E502-E509".

25 El documento US 5593673 se refiere a células pancreáticas porcinas aisladas para su uso en el tratamiento de enfermedades caracterizadas por actividad de insulina insuficiente.

El uso de un injerto de órgano/tejido vascularizado pancreático de mamífero no humano para la fabricación de un medicamento se define en la reivindicación 1 de la presente invención.

30 La presente divulgación desvela el uso de injertos pancreáticos, linfoides y pulmonares en desarrollo no singénicos para el tratamiento de una enfermedad. Este uso puede efectuarse de diversas maneras como se describe adicionalmente y se ejemplifica posteriormente en el presente documento.

35 La presente divulgación se basa en el descubrimiento inesperado de ventanas de tiempo adecuadas para el trasplante satisfactorio de órganos/tejidos no singénicos en desarrollo pancreáticos, pulmonares o linfoides/hematopoyéticos. Se desvela en el presente documento por primera vez que injertos de órganos/tejidos pancreáticos no singénicos, tales como injertos porcinos xenogénicos, en un estadio del desarrollo esencialmente correspondiente al del páncreas porcino en un estadio gestacional de 42 a 56 días de gestación son óptimos para el crecimiento y desarrollo de órganos/tejidos pancreáticos productores de insulina. Se desvela además en el presente documento por primera vez que injertos de órganos/tejidos linfoides/hematopoyéticos, tales como injertos de  
40 órganos/tejidos linfoides/hematopoyéticos porcinos xenogénicos, en un estadio del desarrollo esencialmente correspondiente al del bazo porcino en un estadio gestacional de 42 a 56 días de gestación son óptimos para el crecimiento y desarrollo de órganos/tejidos pancreáticos productores de factor VIII y pueden usarse para tratar la hemofilia A en un mamífero. Se desvela además por la presente por primera vez que injertos pulmonares no  
45 singénicos en un estadio del desarrollo esencialmente correspondiente al de pulmón porcino en un estadio gestacional de 56 a 80 días son óptimos para crecimiento y diferenciación de órganos/tejidos pulmonares que comprende alvéolos.

50 De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación se proporciona un método para proporcionar una función pancreática a un mamífero.

55 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el injerto de órgano/tejido pancreático está en un estadio del desarrollo esencialmente correspondiente al de un órgano/tejido pancreático porcino en un estadio gestacional seleccionado de un intervalo de aproximadamente 42 a aproximadamente 80 días de gestación, generando de este modo un órgano/tejido pancreático funcional para proporcionar la función pancreática al sujeto.

60 De acuerdo con características adicionales en realizaciones preferidas de la divulgación descrita posteriormente, el injerto de órgano/tejido pancreático está en un estadio del desarrollo esencialmente correspondiente al de un órgano/tejido pancreático porcino en un estadio gestacional seleccionado de un intervalo de aproximadamente 42 a aproximadamente 56 días de gestación.

65 De acuerdo con características adicionales en realizaciones preferidas de la divulgación descrita posteriormente, el injerto de órgano/tejido pancreático está en un estadio del desarrollo esencialmente correspondiente al de un órgano/tejido pancreático porcino en un estado estacional de aproximadamente 42 días de gestación.

- De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el injerto de órgano/tejido pancreático no es singénico con el sujeto.
- 5 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el injerto de órgano/tejido pancreático es xenogénico con el sujeto.
- De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el injerto de órgano/tejido pancreático es de origen porcino.
- 10 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el sujeto tiene una actividad anómala de una biomolécula producida de forma natural por el páncreas de mamífero.
- De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el sujeto tiene una actividad anómala de una biomolécula producida de forma natural por un islote pancreático de mamífero.
- 15 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la biomolécula es insulina.
- De acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación se proporciona un método para proporcionar una función pancreática a un sujeto mamífero, comprendiendo el método trasplantar al sujeto un injerto de órgano/tejido pancreático de mamífero, en el que el injerto de órgano/tejido pancreático está en un estadio del desarrollo esencialmente correspondiente al de un órgano/tejido pancreático humano en un estadio gestacional seleccionado de un intervalo de aproximadamente 14 a aproximadamente 20 semanas de gestación, generando de este modo un órgano/tejido pancreático funcional para proporcionar la función pancreática al sujeto.
- 20 De acuerdo con otro aspecto más de la presente divulgación se proporciona un método para generar tejido pulmonar en un sujeto mamífero que lo necesite, comprendiendo el método trasplantar al sujeto un injerto pulmonar de mamífero en desarrollo, en el que el injerto pulmonar está en un estadio del desarrollo esencialmente correspondiente al de un órgano/tejido pulmonar porcino en un estadio gestacional seleccionado de un intervalo de aproximadamente 42 a aproximadamente 80 días de gestación; generando de este modo tejido pulmonar en el sujeto.
- 25 De acuerdo con características adicionales en realizaciones preferidas de la divulgación descrita posteriormente, el injerto pulmonar está en un estadio del desarrollo esencialmente correspondiente al de un órgano/tejido pulmonar porcino en un estadio gestacional seleccionado de un intervalo de aproximadamente 56 a aproximadamente 80 días de gestación.
- 30 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el injerto pulmonar no es singénico con el sujeto.
- 35 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas; el injerto pulmonar es xenogénico con el sujeto.
- De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el injerto de órgano/tejido pulmonar es de origen porcino.
- 40 De acuerdo con otro aspecto más de la presente divulgación se proporciona un método para tratar la hemofilia A en un sujeto mamífero que lo necesite, comprendiendo el método trasplantar al sujeto un injerto de órgano/tejido linfoide/hematopoyético de mamífero en desarrollo, en el que el injerto de órgano/tejido linfoide/hematopoyético está en un estadio del desarrollo esencialmente correspondiente al de un órgano/tejido linfoide/hematopoyético porcino en un estadio gestacional seleccionado de un intervalo de aproximadamente 42 a aproximadamente 80 días de gestación; generando de este modo un órgano/tejido linfoide/hematopoyético funcional para tratar la hemofilia en el sujeto.
- 45 De acuerdo con características adicionales en realizaciones preferidas de la invención descritas posteriormente, la hemofilia es hemofilia A.
- 50 De acuerdo con otro aspecto más de la presente divulgación se proporciona un método para proporcionar una función de órgano/tejido linfoide/hematopoyético a un sujeto humano, comprendiendo el método trasplantar al sujeto un injerto de órgano/tejido linfoide/hematopoyético de mamífero en desarrollo, preferentemente el injerto de órgano/tejido linfoide/hematopoyético está en un estadio del desarrollo esencialmente correspondiente al de un órgano/tejido linfoide/hematopoyético porcino en un estadio gestacional seleccionado de un intervalo de aproximadamente 42 a aproximadamente 80 días de gestación, generando de este modo un órgano/tejido linfoide/hematopoyético funcional para proporcionar la función del órgano/tejido linfoide/hematopoyético al sujeto.
- 55 De acuerdo con características adicionales en realizaciones preferidas de la divulgación descrita posteriormente, el injerto de órgano/tejido linfoide/hematopoyético está en un estadio del desarrollo en el que un órgano/tejido
- 60 De acuerdo con características adicionales en realizaciones preferidas de la divulgación descrita posteriormente, el injerto de órgano/tejido linfoide/hematopoyético está en un estadio del desarrollo en el que un órgano/tejido
- 65

linfoide/hematopoyético esencialmente no comprende linfocitos T.

5 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el injerto de órgano/tejido linfoide/hematopoyético está en un estadio del desarrollo esencialmente correspondiente al de un órgano/tejido linfoide/hematopoyético porcino en un estadio gestacional seleccionado de un intervalo de aproximadamente 42 a aproximadamente 56 días de gestación.

10 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el injerto de órgano/tejido linfoide/hematopoyético está en un estadio del desarrollo esencialmente correspondiente al de un órgano/tejido linfoide/hematopoyético porcino en un estadio gestacional de aproximadamente 42 días de gestación.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el injerto de órgano/tejido linfoide/hematopoyético no es singénico con el sujeto.

15 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el injerto de órgano/tejido linfoide/hematopoyético es xenogénico con el sujeto.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el injerto de órgano/tejido linfoide/hematopoyético es de origen porcino.

20 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el sujeto es un ser humano.

25 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el sujeto tiene una actividad anómala de una biomolécula producida de forma natural por un órgano/tejido linfoide/hematopoyético del mismo.

30 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el sujeto tiene una concentración en suero anómala de una biomolécula producida por un órgano/tejido linfoide/hematopoyético o de hígado de mamífero.

35 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el sujeto tiene una concentración en suero anómala de un factor de cascada de coagulación producido por un órgano/tejido linfoide/hematopoyético de mamífero.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el injerto de órgano/tejido linfoide/hematopoyético deriva de un órgano/tejido linfoide/hematopoyético en desarrollo.

40 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el injerto de órgano/tejido linfoide/hematopoyético deriva de bazo fetal.

45 De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el método comprende además administrar de forma transitoria al sujeto al menos un inhibidor de coestimulación de linfocitos T y al menos un inhibidor de ligando de CD40.

De acuerdo con más características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el trasplante del injerto al sujeto se efectúa trasplantando el injerto en al menos una cápsula renal del sujeto.

50 La presente divulgación aborda con éxito los defectos de las configuraciones actualmente conocidas proporcionando nuevos injertos de órganos/tejidos en desarrollo/no singénicos pancreáticos, linfoides/hematopoyéticos o pulmonares que están en estadios del desarrollo que permiten el tratamiento eficaz/óptimo en un receptor de los mismos de esencialmente cualquier enfermedad que sea susceptible al trasplante terapéutico de injertos de órganos/tejidos pancreáticos, linfoides/hematopoyéticos o pulmonares, respectivamente.

55 A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen posteriormente métodos y materiales adecuados.

60 En caso de conflicto, la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones, prevalecerán. Además, los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

### Breve descripción de los dibujos

La invención se describe en el presente documento, solamente como ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se destaca que los detalles mostrados son como ejemplo y para fines de análisis ilustrativo de las realizaciones preferidas de la presente invención solamente, y se presentan con la intención de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente entendible de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se realiza ningún intento de mostrar detalles estructurales de la invención en más detalle de lo que es necesario para un entendimiento fundamental de la invención, evidenciando la descripción tomada con los dibujos para los expertos en la materia cómo pueden realizarse en la práctica las varias formas de la invención.

En los dibujos:

Las FIGURAS 1a-f son microfotografías que representan la tinción histológica de un injerto de páncreas porcino E42 6 semanas después del trasplante. Tinción con H y E (Figura 1a), citoqueratina 20 (Figura 1b), vimentina (v9) (Figura 1c), CD31 anti ratón (Figura 1d), insulina (Figura 1e), Ki67 (Figura 1f).

Las FIGURAS 2a-2e son fotografías que representan un injerto de órgano/tejido pancreático E56 3 meses después del trasplante. Se muestran el injerto y su vasculatura (Figura 2a), tinción con H y E (Figura 2b), tinción inmunohistoquímica de insulina (Figura 2c), tinción inmunohistológica de polipéptido pancreático (Figura 2d) y tinción inmunohistológica de Ki67 (Figura 2e).

La FIGURA 3 es una representación de datos acumulados que representa los niveles de insulina porcina en suero de ratones SCID después del trasplante de páncreas embrionario porcino. Se implantó tejido donante obtenido en diferentes edades gestacionales bajo la cápsula renal y se documentaron los niveles en suero 6 semanas después del trasplante como se determinó por ELISA.

Las FIGURAS 4a-d son microfotografías que representan la tinción inmunohistológica de células endoteliales porcinas (que revisten los vasos sanguíneos) marcadas por tinción positiva para CD-31 (tinción más oscura) en páncreas embrionario a E24, E27, E35 y E42, respectivamente.

Las FIGURAS 5a-d son gráficos que representan el seguimiento a largo plazo de los niveles de insulina porcina detectados en el suero de ratones NOD-SCID después del trasplante de páncreas fetal de donantes de diferentes edades gestacionales. Las Figuras 5a-d representan respectivamente los niveles de insulina producidos por órganos generados de donantes de injerto de páncreas porcino del día gestacional E28, E35, E42 y E56.

La FIGURA 6 es un gráfico que representa los niveles de glucosa en ratones NOD-SCID tratados con aloxano, sin un injerto (líneas continuas) y 4 y 10 días después del trasplante de un injerto de páncreas porcino fetal E42.

Las FIGURAS 7a-d son microfotografías de histología que representan el nivel de rechazo de tejidos pancreáticos embrionarios porcinos (E56 y E80) mediados por PBMC humanos, 6 semanas después del trasplante bajo la cápsula renal de ratones NOD-SCID. La Figura 7a representa la tinción de H y E de tejido pancreático de cerdo E56. La Figura 7b representa la infiltración local de PBMC humanas en el injerto de E56 teñido con anti CD45 humano. La Figura 7c representa la tinción con H y E de injerto de órgano/tejido pancreático E80. La Figura 7d representa PBMC humanas teñidas con anticuerpo anti CD45 humano que invaden el injerto de órgano/tejido pancreático E80.

Las FIGURAS 8a-c son microfotografías que representan secciones histológicas de tejido de páncreas (E42) trasplantado a ratones inmunodeficientes e inmunocompetentes. La Figura 8a muestra el tejido en un ratón NOD-SCID, la Figura 8b muestra el tejido en un ratón C57BL/6, y la Figura 8c muestra el tejido en un ratón C57BL/6 inmunosuprimido.

Las FIGURAS 9a-e son fotografías que representan el desarrollo de pulmón porcino E56 y E80 6 semanas después de la implantación bajo la cápsula renal. La Figura 9a que representa el crecimiento de tejido trasplantado obtenido en E56 se ilustra de forma macroscópica. La Figura 9b representa tejido pulmonar teñido (H y E): bronquios respiratorios (flecha), bronquiolos (asteriscos) y alvéolos (cabezas de flecha). La Figura 9c representa cartílago teñido con azul de alciano/PAS de implantes de pulmón E56. Las Figuras 9d-e representan tinción con H y E de la estructura de la pared alveolar y el grosor de implantes E56 y E80, respectivamente.

Las FIGURAS 10a-b representan tinción inmunohistoquímica con H y E y anti vimentina (v9), respectivamente, de tejido esplénico porcino trasplantado E42 6 semanas después del trasplante.

La FIGURA 11 muestra las cantidades relativas de ARNm del factor VIII porcino en diferentes tejidos esplénicos antes y después del trasplante. Se evaluaron los niveles de factor VIII por PCR en tiempo real usando cebadores específicos para el factor VIII porcino. Los resultados se dividieron por la expresión del gen constitutivo beta actina usando cebadores específicos para la beta actina porcina. El ARNm total que se purificó de tejido adulto o de tejido precursor E80 o E100 de hígado porcino y bazo porcino actuó como control positivo. El ARNm total que se purificó del riñón de ratón, de un área distante del implante embrionario, actuó como control negativo.

Las FIGURAS 12a-e representan tinción inmunohistológica de linfocitos T CD3+ de cerdo en tejido de bazo precursor de cerdo embrionario recogido a E42, E56, E80, E100 y de bazo adulto, respectivamente.

Las FIGURAS 13a-d son fotografías que representan el desarrollo de bazo de cerdo E42 después del implante bajo la cápsula renal de ratones NOD-SCID. La Figura 13 muestra una visión macroscópica de E42. La Figura 13b muestra componentes mesenquimales de cerdo (marrón) específicamente teñidos con vimentina (V9). La Figura 13c muestra vasos sanguíneos porcinos, como se muestra por la expresión de CD31 de cerdo, y se demuestra la capacidad proliferativa por tinción de ki67 en la Figura 13d.

La FIGURA 14 es una serie de microfotografías que representan el desarrollo de nidos hematopoyéticos y septos fibrosos en implantes de bazo E42 de cerdo. A los 2 meses, resulta evidente una red reticular fibrosa de tipo esponja perfilada por anticuerpo anti laminina (marrón) con células eritroides de ratón inmovilizadas de forma difusa por anti TER 119 de ratón (marrón). Por el contrario, a los 3 meses después del trasplante, son evidentes septos de tejido conectivo positivos para laminina densos, que rodean nidos de tejido hematopoyético de ratón, incluyendo áreas eritropoyéticas positivas para TER-119 y regiones con megacariocitos (flecha) y mielopoyesis. Las células mieloides hospedadoras, demostradas por inmunotinción con MAC-1 de ratón (marrón) son poco comunes y están distribuidas de forma difusa en trasplantes de bazo a los 2 meses, pero se hacen numerosas dentro de los nidos hematopoyéticos a los 3 meses después del trasplante.

La FIGURA 15 es un gráfico de barras que representa la cantidad relativa de ARNm del factor VIII de cerdo en diferentes tejidos trasplantados, como se evalúa por RT-PCR usando cebadores específicos del factor VIII de cerdo. Los resultados se normalizaron con respecto a la expresión del gen constitutivo, receptor de transferrina. Los niveles de factor VIII de cerdo en injertos de bazo E28, E42 y E56 se muestran por columnas naranjas, verdes y rojas, respectivamente. Los tejidos precursores de bazo adultos, E100 y E80 antes del trasplante se muestran por columnas azules, amarillas y moradas. El ARNm total purificado de bazo de cerdo adulto (columna azul) actuó como control positivo. El ARNm total purificado del riñón de ratón, de un área distante del implante embrionario y de un injerto de páncreas E28 actuó como control negativo.

La FIGURA 16 es un gráfico de barras que representa los valores de PTT de ratones de control NOD-SCID de tipo silvestre, ratones de control factor VIII KO-SCID y ratones factor VIII KO-SCID con trasplante de bazo de cerdo E42, 2, 5, 12 y 14 semanas después del trasplante. \*\*\*\*P valor = 0,0001 (en comparación con factor VIII KO-SCID).

Las FIGURAS 17a-b son gráficos de barras que representan la determinación cromogénica de la actividad del factor VIII en plasma de ratones trasplantados. La Figura 17a representa la comparación de ratones de control factor VIII KO-SCID (amarillo), ratones de control NOD-SCID de tipo silvestre (rojo) y ratones factor VIII KO-SCID con trasplante de bazo de cerdo E42 8 semanas (morado) y 14 semanas (azul) después del trasplante. La Figura 17b representa la distribución de niveles del factor VIII determinados por ensayo cromogénico en ratones factor VIII KO-SCID individuales, 14 semanas después del trasplante de tejido precursor de bazo de cerdo E42.

#### Descripción de las realizaciones preferidas

La presente divulgación es de métodos para proporcionar funciones de órganos y/o tejidos pancreáticos, linfoides/hematopoyéticos o pulmonares a un sujeto mamífero por trasplante de injertos de órganos/tejidos en desarrollo. Estos métodos pueden usarse respectivamente para tratar eficazmente mediante trasplante terapéutico a pacientes humanos que padecen enfermedades pancreáticas tales como diabetes de tipo I, enfermedades hematológicas/metabólicas tales como hemofilia y enfermedad de Gaucher o insuficiencia pulmonar. La presente divulgación emplea el trasplante de nuevos injertos específicos de órgano/tejido que están en estadios del desarrollo en los que estos injertos tienen la capacidad para generar en los receptores del injerto órganos/tejidos que presentan una combinación óptima de diferenciación estructural y funcional, crecimiento, aceptación inmunitaria en el caso de injertos no singénicos y bajo riesgo de formación de teratomas.

Los principios y el funcionamiento de la presente divulgación pueden entenderse mejor con referencia a los dibujos y descripciones adjuntos.

Antes de explicar al menos una realización de la divulgación en detalle, debe entenderse que la invención no se limita en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados por los ejemplos. La invención tiene capacidad para otras realizaciones o puede practicarse o llevarse a cabo de diversas maneras. Además, debe entenderse que la fraseología y terminología empleada en el presente documento es para el fin de describir y no debería considerarse limitante.

El trasplante de órganos o tejidos es la terapia óptima o única para numerosas enfermedades altamente debilitantes/letales pancreáticas, pulmonares y hematológicas/metabólicas. Sin embargo, los métodos actuales de trasplante terapéutico están gravemente obstaculizados por fuentes inadecuadas de órganos/tejidos de donantes inmunológica y/o morfológicamente compatibles, y por el requisito permanente de tratamiento inmunosupresor altamente intensivo y perjudicial de los receptores del injerto para evitar el rechazo del injerto. Las estrategias sugeridas para superar estos obstáculos implican el uso de injertos de órganos/tejidos en desarrollo/no singénicos, tales como injertos de cerdos o seres humanos en desarrollo, estando dichos injertos potencialmente disponibles en suficientes cantidades, y habiéndose mostrado que se toleran mejor por receptores no coincidentes que los injertos de órganos/tejidos completamente diferenciados por derivar de donantes de estadio gestacional.

Sin embargo, todos los enfoques previos que implican el trasplante de órganos/tejidos en desarrollo/no singénicos pancreáticos, pulmonares o linfoides/hematopoyéticos padecen desventajas significativas, incluyendo: tolerancia subóptima por linfocitos de hospedadores no singénicos; diferenciación de injerto estructural y funcional subóptima, por ejemplo con respecto a la producción de insulina por injertos de órganos/tejidos pancreáticos; vascularización de injertos derivada predominantemente de injertos, a diferencia de derivada del hospedador, conduciendo de este modo al rechazo inmunitario; crecimiento subóptimo; disponibilidad inadecuada de órganos/tejidos trasplantables; y/o seguridad subóptima para la administración humana, notablemente con respecto a evitar la generación de

teratomas derivados de injertos.

Los enfoques previos que emplean injertos no singénicos en desarrollo han sido uniformemente subóptimos ya que el tiempo de gestación óptimo para la implantación basado en el riesgo de teratoma, el potencial de crecimiento y la inmunogenicidad, todos los cuales podrían variar entre diferentes órganos en el desarrollo fetal, no estaban suficientemente caracterizados. Además, la técnica anterior no consigue enseñar ningún método para practicar el trasplante terapéutico de injertos de órganos/tejidos linfoides no singénicos en desarrollo.

Mientras se reducía la presente invención a la práctica, los presentes inventores han descubierto estadios del desarrollo específicos de injertos de órganos/tejidos no singénicos pancreáticos, pulmonares y linfoides/hematopoyéticos durante los que estos pueden trasplantarse a un receptor para generar, en ausencia de teratomas derivados de injertos, células, órganos y tejidos que presentan crecimiento óptimo, diferenciación estructura y funcional y requisitos para inmunosupresión del receptor mínima.

Específicamente, mientras se la presente invención a la práctica, se descubrió lo siguiente: los xenoinjertos pancreáticos derivados de cerdos en un estadio del desarrollo de 42 a 80 días de gestación (por ejemplo, 42-56 días de gestación), o aloinjertos de órganos/tejidos pancreáticos humanos en un estadio del desarrollo de 14-20 semanas, pueden usarse para generar después del trasplante órganos/tejidos pancreáticos productores de insulina bien desarrollados; los xenoinjertos de órganos/tejidos pulmonares de cerdos en un estadio gestacional de 42 a 80 días de gestación pueden generar después del trasplante órganos/tejidos pulmonares bien desarrollados incluyendo estructuras alveolares; y los xenoinjertos de órganos/tejidos linfoides/hematopoyéticos de cerdos en un estadio gestacional de 42 a 80 días pueden generar órganos/tejidos linfoides/hematopoyéticos bien desarrollados después del trasplante. En particular, se usaron xenoinjertos de órganos/tejidos linfoides/hematopoyéticos de cerdos en un estadio gestacional de 42 días para generar órganos/tejidos linfoides/hematopoyéticos bien desarrollados que secretan niveles terapéuticos del factor VIII después del trasplante en mamíferos deficientes en factor VIII.

Como se muestra posteriormente en el presente documento y en la sección de Ejemplos a continuación, se recogen injertos terapéuticos de la presente invención en una ventana del desarrollo específica que proporciona a estos injertos características de funcionalidad y resistencia que son superiores a los injertos proporcionados por la técnica anterior. Por lo tanto, como se muestra en los ejemplos a continuación, los injertos porcinos pancreáticos recogidos en E42-56 son superiores a los injertos porcinos de la técnica anterior recogidos en E28 (Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20040136972) o E80 [Groth CG. *et al.*, (1994) *Lancet* 344:1402-4]. De forma similar, el bazo embrionario porcino recogido en E42 es superior al tejido recogido en E28 y E80.

La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de ventanas de tiempo gestacionales distintas óptimas para el trasplante terapéutico de órganos/tejidos pancreáticos, pulmonares o linfoides/hematopoyéticos de estadio del desarrollo. Hay tres criterios principales para seleccionar injertos en desarrollo/no singénicos para trasplante terapéutico: (i) el injerto debería estar en un estadio del desarrollo suficientemente avanzado para ser capaz de generar un órgano para el tejido estructural y funcionalmente diferenciado, vascularizado por el hospedador *in situ*; (ii) el injerto debería estar en un estadio del desarrollo suficientemente avanzado para no inducir teratomas derivados de injerto; y (iii) el injerto debería estar en un estadio del desarrollo suficientemente temprano para tolerarse inmunológicamente de forma óptima por linfocitos humanos no singénicos. Con frecuencia hay una compensación entre los tres criterios, siendo la funcionalidad del órgano/tejido el más urgente.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para proporcionar una función pancreática a un sujeto mamífero. El método se efectúa trasplantando al sujeto un injerto de órgano/tejido pancreático de mamífero, que está en un estadio del desarrollo esencialmente correspondiente al de un órgano/tejido pancreático porcino en un estadio gestacional de aproximadamente 42 a aproximadamente 80 días de gestación.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" se refiere a más o menos 10 por ciento.

El método de acuerdo con aspectos de la presente invención relacionados con el trasplante de injertos de órganos/tejidos pancreáticos puede usarse para tratar cualquier enfermedad en el sujeto que sea susceptible de tratamiento mediante trasplante de un injerto de órgano/tejido pancreático.

Como se usa en el presente documento, el término "tratar" incluye curar, aliviar o estabilizar la enfermedad, o inhibir la aparición futura o el desarrollo de la enfermedad.

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

Las enfermedades de la presente invención son normalmente resultantes de o están asociadas con actividad anómala de al menos una biomolécula producida de forma natural por el sujeto. Dicha actividad anómala de la biomolécula puede resultar de la síntesis o degradación anómala de la biomolécula. Como alternativa, puede

resultar de la actividad catalítica anómala (es decir, aumentada o reducida en comparación con una actividad producida por un tejido sano).

El sujeto de acuerdo con diversos aspectos de la presente invención es preferentemente un ser humano.

5 Preferentemente, el injerto de órgano/tejido pancreático está en un estadio del desarrollo esencialmente correspondiente al de un órgano/tejido pancreático porcino en un estadio gestacional de aproximadamente 28-80 días de gestación, preferentemente de aproximadamente 42 a aproximadamente 56 días de gestación.

10 Aunque dicho injerto puede originarse de cualquiera de diversos mamíferos donantes, como se describe adicionalmente posteriormente en el presente documento, dicho injerto es preferentemente no singénico con el sujeto y/o deriva de un cerdo, más preferentemente ambos. Como alternativa, dicho injerto de órgano/tejido pancreático puede ser singénico con el sujeto y/o derivar de un ser humano.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión injerto "no singénico" se refiere a un injerto que no es esencialmente genéticamente idéntico al sujeto o esencialmente todos los linfocitos del sujeto, tal como un injerto alogénico o un injerto xenogénico.

20 Como se usa en el presente documento, el término "injerto alogénico" se refiere a un injerto que deriva de un donante que no es singénico con el sujeto o con una proporción sustancial de los linfocitos presentes en el sujeto, y que es de la misma especie que el sujeto o sustancialmente todos los linfocitos del sujeto. Normalmente, los mamíferos no clonales/no gemelos de la misma especie son alogénicos entre sí.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "injerto xenogénico" se refiere a un injerto que deriva de un donante que es de una especie diferente que el sujeto o de una proporción sustancial de los linfocitos presentes en el sujeto.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "injerto singénico" se refiere a un injerto que es esencialmente genéticamente idéntico al sujeto o esencialmente todos los linfocitos del sujeto. Los ejemplos de injertos singénicos incluyen un injerto derivado del sujeto (también denominado en la técnica "injerto autólogo"), de un clon del sujeto o de un individuo idéntico al sujeto.

35 Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para proporcionar una función pancreática a un sujeto mamífero. El método se efectúa trasplantando al sujeto un injerto de órgano/tejido pancreático que está en un estadio del desarrollo esencialmente correspondiente al de un órgano/tejido pancreático humano en un estadio gestacional de aproximadamente 14 a aproximadamente 20 semanas de gestación.

40 Preferentemente, el injerto de órgano/tejido pancreático está en un estadio del desarrollo esencialmente correspondiente al de un órgano/tejido pancreático humano en un estadio gestacional de aproximadamente 14 a aproximadamente 20 semanas de gestación.

45 Aunque dicho injerto puede originarse de cualquiera de diversos mamíferos donantes, como se describe posteriormente en el presente documento, dicho injerto es preferentemente de origen fetal humano y/o no es singénico con el sujeto. Como alternativa, dicho injerto de órgano/tejido pancreático puede derivar de un cerdo. El injerto puede ser singénico con el sujeto.

50 El trasplante de un injerto de órgano/tejido pancreático de la presente divulgación se usa preferentemente para proporcionar función pancreática a un sujeto que tiene una concentración en suero anómala de una biomolécula producida por un páncreas de mamífero, más preferentemente en el que la concentración en suero es anormalmente baja. Preferentemente, la biomolécula se produce por islotes pancreáticos de mamífero, y es más preferentemente insulina.

55 Como se describe y se ilustra en el Ejemplo 6 de la sección de Ejemplos posterior, puede usarse un xenoinjerto de órgano/tejido pancreático de cerdo en un estadio del desarrollo de 42 a 56 días para generar, en ausencia de la formación de teratomas, órganos/tejidos pancreáticos bien desarrollados que producen niveles óptimos de insulina en un receptor del mismo, y por lo tanto puede usarse para el tratamiento de una enfermedad pancreática tal como diabetes de tipo 1 (diabetes mellitus insulino dependiente y diabetes de aparición juvenil).

60 Se apreciará que la presente divulgación de que puede usarse un injerto de órgano/tejido pancreático de mamífero que está en dicho estadio del desarrollo para generar órganos/tejidos pancreáticos secretores de insulina bien desarrollados adecuados para el tratamiento de una enfermedad pancreática, tal como diabetes de tipo 1, es claramente nueva e impredecible en relación con la técnica anterior.

65 Como se muestra adicionalmente y se ilustra en el Ejemplo 5 de la sección de Ejemplos posterior, un aloinjerto de órgano/tejido pancreático de origen humano en un estadio del desarrollo de 8 semanas puede usarse para generar,

en ausencia de formación de teratomas, órganos/tejidos pancreáticos bien desarrollados productores de niveles óptimos de insulina en un receptor del mismo, y por lo tanto puede usarse para el tratamiento de una enfermedad pancreática tal como diabetes de tipo 1.

5 Se apreciará que la presente divulgación de que puede usarse un injerto de órgano/tejido pancreático de mamífero que está en dicho estadio del desarrollo para generar órganos/tejidos pancreáticos secretores de insulina bien desarrollados adecuados para el tratamiento de una enfermedad pancreática, tal como diabetes de tipo 1, es claramente nueva e impredecible con respecto a la técnica anterior.

10 Como alternativa, los ejemplos de enfermedades que pueden tratarse mediante aspectos de la presente divulgación en relación con el trasplante de un injerto de órgano/tejido pancreático incluyen diabetes de tipo 2 y cáncer pancreático.

15 Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la presente divulgación, se proporciona un método para generar tejido pulmonar en un sujeto mamífero que lo necesite. El método se efectúa trasplantando al sujeto un injerto pulmonar de mamífero en desarrollo que está en un estadio del desarrollo esencialmente correspondiente al de un órgano/tejido pulmonar porcino en un estadio gestacional de aproximadamente 42 a aproximadamente 80 días de gestación.

20 El método de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación puede usarse para tratar cualquier enfermedad en el sujeto que sea susceptible de tratamiento mediante trasplante de un injerto de órgano/tejido pulmonar.

25 Preferentemente, el injerto pulmonar está en un estadio del desarrollo esencialmente correspondiente al de un órgano/tejido pulmonar porcino en un estadio gestacional de aproximadamente 56 a aproximadamente 80 días de gestación.

30 Aunque dicho injerto puede originarse de cualquiera de diversos mamíferos donantes, como se describe adicionalmente posteriormente en el presente documento, dicho injerto es preferentemente de origen porcino y/o no es singénico con el sujeto, más preferentemente ambos. Como alternativa, el injerto de órgano/tejido linfóide/hematopoyético puede ser singénico con el sujeto y/o derivar de un ser humano.

35 Como se describe y se ilustra en el Ejemplo 7 de la sección de Ejemplos posterior, puede usarse un xenoinjerto de órgano/tejido pulmonar de origen porcino en un estadio del desarrollo de 56 a 80 días para generar, en ausencia de la formación de teratomas, órganos/tejidos pulmonares bien desarrollados que comprenden estructuras alveolares. Por lo tanto, dichos injertos de órgano/tejido pulmonar pueden usarse para trasplante terapéutico para el tratamiento de insuficiencia pulmonar.

40 Se apreciará que la presente divulgación de que un injerto de órgano/tejido pulmonar de mamífero que está en dicho estadio del desarrollo puede proporcionar órganos/tejidos pulmonares a un receptor del mismo es claramente nueva e impredecible con respecto a la técnica anterior.

45 Los ejemplos de enfermedades pulmonares que pueden tratarse de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación incluyen fibrosis quística, enfisema, asbestosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y fibrosis pulmonar.

50 Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional más de la presente divulgación, se proporciona un método para proporcionar una función de órgano/tejido linfóide/hematopoyético a un sujeto mamífero.

55 El método se efectúa trasplantando al sujeto un injerto de órgano/tejido linfóide/hematopoyético de mamífero en desarrollo.

60 El método de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación puede usarse para tratar cualquier enfermedad en el sujeto que sea susceptible de tratamiento mediante trasplante de un injerto de órgano/tejido linfóide/hematopoyético. En particular, el método de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación puede usarse para tratar la hemofilia, en particular la hemofilia A.

65 Preferentemente, el injerto de órgano/tejido linfóide/hematopoyético está en un estadio del desarrollo en el que un órgano/tejido linfóide/hematopoyético esencialmente no comprende linfocitos T.

70 Sin quedar ligado a un paradigma, los presentes inventores opinan que un injerto de órgano/tejido linfóide/hematopoyético en dicho estadio del desarrollo tendrá un riesgo mínimo de inducir enfermedad de injerto contra huésped (GVHD) en un receptor del mismo en virtud de su falta de linfocitos T.

75 Preferentemente, el injerto de órgano/tejido linfóide/hematopoyético está en un estadio del desarrollo esencialmente correspondiente al de un órgano/tejido linfóide/hematopoyético porcino en un estado gestacional de aproximadamente 42 a aproximadamente 80 días de gestación, más preferentemente en un estadio del desarrollo

esencialmente correspondiente al de un órgano/tejido linfoide/hematopoyético porcino en un estadio gestacional de aproximadamente 42 a aproximadamente 56 días de gestación y, más preferentemente, en un estadio del desarrollo esencialmente correspondiente al de un órgano/tejido linfoide/hematopoyético porcino en un estadio gestacional de aproximadamente 42 días de gestación.

5 El injerto de órgano/tejido linfoide/hematopoyético es capaz de producir linfocitos y/o células hematopoyéticas. El órgano/tejido linfoide/hematopoyético preferentemente deriva del bazo. Como alternativa, el injerto de órgano/tejido linfoide/hematopoyético puede derivar de ganglios linfáticos, placas de Peyer, timo o médula ósea.

10 Aunque dicho injerto puede originarse de cualquier de diversos mamíferos donantes, como se describe adicionalmente posteriormente en el presente documento, dicho injerto es preferentemente de origen porcino y/o no es singénico con el sujeto, más preferentemente ambos. Como alternativa, el injerto de órgano/tejido linfoide/hematopoyético puede ser singénico con el sujeto y/o derivado de un ser humano.

15 Se usa preferentemente trasplante de un injerto de órgano/tejido linfoide/hematopoyético de la presente invención para proporcionar función de órgano/tejido linfoide/hematopoyético a un sujeto que tiene una actividad anómala de una biomolécula producida de forma natural por un órgano/tejido linfoide/hematopoyético de mamífero.

20 Preferentemente, la biomolécula es un factor de cascada de coagulación, más preferentemente factor VIII.

25 Como se muestra y se ilustra en el Ejemplo 10 de la sección de Ejemplos posterior, un xenoinjerto de órgano/tejido linfoide/hematopoyético de origen porcino en un estadio del desarrollo de 42 días de gestación puede usarse para generar, en ausencia de formación de teratomas, órganos/tejidos linfoides/hematopoyéticos bien desarrollados que producen niveles terapéuticos de una enzima hematológica, tal como factor VIII, en el que el sujeto tiene una enfermedad que implica una deficiencia de dicha enzima, y por lo tanto puede usarse para tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad hematológica/metabólica tal como una hemofilia, en particular hemofilia A.

30 Se apreciará que la presente divulgación de que un injerto de órgano/tejido linfoide/hematopoyético de mamífero que está en dicho estadio del desarrollo puede usarse para generar órganos/tejidos linfoides/hematopoyéticos capaces de generar niveles terapéuticos del factor VIII en un mamífero deficiente en factor VIII es claramente nueva e impredecible con respecto a la técnica anterior.

35 Otros ejemplos de enfermedades asociadas con deficiencia de factores de coagulación que pueden tratarse de acuerdo con este aspecto de la presente invención incluyen hemofilia B/deficiencia de factor IX y enfermedad de von Willebrand/deficiencia de factor de von Willebrand. El método de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación puede usarse para tratar cualquiera de diversas enfermedades de almacenamiento lisosómico hematológicas, incluyendo enfermedad de Gaucher (deficiencia de glucocerebrosidasa). Se apreciará que el método de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación también puede usarse para reparar una lesión esplénica.

40 Dependiendo del contexto de trasplante, para facilitar el prendimiento de un injerto no singénico de la presente divulgación, el trasplante de un injerto de la presente divulgación puede comprender además provechosamente tratar a un sujeto de la presente divulgación con un régimen inmunosupresor antes de, simultáneamente con, o después del trasplante del injerto. En general se apreciará que el prendimiento de injertos de estadio posterior requerirá mayor inmunosupresión de un receptor de injerto que para injertos de estadios más tempranos. Las desventajas de la terapia inmunosupresora pueden compensarse claramente por los beneficios de un órgano/tejido completamente funcional; como sucede con un trasplante que salve vidas.

45 Preferentemente, para facilitar el prendimiento de un injerto no singénico, el régimen inmunosupresor puede comprender provechosamente administrar de forma transitoria al sujeto al menos un inhibidor de la coestimulación de linfocitos T y al menos un inhibidor de ligando CD40, y más preferentemente puede comprender además administrar al sujeto un inhibidor de la proliferación de linfocitos T.

50 Preferentemente, el inhibidor de la coestimulación de linfocitos T es CDTLA4-Ig, el inhibidor de ligando CD40 es el anticuerpo anti ligando CD40, y el inhibidor de la proliferación de linfocitos T es rapamicina. Como alternativa, el inhibidor de la coestimulación de linfocitos T puede ser un anticuerpo anti CD40. Como alternativa, el inhibidor de la coestimulación de linfocitos T puede ser un anticuerpo específico para B7-1, B7-2 o CD28. Dichos fármacos polipeptídicos son particularmente ventajosos ya que estos son, a diferencia de los fármacos inmunosupresores habitualmente usados como ciclosporina A, esencialmente no tóxicos y/o no carcinogénicos, y en virtud del bloqueo pasivo de interacciones de receptores de superficie celular, proporcionan inmunosupresión reversible y temporal del sujeto.

55 Un régimen inmunosupresor adecuado para superar el rechazo de xenoinjertos porcinos, como se describe en el Ejemplo 6 (Figura 8c), es el siguiente: rapamicina administrada por vía subcutánea a 1,5 miligramos por kilogramo diariamente desde el día 0 + 8 miligramos por kilogramo de CTLA4-Ig, y 10 miligramos de anticuerpos anti ligando CD40 por kilogramo administrados por vía intraperitoneal los días 0, 2, 4, 6 después del trasplante.

60

Los ejemplos de tipos adecuados de regímenes inmunosupresores incluyen administración de fármacos inmunosupresores, poblaciones celulares inductoras de tolerancia y/o irradiación inmunosupresora.

Se proporcionan amplias directrices para seleccionar y administrar regímenes inmunosupresores adecuados para el trasplante en la bibliografía de la técnica (por ejemplo, véase: Kirkpatrick CH. y Rowlands DT Jr., 1992. JAMA. 268, 2952; Higgins RM. *et al.*, 1996. Lancet 348, 1208; Suthanthiran M. y Strom TB., 1996. New Engl. J. Med. 331, 365; Midthun DE. *et al.*, 1997. Mayo Clin Proc. 72, 175; Morrison VA. *et al.*, 1994. Am J Med. 97, 14; Hanto DW., 1995. Annu Rev Med. 46, 381; Senderowicz AM. *et al.*, 1997. Ann Intern Med. 126, 882; Vincenti F. *et al.*, 1998. New Engl. J. Med. 338, 161; Dantal J. *et al.* 1998. Lancet 351, 623).

Los ejemplos de fármacos inmunosupresores adecuados incluyen, pero sin limitación, 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), Copaxona, rapamicina, prednisona, metil prednisolona, azatiopreno, ciclosporina A (CsA), tacrolimus, ciclofosfamida y fludarabina, mofetil micofenolato, daclizumab [un anticuerpo anti cadena alfa de IL2R (CD25) humanizado (IgG1 Fc)], y anticuerpos anti linfocitos T conjugados con toxinas (por ejemplo, cadena A del cólera o toxina de *Pseudomonas*).

Puede trasplantarse un injerto de acuerdo con la presente divulgación al sujeto de cualquiera de diversas maneras, dependiendo de la aplicación y fin, para proporcionar una función específica de órgano/tejido al sujeto de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación. Un experto habitual en la materia, tal como un cirujano de trasplantes especializado en la enfermedad para tratar, poseerá la experiencia necesaria para aplicar las enseñanzas de la presente divulgación para trasplantar un injerto terapéuticamente eficaz de la presente divulgación a un sujeto de la presente divulgación. Se apreciará que para tratar la enfermedad, el trasplante del injerto debería efectuarse de tal manera que reemplace o repare terapéuticamente el órgano o tejido que presenta la fisiología o morfología patológica asociada con la enfermedad.

Como se usa en el presente documento, la expresión "injerto terapéuticamente eficaz" se refiere a un injerto que tiene características estructurales y/o funcionales tales que el trasplante del mismo al sujeto sirva para tratar la enfermedad.

El trasplante de un injerto de la presente divulgación puede efectuarse de numerosas maneras, dependiendo de diversos parámetros, tales como, por ejemplo, el tipo, estadio o gravedad de la enfermedad para tratar, los parámetros físicos o fisiológicos específicos para el sujeto individual y/o el resultado terapéutico deseado. Por ejemplo, dependiendo de la aplicación y fin, el trasplante del injerto puede efectuarse implantando un injerto en una cualquiera de diversas localizaciones anatómicas adecuadas 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 discretos, tejidos y/o partes de los mismos.

Un injerto de la presente divulgación puede derivar de un donante que es de una cualquiera de diversas especies. Los orígenes de especie adecuados para el injerto que comprenden los principales animales domesticados o de ganado y primates, que se han caracterizado exhaustivamente con respecto a la correlación del estadio de diferenciación con el estadio gestacional pueden ser adecuados para practicar el método. Dichos animales incluyen bovinos (por ejemplo, vaca), equinos (por ejemplo, caballo), ovinos (por ejemplo, cabra, oveja), felinos (por ejemplo, *Felis domestica*), caninos (por ejemplo, *Canis domestica*), roedores (por ejemplo, ratón, rata, conejo, cobaya, gerbo, hámster) y primates (por ejemplo, chimpancé, mono rhesus, macaco; tití).

Pueden emplearse diversos métodos para obtener un injerto en un estadio del desarrollo esencialmente correspondiente al de un injerto derivado de porcino o un ser humano, como se enseña en el presente documento. La obtención de dicho injerto se efectúa de forma óptima recogiendo el injerto de un embrión o feto donante de injerto en desarrollo en dicho estadio de gestación. Se entenderá por los expertos en la técnica que el estadio gestacional de un organismo es el periodo de tiempo transcurrido después de fertilización del oocito que genera el organismo.

Puede obtenerse un injerto en un estadio del desarrollo deseado por cultivo *in vitro* de células, órganos/tejidos. Dicha diferenciación *in vitro* controlada de células, tejidos u órganos se realiza de forma rutinaria, por ejemplo, usando el cultivo de líneas de células madre embrionarias para generar cultivos que contienen células/tejidos/órganos de linajes deseados. Por ejemplo, para la generación de diversos linajes, incluyendo linajes endodérmicos tales como el hígado; se hace referencia a linajes ectodérmicos tales como cerebro, piel y adrenal; y linajes mesodérmicos tales como músculo, cartílago, conducto mulleriano y corazón, por ejemplo, en: Schuldiner M. *et al.*, 2000. Proc Natl Acad Sci U S A. 97: 11307-11312 e Itskovitz-Eldor J. *et al.*, 2000. Mol Med 6:88; para diferenciación pancreática de células madre embrionarias, véase, por ejemplo: Lee S. H., *et al.*, 2000. Nature Biotechnol. 18: 675; Lumelsky *et al.*, 2001. Science 292: 1389-1394; Soria *et al.*, 2000. Diabetes 49: 1-6; Schuldiner M. *et al.*, 2000. Proc Natl Acad Sci U S A. 97:11307-11312. Para la diferenciación de linajes pulmonares, véase por ejemplo, Otto WR., 1997. Int J Exp Pathol. 78: 291-310.

La siguiente tabla proporciona ejemplos de los estadios gestacionales de injertos humanos y porcinos en los que estos pueden proporcionar injertos que son esencialmente de estadios del desarrollo correspondientes:

**Estadios gestacionales correspondientes de cerdos y seres humanos.**

5

Estadio gestacional de injerto porcino (días)	Estadio gestacional de injerto humano (días)
18	44
20	49
22	54
23	56-57
25	61-62
26	63
28	68-69
31	75
38	92
42	102
46	112
49	119
56	136
62	151
72	175
80	195
88	214

El estadio gestacional (en días) de un injerto que pertenece a una especie dada que está en un estadio del desarrollo esencialmente correspondiente al de un injerto porcino puede calcularse de acuerdo con la siguiente fórmula: [estadio gestacional de injerto porcino en días] / [periodo gestacional de cerdo en días] x [estadio gestacional de injerto de la especie dada en días]. De forma similar, el estadio gestacional (en días) de un injerto que pertenece a una especie dada que está en un estadio del desarrollo esencialmente correspondiente a la de un injerto humano puede calcularse de acuerdo con la siguiente fórmula: [estadio gestacional de injerto humano en días] / [periodo gestacional de seres humanos en días] x [estadio gestacional del injerto de una especie dada en días]. El estadio gestacional de los cerdos es de aproximadamente 115 días y el de seres humanos es de aproximadamente 280 días.

Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, el trasplante de injerto puede efectuarse por trasplante del mismo en diversas localizaciones anatómicas adecuadas para que sea terapéuticamente eficaz.

10 Dependiendo de la aplicación y el fin, el injerto puede trasplantarse a 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 anómala para el tipo de órgano o tejido del injerto). Opcionalmente, cuando se trasplanta el injerto para reparar o reemplazar un órgano/tejido dañado, este último puede retirarse, por ejemplo, para permitir el crecimiento y prendimiento del injerto, por ejemplo en el contexto del reemplazo de órganos por  
 15 trasplante del injerto en una localización anatómica homotópica.

Dependiendo de la aplicación y fin, el injerto puede implantarse provechosamente bajo la cápsula renal, o en el riñón, la grasa testicular, el tejido subcutáneo, el omento, la vena porta, el hígado, el bazo, la cavidad cardiaca, el corazón, la cavidad torácica, el pulmón, el páncreas y/o el espacio intraabdominal.

20 El trasplante de un injerto de órgano/tejido pancreático de la presente divulgación puede efectuarse provechosamente trasplantando el injerto a la vena porta, el hígado, el páncreas, la grasa testicular, el tejido subcutáneo, el omento, un asa intestinal (la subserosa de un asa U del intestino delgado) y/o el espacio intraabdominal. Preferentemente, el trasplante de un injerto de órgano/tejido pancreático de la presente divulgación  
 25 se efectúa trasplantando el injerto bajo al menos una cápsula renal del sujeto. Preferentemente, para trasplantar un

injerto de órgano/tejido pancreático a la vena porta, el injerto de órgano/tejido pancreático es un injerto de islotes pancreáticos. Para el sitio del omento, el omento se reconocerá y se creará un bolsillo del omento por ligamiento de sutura circular seguido de implantación de tejido embrionario en el bolsillo. Se proporcionan directrices para practicar el trasplante terapéutico de injertos de órganos/tejidos pancreáticos de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación en la sección de Ejemplos posterior.

Como se describe y se ilustra en la sección de Ejemplos posterior, un injerto de órgano/tejido linfóide/hematopoyético o pancreático puede trasplantarse bajo una cápsula renal de un mamífero para producir niveles significativos de insulina o de un factor hematológico tal como el factor VIII, respectivamente, en el suero del sujeto.

Como se describe adicionalmente y se ilustra en la sección de Ejemplos posterior, puede trasplantarse un injerto de órgano/tejido pulmonar bajo una cápsula renal de un mamífero para generar órganos/tejidos pulmonares bien desarrollados que comprenden estructuras alveolares en el sujeto. Dichos órganos/tejidos pulmonares pueden volver a implantarse de forma adecuada en el tórax del sujeto después de dicho desarrollo de tal manera que proporcione función pulmonar al sujeto.

Dependiendo de la aplicación y fin, el trasplante del injerto puede efectuarse trasplantando un injerto que consiste en un órgano completo o parcial y/o puede efectuarse trasplantando un injerto que consiste en diversos números de órganos discretos, tejidos y/o partes de los mismos.

Por ejemplo, el trasplante de números crecientes de injertos de órganos o tejidos discretos puede emplearse provechosamente para aumentar el efecto terapéutico fisiológico o físico del injerto a niveles deseados. Por ejemplo, cuando el injerto es un injerto de islotes pancreáticos, el aumento del número de injertos puede usarse para generar niveles en suero suficientemente altos de una hormona pancreática, tal como insulina, para tratar una deficiencia de hormona pancreática tal como diabetes de tipo 1. De forma similar, el aumento del número y/o la masa de injertos de órganos/tejidos linfoides/hematopoyéticos puede usarse para generar niveles suficientemente altos del factor hematopoyético, tal como el factor VIII o la glucocerebrosidasa, para permitir el tratamiento de la hemofilia A o enfermedad de Gaucher, respectivamente.

Después del trasplante, pueden controlarse provechosamente la tolerancia inmunológica del sujeto, en el caso de un injerto no singénico, y el crecimiento funcional y estructural y la diferenciación del injerto.

La evaluación de los niveles en suero en el sujeto de esencialmente cualquier biomolécula producida por un injerto de órgano/tejido linfóide/hematopoyético o pancreático, tal como insulina, factor VIII, glucocerebrosidasa y similares, cuya deficiencia se sabe que está asociada con una enfermedad, puede controlarse fácilmente de acuerdo con métodos de diagnóstico médico convencionales, incluyendo como se describe en la sección de Ejemplos a continuación. La normalización de los niveles de glucosa en suero en el suero de un sujeto diabético después del trasplante de un injerto de islotes pancreáticos es indicativa de funcionalidad del injerto (es decir, secreción de insulina fisiológicamente regulada por el injerto). En general el desarrollo del injerto histológico puede controlarse mediante biopsia y el desarrollo del injerto estructural/morfológico general puede controlarse mediante cualquiera de diversos métodos de captura de imágenes y diagnóstico médico convencionales.

Pueden emplearse diversos métodos para evaluar la tolerancia inmunológica del sujeto al injerto. Por ejemplo, la tolerancia puede evaluarse controlando la infiltración específica de linfocitos T o leucocitos específicos del sujeto del injerto, controlando el origen de la vasculatura del injerto y/o controlando la apariencia histológica de estructuras específicas del órgano o tejido. Dicho control puede efectuarse provechosamente usando métodos, tales como mediante biopsia de muestra, conocidos por los expertos en la materia. La infiltración de leucocitos, neutrófilos, linfocitos citolíticos naturales o linfocitos T del sujeto en el injerto, o falta de la misma, es normalmente indicativa de injerto subóptimo u óptimo de un injerto no singénico en el sujeto, respectivamente. En casos en los que la tolerancia del sujeto del injerto requiere mejora, puede realizarse o ajustarse provechosamente el tratamiento inmunosupresor adjunto terapéutico del sujeto, como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Se apreciará por el experto en la materia que un injerto tolerado de forma óptima es un injerto no rechazado o sustancialmente no infiltrado en el sujeto por linfocitos T no singénicos con el injerto. Un injerto puede rechazarse mediante rechazo hiperagudo, rechazo agudo o rechazo crónico. Se proporcionan en la bibliografía de la técnica directrices amplias para determinar el rechazo de injertos (por ejemplo, véase: Kirkpatrick CH. y Rowlands DT Jr., 1992. JAMA. 268, 2952; Higgins RM. *et al.*, 1996. Lancet 348, 1208; Suthanthiran M. y Strom TB., 1996. New Engl. J. Med. 331, 365; Midthun DE. *et al.*, 1997. Mayo Clin Proc. 72, 175; Morrison VA. *et al.*, 1994. Am J Med. 97, 14; Hanto DW., 1995. Annu Rev Med. 46, 381; Senderowicz AM. *et al.*, 1997. Ann Intern Med. 126, 882; Vincenti F. *et al.*, 1998. New Engl. J. Med. 338, 161; Dantal J. *et al.* 1998. Lancet 351, 623). La vascularización derivada de injerto se correlacionará en general con mal prendimiento, y tenderá a aumentar con el estadio gestacional del injerto en el momento de la implantación.

Se apreciará que la presente divulgación permite la identificación de estadios del desarrollo apropiados de injertos de órganos/tejidos de cualquiera de diversos linajes que pueden usarse para tratamiento de esencialmente cualquier enfermedad asociada con la fisiología o morfología de órganos o tejidos patológica que es susceptible del

tratamiento mediante trasplante. Dichas enfermedades incluyen enfermedades renales, esplénicas, pancreáticas, cardíacas, hepáticas, hematológicas, genéticas, pulmonares, cerebrales, gastrointestinales, musculares, endocrinas, óseas, neurales, hematológicas/metabólicas, dérmicas, cosméticas, oftalmológicas y vasculares.

5 Por lo tanto, la presente divulgación identifica estadios del desarrollo de injertos de órganos/tejidos pancreáticos, pulmonares y linfoides/hematopoyéticos, tales como injertos porcinos que pueden obtenerse esencialmente en cantidades ilimitadas, en los que dichos injertos pueden usarse para tratar de forma óptima enfermedades en seres humanos, tales como diabetes de tipo 1 y hemofilia A, que son susceptibles de tratamiento mediante trasplante, respectivamente, de órganos/tejidos pancreáticos, pulmonares o linfoides/hematopoyéticos.

10 Se espera que durante la vida de esta patente se desarrollen muchas técnicas de diagnóstico médico relevantes y se pretende que el alcance de la frase "método para evaluar el estadio de diferenciación de un órgano de mamífero más adecuado para el trasplante del mismo en un sujeto mamífero" incluya todas estas nuevas tecnologías a priori.

15 Resultarán evidentes para un experto en la materia objetos, ventajas y características nuevas adicionales de la presente divulgación tras el examen de los siguientes ejemplos, que no se pretende que sean limitantes. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente divulgación como se han indicado anteriormente en el presente documento y como se reivindica en la sección de reivindicaciones posteriormente encuentra apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

## 20 Ejemplos

Se hace ahora referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de una manera no limitante.

25 En general, 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. Dichas técnicas se explican exhaustivamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A laboratory Manual" Sambrook *et al.*, (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volúmenes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Watson *et al.*, "Recombinant DNA", Scientific American Books, Nueva York; Birren *et al.* (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998); metodologías como se exponen en las Patentes de Estados Unidos N° 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 *et al.* (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8ª Edición), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman y Co., Nueva York (1980); se describen exhaustivamente inmunoensayos disponibles en la bibliografía de patentes y científica, véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Se proporcionan otras referencias generales a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos de las mismas se conocen bien en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

50 A no ser que se definan de otro modo, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen a continuación métodos y materiales adecuados.

## 55 EJEMPLO 1

### **Material y métodos diversos**

60 **Trasplante de tejido fetal bajo la cápsula renal:** puede desearse el trasplante de un injerto bajo la cápsula renal para injertos distintos de injertos renales. El trasplante de tejido fetal bajo la cápsula renal de ratones receptores se realizó como se ha descrito previamente (Dekel, B. *et al.*, 1997. Transplantation 64, 1541-1550). Se usaron órganos humanos o porcinos fetales completos o tejidos completos o fragmentos de tejidos de 1-2 milímetros de diámetro en estadios posteriores de gestación en los trasplantes. Para ensayos de crecimiento, se realizó trasplante 7-10 después de la reconstitución de hospedadores irradiados con médula ósea NOD/SCID. Como alternativa, se trasplantaron tejidos fetales en ratones receptores SCID. Para el trasplante, los tejidos fetales se mantuvieron en

condicione estériles a 4 grados centígrados durante aproximadamente dos horas en RPMI 1640 o medio de Eagle modificado por Dulbecco complementado con suero de ternero fetal al 10 por ciento (FCS; Biological Industries, Beit Haemek, Israel). El trasplante de tejido se realizó bajo anestesia general inducida por la inyección intraperitoneal de Avertin 2,5 por ciento en solución salina tamponada con fosfato (10 mililitros por kilogramo de peso corporal). Ambos riñones del hospedador se expusieron mediante una incisión bilateral, se realizó una incisión de 1,5 milímetros en el extremo caudal de la cápsula renal, y se implantó un fragmento de aproximadamente un milímetro cúbico de tejido renal bajo cada cápsula renal. Los tejidos también se trasplantaron por vía intraabdominal para controlar con respecto al privilegio inmunitario específico de espacio sucapsular renal. Los ratones trasplantados se trataron de forma postoperatoria con ciprofloxacina en su agua para beber durante 7 días.

**Análisis de la vascularización del injerto:** se inmunotñieron secciones de parafina de cinco micrómetros de grosor con anticuerpos específicos para vasos sanguíneos, incluyendo PECAM-1 y CD-31, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizaron recuentos de Vasos Sanguíneos en regiones similares dentro de los injertos por cada campo de gran aumento (5 campos consecutivos por trasplante en 5 trasplantes por grupo).

## **EJEMPLO 2**

### **Trasplante de injertos de órganos/tejidos pancreáticos humanos y animales fetales de 12-16 semanas en un hospedador**

Los órganos/tejidos humanos o porcinos fetales trasplantados a un hospedador son capaces de generar órganos/tejidos integrados en el hospedador, estructural y funcionalmente diferenciados, óptimamente tolerados por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos. Por lo tanto, al concebir la presente invención, se planteó la hipótesis de que el trasplante de órganos/tejidos pancreáticos humanos o animales fetales recogidos en una ventana temporal definida a un hospedador generará órganos/tejidos pancreáticos que presentan desarrollo significativo, de la siguiente manera.

#### **Materiales y métodos:**

**Tejidos pancreáticos donantes:** Se obtuvieron tejidos pancreáticos de estadio gestacional de 12 a 16 semanas humanos después de legrado, con tiempo de isquemia caliente de menos de 30 minutos. Después de la disección, los tejidos pancreáticos se mantuvieron a 4 grados centígrados en solución de UW durante menos de 45 minutos en condiciones estériles. El protocolo de estudio se aprobó por el comité de Helsinki del hospital (Kaplan Medical Center, Rehovot, Israel).

Se microdisecionaron tejidos pancreáticos animales en un estadio gestacional de 12 a 14 días de embriones de ratón bajo el microscopio óptico. Los tejidos se mantuvieron a 4 grados centígrados en solución de medio RPMI 1640 antes del trasplante.

**Procedimiento de trasplante:** se realizó el trasplante de órganos/tejidos pancreáticos humanos y animales en estadios tempranos del desarrollo gestacional 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 hospedador se expone a través de una incisión lateral izquierda, se realiza una incisión de 1,5 milímetros en el extremo caudal de la cápsula renal y se injertan tejidos pancreáticos donantes bajo la cápsula renal en fragmentos de [1-2] x [1-2] milímetros.

#### **Resultados experimentales:**

Se trasplantaron cuatro injertos derivados de órgano/tejido pancreático humano de estadio gestacional de 12 a 16 semanas bajo la cápsula renal en 4 ratones SCID y 4 normales. El tamaño de cada fragmento en el trasplante fue de 1-2 milímetros de diámetro. En todos los ratones inmunocompetentes se detectó rechazo que comenzaba a los 5 días después del trasplante como se determina por análisis histológico que indica necrosis del injerto y destrucción tisular. En todos los ratones inmunodeficientes, se observó aceptación del injerto, como se determina por el crecimiento del injerto y ausencia de señales de rechazo tras el examen histológico y macroscópico. En un injerto derivado de tejido pancreático humano de estadio gestacional de 12 semanas recogido a las 8 semanas después del trasplante, el tamaño del injerto había aumentado 10 veces (2 x 2 milímetros antes del trasplante a 8 x 5 milímetros en el momento de la recogida).

Se trasplantaron órganos/tejidos pancreáticos de estadio gestacional de 14, 13 y 12 días de ratón bajo la cápsula renal en ratones singénicos inmunodeficientes (Balb/c). En un injerto derivado de tejido de estadio gestacional de 12 días recogido 2 semanas después del trasplante, el tamaño del injerto había aumentado 10 veces (1 x 1 milímetro antes del trasplante a 5 x 3 milímetros después del trasplante).

**Conclusión:** los órganos/tejidos pancreáticos humanos o animales de estadio gestacional tardío trasplantados a hospedadores generan órganos/tejidos pancreáticos que presentan desarrollo significativo. Estos resultados anticipan por lo tanto el uso de injertos pancreáticos humanos de estadio gestacional de 14-20 semanas para el tratamiento de enfermedades que pueden beneficiarse del trasplante de estos (por ejemplo, diabetes).

**EJEMPLO 3****Generación de ratones diabéticos****5 Materiales y métodos:**

Se induce diabetes en ratones hospedadores por tratamiento con estreptozotocina, como se ha descrito previamente (Soria *et al.*, 2000. Diabetes 49, 1-6) o por aloxano (revisado en T. Szkudelski, 2001, Physiol. Res. 50: 536-546).

10 Brevemente, se induce diabetes en hospedadores de ratón mediante una única inyección intraperitoneal de 200 miligramos de estreptozotocina (Sigma) recién disuelta en tampón citrato (pH 4,5) por kilogramo de peso corporal. Después se confirma la aparición de diabetes y se controla por la presencia de pérdida de peso, poliuria, y niveles de glucosa en sangre de menos de 500 miligramos/dl. Se obtiene sangre para ensayos de glucosa por corte de la cola y se mide entre las 9 y las 11 de la mañana en condiciones sin ayunas y se analiza con un medidor de glucosa portátil. 15 Dos semanas después de la inyección de estreptozotocina, se injertan en receptores diabéticos tejidos pancreáticos donantes y se controlan los niveles de glucosa como se ha descrito anteriormente para determinar la restauración del control glucémico.

20 **Protocolo de aloxano:** para determinar la capacidad del injerto para regular la hiperglucemia del ratón, se inyectó a ratones NOD-SCID con injertos y sin injertos (páncreas embrionario E42 4 meses después del trasplante) por vía intravenosa Aloxano (Sigma-Aldrich 90 miligramos por kilogramo), que se sabe que destruye células beta de roedores, pero no humanas o porcinas (Eizirik D, *et al.* 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91: 9253). Se preparó aloxano disolviendo 30 miligramos de monohidrato de aloxano al 90 por ciento en 1 mililitro de solución de HCL 1 mM de NaCl 0,9 por ciento. La dosis para inyección IV es de 90 miligramos por kilogramo. Se midieron las concentraciones de glucosa por corte de la cola antes del tratamiento con aloxano, 4 días y 10 días después de la administración del aloxano y después una vez a la semana. 25

**EJEMPLO 4****30 Tratamiento de diabetes por trasplante de tejido pancreático humano o porcino de estadio gestacional temprano en receptores humanos diabéticos con o sin inmunosupresión mínima de los receptores.**

La diabetes es una enfermedad de enorme impacto médico y económico, sin embargo el tratamiento de esta enfermedad por la inyección diaria de insulina, la terapia convencional, no previene o alivia satisfactoriamente sus consecuencias debilitantes o letales. Un intento de superar esta limitación ha sido el tratamiento de la diabetes por el trasplante de islotes pancreáticos de donantes muertos adultos. Sin embargo, esta estrategia no puede practicarse de forma rutinaria debido a los números insuficientes de páncreas de donantes alogénicos inmunológicamente coincidentes de los que aislar los números suficientes de islotes requeridos. 35

40 Como se enseña en el documento U.S. 20030096016, los injertos derivados de órganos/tejidos renales humanos de estadio gestacional de 7 a 8 semanas, o injertos derivados de órganos/tejidos porcinos de estadio gestacional de 20 a 28 días trasplantados en hospedadores generan órganos/tejidos renales, estructural y funcionalmente diferenciados, de tipo de injerto óptimamente tolerado por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos.

45 Los ejemplos 5 y 6 en el presente documento se incorporan como ejemplos comparativos. El éxito de estos estudios se valoró basándose en los datos morfológicos, histológicos e inmunoquímicos. La presente invención muestra ahora por primera vez datos funcionales que apoyan el trasplante de tejido pancreático, esplénico y pulmonar fetal en un estadio gestacional posterior al previamente descrito.

**50 EJEMPLO de referencia 5****Trasplante de injertos de órganos/tejidos pancreáticos humanos de 8 semanas**

El trasplante de injertos de órganos/tejidos pancreáticos humanos de estadio gestacional de 8 semanas o porcinos de estadio gestacional de 27 a 28 días genera, en ausencia de teratomas derivados de injerto, órganos/tejidos pancreáticos productores de insulina que se tolerarán de forma óptima por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos. Este ejemplo se proporciona como un ejemplo comparativo. 55

El trasplante de órganos/tejidos pancreáticos de donantes alogénicos sigue siendo la opción terapéutica óptima en caso de insuficiencia pancreática. Sin embargo, el trasplante terapéutico de injertos de órganos/tejidos pancreáticos derivados de un donante alogénico es con frecuencia imposible de implementar debido a barreras de haplotipo coincidente. Además, incluso cuando se encuentra un donante coincidente, para evitar el rechazo del injerto dicho trasplante requiere la inmunosupresión del receptor del injerto permanente, habitualmente mediante la administración de fármacos inmunosupresores tóxicos tales como ciclosporina A. Dichos tratamientos inmunosupresores contribuyen a los inconvenientes del trasplante alogénico, ya que estos con frecuencia no tienen éxito en la prevención del rechazo de injertos a corto plazo, y son habitualmente incapaces de prevenir de forma 60 65

indefinida el rechazo de injertos. Una alternativa al trasplante de aloinjertos implica el trasplante de xenoinjertos, en particular injertos porcinos, que se consideran la alternativa animal óptima a los injertos humanos. Sin embargo, los xenoinjertos en general no pueden usarse para trasplante debido a la alta tolerancia subóptima de dichos injertos por linfocitos humanos. Por lo tanto, son altamente deseables órganos/tejidos pancreáticos adecuados para el trasplante terapéutico en seres humanos y tolerados por linfocitos humanos no singénicos, y fuentes adecuadas de dichos órganos/tejidos.

Una estrategia potente para proporcionar órganos/tejidos pancreáticos para el trasplante implica el uso de injertos fetales de dichos órganos/tejidos, ya que se ha demostrado que cuanto más temprano sea el estadio del desarrollo de un órgano/tejido, mejor se tolerará cuando se trasplante a un hospedador no singénico. Sin embargo, hasta la fecha, no se ha conseguido la generación de tejidos/órganos derivados de injertos de órganos/tejidos pancreáticos que presentan crecimiento y diferenciación satisfactorios en ausencia de teratomas derivados de injertos, y tolerancia inmunológica satisfactoria por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos, sin o con inmunosupresión mínima.

Se ha presentado la hipótesis de que existe un estadio de desarrollo fetal durante el que los órganos/tejidos pancreáticos están suficientemente diferenciados para comprometerse al desarrollo específico de páncreas en ausencia de teratomas derivados de injertos siendo al mismo tiempo suficientemente indiferenciados para tolerarse de forma óptima cuando se trasplantan a un hospedador no singénico. Mientras se reducía la presente invención a la práctica, se descubrió inesperadamente la existencia de estadios gestacionales específicos durante los que los órganos/tejidos pancreáticos humanos o porcinos pueden trasplantarse a un hospedador para generar, en ausencia de teratomas derivados de injertos, órganos/tejidos productores de insulina estructural y funcionalmente diferenciados que se tolerarán de forma óptima por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos, como se describe posteriormente.

#### **Materiales y métodos:**

**Recogida de órganos/tejidos pancreáticos de estadio gestacional humano:** Se obtuvieron órganos/tejidos pancreáticos de estadio gestacional humano para el trasplante mediante extracción de fragmentos de órganos/tejidos después de abortos voluntarios realizados de forma mecánica por aspiración en un estadio gestacional de 8 semanas, después de obtener el consentimiento informado. El tiempo de isquemia caliente de las muestras recogidas se mantuvo a menos de 30 minutos, y después de la disección, los precursores de órganos se mantuvieron a 40 grados centígrados en solución UW o PBS durante menos de 45 minutos en condiciones estériles. El protocolo de estudio se aprobó por el comité de Helsinki del hospital (Centro Médico Kaplan, Rehovot, Israel).

**Recogida de órganos/tejidos pancreáticos de estadio gestacional porcino:** Se obtuvieron órganos/tejidos pancreáticos de estadio gestacional porcino para el trasplante con la ayuda del Instituto Lahav para la investigación animal, Kibbutz Lahav. Los tejidos en desarrollo se recogieron en un estadio gestacional de 27-28 días de cerdas embarazadas operadas bajo anestesia general. El protocolo de estudio se aprobó por el Comité de Ética 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 de Balb/c x NOD/SCID o ratones NOD/SCID bajo anestesia general inducida por inyección intraperitoneal de Avertina 2,5 por ciento en PBS (10 mililitros por kilogramo). Para el trasplante bajo la cápsula renal, el riñón del hospedador se expuso mediante una incisión lateral izquierda. Se realizó una incisión de 1,5 mm en el extremo caudal de la cápsula renal, y se implantaron fragmentos de 1-2 milímetros de diámetro de tejido pancreático de estadio gestacional bajo la cápsula renal.

**Análisis histológico:** se usó el clon de anticuerpo anti citoqueratina MNF 116 (no reactivo de forma cruzada con tejidos de ratón) para inmunotear el epitelio porcino; y se obtuvo el clon de anticuerpo anti insulina y el anticuerpo anti vimentina humana clon V9 (no reactivo de forma cruzada con tejidos de ratón; usado para teñir células mesenquimales humanas) de DAKO. Los tejidos se fijaron por incubación durante una noche en paraformaldehído al 4 por ciento en PBS, los tejidos fijados se procesaron mediante alcoholes graduados, mediante xilenos y se incluyeron en parafina. Se cortaron secciones de cuatro micrómetros de grosor de tejidos incluidos y se montaron en portaobjetos de vidrio con carga positiva. Las secciones tisulares montadas en portaobjetos se desparafinizaron en xilenos después de la rehidratación en alcoholes graduados. Se inactivó la peroxidasa endógena en peróxido de hidrógeno al 0,6 por ciento en metanol al 70 por ciento durante 20 minutos. Se aplicó recuperación de antígenos por hervido en microondas o pretratamiento con proteasa cuando fue necesario. Para la inmunotinción, los portaobjetos se incubaron en una cámara humidificada durante 60 minutos con anticuerpo primario, después de la aplicación del sistema DAKO Envision TM+, peroxidasa de rábano rusticano (HRP). Se usaron los reactivos diaminobencidina (DAB) o aminoetilcarbasol (AEC) como cromógenos. Los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina y se montaron.

**Resultados experimentales:*****El trasplante de xenoinjerto pancreático de estadio gestacional de 27 a 28 días porcino preñe y presenta***

***diferenciación pancreática funcional y estructural:*** los injertos derivados de páncreas porcino de estadio gestacional de 27 a 28 días trasplantados bajo la cápsula renal de ratones NOD/SCID presentaron claramente diferenciación estructural y funcional específica de páncreas, 6 semanas después del trasplante. Los injertos derivados de hígado porcino de estadio gestacional de 28 días trasplantados en bazos de dichos ratones que se examinaron 5 semanas después del trasplante presentaron crecimiento pancreático significativo. La diferenciación estructural pancreática fue claramente evidente 6 semanas después del trasplante por un injerto derivado de tejido pancreático porcino de estadio gestacional de 27 días como se determinó mediante secciones tisulares de injerto teñidas con H y E que mostraron diferenciación de las estructuras lobulares pancreáticas con estructuras pancreáticas ductales y acinares. La diferenciación funcional pancreática también fue evidente a las 6 semanas después del trasplante en secciones tisulares de un injerto derivado de un tejido de estadio gestacional de 27 días en forma de síntesis peptídica pancreática y de insulina. La inmunotinción de un injerto derivado de tejido pancreático porcino de estadio gestacional de 28 días con anticuerpo anti citoqueratina claramente mostró la diferenciación de epitelios ductales pancreáticos derivados de injertos.

***Los aloinjertos pancreáticos de estadio gestacional de 8 semanas humanos preñen y presentan diferenciación pancreática funcional y estructural:***

los injertos derivados de tejido pancreático humano de estadio gestacional de 8 semanas bajo la cápsula renal de ratones NOD/SCID que portan linfocitos humanos alorreactivos presentaron claramente diferenciación estructural y funcional específica de páncreas, 6 semanas después del trasplante. La funcionalidad pancreática del injerto se demostró de forma convincente por la diferenciación de células beta positivas para insulina dentro de islotes pancreáticos. Además, los injertos derivados de tejido pancreático humano de estadio gestacional de 8 semanas trasplantados bajo la cápsula renal de quimeras Balb/c x NOD/SCID que portaban PBMC humanas alorreactivas también presentaron claramente diferenciación estructural y funcional específica de páncreas, como se muestra mediante diferenciación de células mesenquimales humanas positivas para vimentina.

***Conclusión:*** los resultados anteriormente descritos demuestran que los injertos derivados de tejido pancreático humano de estadio gestacional de 8 semanas o porcino de estadio gestacional de 27 a 28 días son capaces de generar, en ausencia de teratomas derivados de injertos, órganos/tejidos pancreáticos productores de insulina estructura y funcionalmente diferenciados que se tolerarán de forma óptima por linfocitos humanos alorreactivos/xenorreactivos. Sin embargo, como resulta evidente a partir de los resultados anteriores, el injerto de órgano/tejido pancreático fetal recogido de un donante porcino en un estadio posterior, es decir por encima de E35, y preferentemente de aproximadamente E42 a aproximadamente E56, proporciona injertos superiores que presentan características funcionales y duraderas en comparación con injertos recogidos en E28.

**EJEMPLO 6*****Identificación de estadios gestacionales de injertos de órganos/tejidos pancreáticos porcinos funcionales con capacidad de desarrollo específico de órgano significativo sin riesgo o con riesgo mínimo de formación de teratomas***

Existe la necesidad urgente de fuentes de injertos adecuadas para trasplante terapéutico para el tratamiento de enfermedades que implican la insuficiencia de órganos/tejidos tales como el hígado, corazón, páncreas o pulmón. De forma óptima, dichos injertos tendrían la capacidad de presentar el desarrollo adecuado en dichos tipos de órganos/tejidos teniendo a la vez mínimo potencial para inmunogenicidad que dé como resultado rechazo de trasplantes después del trasplante a un hospedador. Además, el tejido injertado debería realizar las funciones necesarias para el tejido particular. Un enfoque que se ha promovido durante más de dos décadas implica el uso de injertos fetales porcinos en estadios gestacionales suficientemente avanzados para permitir el desarrollo específico de órgano óptimo/adecuado, y suficientemente tempranos para evitar/minimizar el riesgo de la formación de teratomas, tal como se ha descrito anteriormente y en la bibliografía (Dekel B. *et al.*, 2003. Nat Med 9:53-60) con respecto a injertos renales de estadio gestacional porcino. Se apreciará, sin embargo, que diferentes tipos de órganos/tejidos se diferencian en general en estadios gestacionales diferentes, que los órganos/tejidos en estadios gestacionales crecientes tendrán en general una capacidad decreciente para inducir la formación de teratomas en virtud de su inclusión general de números decrecientes de células pluripotenciales. Se apreciará además que los tipos de órganos/tejidos específicos pueden estar compuestos de distintas combinaciones de subtipos tisulares, por ejemplo incluyendo tejidos del estroma, que pueden estar en diferentes estadios, de diferenciación entre sí dentro del mismo tipo de órgano/tejido. Por lo tanto, se apreciará que los estadios gestacionales durante los que los diferentes tipos de órganos/tejidos son suficientemente avanzados para tener la capacidad para presentar desarrollo específico de órganos óptimo/adecuado, y estadios gestacionales durante los que dichos tipos de órganos/tejidos son suficientemente diferenciados para evitar/minimizar el riesgo de la formación de teratomas y mostrar inmunorreactividad reducida variarán de forma independiente e impredecible entre diferentes tipos de órganos/tejidos. Por lo tanto, un inconveniente primario e importante para los enfoques de la técnica anterior es que estos no pueden predecir si existe siquiera para los tejidos/órganos fetales estadios gestacionales que sean suficientemente avanzados para que los injertos de los mismos tengan la capacidad de presentar desarrollo

específico de órgano óptimo/adecuado sin riesgo o con riesgo mínimo de formación de teratomas después de trasplante de los mismos a un hospedador. Además, incluso si dichos estadios gestacionales de dichos órganos/tejidos de hecho existen, un inconveniente adicional de la técnica anterior es que se desconoce cuál podría ser el tiempo de dichos estadios gestacionales.

5 Mientras se reducía la presente invención a la práctica, como se describe posteriormente, los presentes inventores han realizado experimentos de ensayo y error que por primera vez demuestran inesperadamente que de hecho existe, y por primera vez proporcionan datos que sirven para definir, el momento de los estadios gestacionales durante los que los injertos de órganos/tejidos pancreáticos, esplénicos y pulmonares tienen específicamente la capacidad de diferenciarse en órganos/tejidos desarrollados de forma óptima/adecuada de dichos tipos sin riesgo o con riesgo mínimo de formación de teratomas después del trasplante, induciendo a la vez mínima respuesta inmunitaria del hospedador. Como tales, los datos experimentales proporcionados a continuación permiten métodos de trasplante terapéuticos, que superan con creces las limitaciones críticas de la técnica.

#### 15 **Materiales y métodos:**

**Animales:** lo animales se mantuvieron en condiciones aprobadas por el Comité de Cuidado y Uso Animal Institucional en el Instituto Weizmann. Se usaron ratones NOD/SCID inmunodeficientes a la edad de 8-10 semanas (Centro de Cría Animal del Instituto Weizmann, Rehovot, Israel) como hospedadores para los estudios de trasplante. Todos los ratones se mantuvieron en jaulas pequeñas (hasta 5 animales en cada jaula) y se les alimentó con comida estéril y agua ácida que contenía ciprofloxacina (20 miligramos por mililitro).

**Tejidos fetales porcinos:** se obtuvieron precursores de páncreas, bazo y pulmón porcinos del Instituto Lahav. Las cerdas embarazadas se operaron en estadios precisos del embarazo (E21, E24, E28, E42, E56, E80 y E100) bajo anestesia general. Las cerdas se fertilizaron por inseminación artificial. El momento de gestación se define como el tiempo transcurrido desde la fertilización. El día de la inseminación se designa como E0. E1 comienza al final de E0. El protocolo de estudio se aprobó por ambos comités de ética en Kibbutz Lahav y el Instituto Weizmann. El tiempo de isquemia caliente fue menor de 10 minutos y los embriones se transfirieron en PBS frío. Se extrajeron tejidos para trasplante bajo el estereoscopio y se mantuvieron en condiciones estériles a 40 grados centígrados en RPMI 1640 (Biological Industries, Beit HaEmek, Israel) antes del trasplante. El tiempo de isquemia fría antes del trasplante fue de aproximadamente 2 horas.

**Trasplante subcapsular de riñón:** se realizó trasplante de precursores de tejido embrionario porcino y de ratón con anestesia general (Avertin 2,5 por ciento en PBS, 10 miligramos por kilogramo por vía intraperitoneal). Se expuso el riñón del hospedador a través de una incisión lateral izquierda. Se realizó una incisión de 1,5 mm en el extremo caudal de la cápsula renal y se injertaron precursores del donante bajo la cápsula renal en fragmentos de 1-2 milímetros de diámetro.

**Análisis de crecimiento del trasplante:** los animales que recibieron implantes se sacrificaron a las 6-8 semanas de edad después del trasplante. Los órganos que portaban los injertos trasplantados se retiraron después y se fijaron en paraformaldehído al 10 por ciento o se mantuvieron congelados. Los injertos fijados en paraformaldehído se deshidrataron, se incluyeron en parafina y se seccionaron secuencialmente y se montaron en portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina y se tiñeron secciones por hematoxilina-eosina (H+E).

Los ejes largo (L) y corto (W) de los injertos se midieron y se calculó la relación tamaño post/pretrasplante multiplicando L x W, tanto para el original (pretrasplante) como para el injerto en el momento del sacrificio.

**Análisis de diferenciación de trasplantes:** la tinción inmunohistoquímica para marcadores pancreáticos porcinos incluía insulina, glucagones, polipéptido pancreático, cromogranina, citoqueratina pancreática específica (CK116) y vimentina (V9). Se tiñeron injertos de pulmón con citoqueratina porcina y vimentina. Se tiñeron injertos de bazo con Factor VIII porcino.

**Análisis de respuesta funcional:** se tomaron muestras de sangre en serie a las 2, 4, 6 y 8 semanas después del trasplante del plexo retroorbital. Se separó el suero y se mantuvo congelado para ELISA de albúmina e insulina porcina.

#### **Protocolos de inmunosupresión:**

Se trasplantó páncreas porcino fetal de edad de gestación E42 en ratones NOD-SCID o C57BL/6 inmunocompetentes con diferentes regímenes de inmunosupresión. Los regímenes exitosos fueron:

1. Rapamicina a 1,5 miligramos por kilogramo administrada por vía subcutánea diariamente desde el día 0 + 200 microgramos de CTLA4-Ig por ratón proporcionado IP los días 0, 2, 4, 6 después del trasplante.
2. Rapamicina a 2,5 miligramos por kilogramo los días 0-4 y después 1,5 miligramos por kilogramo diariamente, administrada por vía subcutánea + 200 microgramos de CTLA4-Ig por ratón administrados por vía intraperitoneal los días 0, 2, 4, 6 después del trasplante.

3. Rapamicina a 1,5 miligramos por kilogramo administrada por vía subcutánea diariamente desde el día 0 + 200 microgramos de CTLA4-Ig por ratón y 250 microgramos de ligando anti CD40 por ratón administrado por vía intraperitoneal los días 0, 2, 4, 6 después del trasplante.

5 4. Rapamicina a 1,5 miligramos por kilogramo administrada por vía subcutánea diariamente comenzando el día 0 durante 2 semanas + 200 microgramos de CTLA4-Ig por ratón y 250 microgramos de ligando anti CD40 por ratón administrado por vía intraperitoneal los días 0, 2, 4, 6 después del trasplante.

5. Rapamicina a 1,5 miligramos por kilogramo administrada por vía subcutánea diariamente desde el día 0 + 200 microgramos de CTLA4-Ig por ratón administrado por vía intraperitoneal los días 0, 2, 4, 6 después del trasplante + 0,2 miligramos de COP1 por ratón administrado por vía subcutánea diariamente desde el día -7.

10

**Resultados experimentales:**

**Identificación de estadios gestacionales de injertos pancreáticos, esplénicos y pulmonares porcinos con capacidad de diferenciación específica de órgano óptima:** el potencial de inducir teratomas, a diferencia del desarrollo tisular completamente comprometido, se definió en diferentes precursores tisulares en diferentes puntos temporales del desarrollo embrionario porcino, mediante implantación en ratones SCID.

15

La implantación de tejido precursor de pulmón, similar a la implantación de páncreas de estadio gestacional de 24 días, no se asoció con teratomas. Sin embargo, este resultado probablemente refleje causas completamente diferentes como puede deducirse a partir del potencial de crecimiento de los dos tejidos. Mientras que los injertos tisulares pancreáticos están asociados tan pronto como el día 24 de gestación con notable crecimiento y desarrollo en ausencia de la formación de teratomas, la implantación de tejido embrionario pulmonar no muestra potencial de crecimiento apreciable antes de o en el día 42 de gestación. En este momento de gestación relativamente tardío la presencia de células madre embrionarias pluripotenciales podría reducirse en la mayoría de los tejidos embrionarios. Sorprendentemente, no obstante, se generaron órganos completamente funcionales.

20

25

**Identificación de estadios gestacionales de injertos pancreáticos, pulmonares y esplénicos porcinos que permiten el desarrollo específico de órgano óptimo sin riesgo/con riesgo mínimo de formación de teratomas después del trasplante:**

30

Después del establecimiento de los puntos temporales gestacionales más tempranos en los que los injertos no presentan o presentan mínimo riesgo de teratoma, se realizan experimentos de trasplante para identificar estadios gestacionales de injertos pancreáticos, pulmonares y esplénicos porcinos de estadio gestacional para el desarrollo de dichos órganos/tejidos.

35

**Injertos de órganos/tejidos pancreáticos:**

La Tabla 1 muestra el desarrollo de injertos de órganos/tejidos pancreáticos, basándose en el análisis histológico de tejido trasplantado. Los tejidos precursores de páncreas embrionarios, obtenidos a diferentes edades gestacionales, se implantaron bajo la cápsula renal. Se evaluó el crecimiento y desarrollo tisular 6 semanas después de la implantación.

40

Se identificaron los estadios gestacionales de injertos de órganos/tejidos pancreáticos porcinos capaces de generar tejidos pancreáticos crecientes, estructural y funcionalmente diferenciados, secretores de insulina, en ausencia de formación de teratomas después del trasplante. Ninguno de los ratones implantados mostró crecimiento de teratomas. El análisis histológico de tejido precursor pancreático porcino embrionario creciente reveló que el desarrollo del páncreas después de la implantación de todos los estadios está libre de riesgo de teratoma y presenta crecimiento y desarrollo notables, como se ejemplifica por la presencia de componentes exocrinos y endocrinos completamente desarrollados del páncreas. En E42 los componentes pancreáticos están teñidos de forma positiva para citoqueratina 20, que caracteriza el epitelio pancreático, y el origen donante del epitelio pancreático se demuestra por tinción selectiva para citoqueratina MNF116, que no es reactiva de forma cruzada con células epiteliales de ratón. Las Figuras 1a-f muestran tinción inmunohistológica de un injerto de páncreas porcino E42 6 semanas después del trasplante. Tinción con H y E (Figura 1a), citoqueratina 20 (Figura 1b), vimentina (v9) (Figura 1c), CD31 anti ratón (Figura 1d), insulina (Figura 1e), Ki67 (Figura 1f).

45

50

55

**Tabla 1. Desarrollo de teratoma frente a crecimiento de órgano específico después del trasplante de páncreas porcino fetal.**

Edad gestacional de los precursores de páncreas porcino	Hallazgos histológicos		
	Conductos y acinos	Islotes	Estructuras de tipo teratoma
E-24	6/10	4/10	0/10
E-28	7/12	6/12	0/12
E-42	14/15	12/15	0/15

E-56	9/13	11/13	0/13
E-80	8/10	7/10	0/10
E-100	2/7	2/7	0/7

El injerto porcino fetal trasplantado, recogido en aproximadamente E42 a aproximadamente E56 permanece funcional durante periodos prolongados de tiempo, como se ve en las Figuras 2a-e. Se muestra un injerto de órgano/tejido pancreático fetal E56 tres meses después del trasplante. El injerto se vasculariza (Figura 2a), se tiñe positivo para H y E (Figura 2b) y permanece positivo para la insulina (Figura 2c), polipéptido pancreático (Figura 2d) y Ki67 (Figura 2e). La funcionalidad de los islotes está documentada por tinción positiva con respecto a insulina porcina, glucagón y polipéptido pancreático. De forma similar a la organización de islotes maduros, la mayoría de las células dentro de los islotes de los injertos secretan insulina, mientras que se detecta secreción de glucagón solamente en la periferia de los islotes. El origen neuroendocrino de las células de islotes está apoyado por la tinción positiva con respecto a cromogranina.

Sorprendentemente, cuando se llevaron a cabo ensayos de funcionalidad, los injertos fetales de estadios posteriores rindieron mucho mejor.

La Tabla 2 muestra el tamaño del injerto y los niveles en suero de insulina porcina después del trasplante de páncreas embrionario porcino de diferentes edades gestacionales, 6 semanas después del trasplante.

El análisis de tejido precursor pancreático obtenido en diferentes puntos temporales gestacionales reveló que la secreción de insulina es óptima tras el trasplante de precursores embrionarios pancreáticos de estadio gestacional de 28 a 56 días en relación con tejidos obtenidos el día 80 de la gestación que mostraron una capacidad notablemente reducida para secretar insulina.

**Tabla 2. Crecimiento óptico y diferenciación funcional (secreción de insulina) de órganos pancreáticos derivados de xenoinjertos pancreáticos porcinos E28-E56**

	Estadio gestacional de los injertos*					
	E24 (n = 6)	E28 (n = 7)	E42 (n = 14)	E56 (n = 14)	E80 (n = 10)	E100 (n = 5)
Tamaño del injerto (mm <sup>2</sup> ± DT)	11,3 ± 8,6	15,7 ± 11,2	33,7 ± 15,5	29,3 ± 13,2	7,8 ± 8,8	0,2 ± 0,07
Insulina porcina (mUI/ml ± DT)	2 ± 1,5	4,2 ± 3,3	5,1 ± 4	5,9 ± 7,1	1,2 ± 1,4	0,6 ± 0,7

Para evaluar *in vivo* la funcionalidad de injertos de órganos/tejidos pancreáticos, se controló la secreción de insulina porcina en el suero de ratones trasplantados mediante ELISA. Se detectaron niveles fisiológicos de secreción de insulina porcina después del trasplante de injertos de órganos/tejidos pancreáticos implantados en diferentes estadios gestacionales.

\*número de injertos mostrados entre paréntesis

La capacidad de los injertos para secretar insulina al suero de ratones receptores NOD-SCID se siguió de ELISA específico, en el que el anticuerpo anti insulina porcino primario no reacciona de forma cruzada con insulina de ratón. En la Figura 3 se muestra un sumario de los niveles de insulina porcina 6 semanas después del trasplante detectados en ratones con injertos de órganos/tejidos pancreáticos porcinos obtenidos en edades gestacionales diferentes. Adicionalmente, antes de la implantación se descubrió que estos precursores de tejido embrionario estaban sustancialmente vascularizados como se indica por tinción con anticuerpo anti CD31. Las Figuras 4a-d muestran que las células endoteliales porcinas (que revisten los vasos sanguíneos) marcadas por tinción positiva para CD-31 (oscuro y flecha) se demuestran en páncreas embrionario de diversas edades gestacionales. Las Figuras 4a-d representan los estadios gestacionales E24, E27, E35 y E42, respectivamente.

Los resultados anteriores demuestran que un injerto porcino fetal a más de E28 pero menos de E80, preferentemente E42 a aproximadamente E56, genera un páncreas vascularizado por el hospedador, funcional. Tanto el tamaño del injerto como los niveles de secreción de insulina son mayores en los injertos de los embriones E42-E56 que de los embriones E24-E28.

La Tabla 3 muestra los resultados de un ensayo de exposición a glucosa en ratones NOD-SCID con trasplante de tejido de páncreas fetal. T-cero (T0) se refiere al día de trasplante mientras que T30 se refiere a 30 días después del trasplante. La edad gestacional se refiere a la edad a la que se recogió el injerto porcino fetal. La Figura 5 muestra el seguimiento a largo plazo de los niveles de insulina porcina detectados en el suero de ratones NOD-SCID. Las Figuras 5a-d representan niveles de insulina porcina secretados de tejidos pancreáticos de estadio gestacional E28,

E35, E42 y E56.

5 La Figura 6 muestra la normalización de los niveles de glucosa en ratones NOD-SCID con trasplante de injertos de páncreas porcino fetal E42, después del tratamiento con aloxano (véase Ejemplo 3 anteriormente en el presente documento). El aloxano destruye selectivamente el páncreas de ratón y deja el páncreas porcino trasplantado intacto. Este experimento muestra inequívocamente la supervivencia y funcionalidad del tejido pancreático trasplantado.

**Tabla 3. Niveles de glucosa e insulina en ratones con trasplante de páncreas fetal porcino**

Edad gestacional	T0		T30	
	Glucosa mg/dl (media ± dt)	Insulina mUI/ml (media ± dt)	Glucosa mg/dl (media ± dt)	Insulina mUI/ml (media ± dt)
E24	72 ± 7	0,85 ± 0,7	537 ± 47	2,1 ± 2,9
E42	61 ± 10	2,8 ± 2,9	429 ± 148	9 ± 5,9*
E56	67 ± 25	1,7 ± 3,4	442 ± 112	12,6 ± 8,7**
E80	57 ± 11	0,9 ± 3,5	478 ± 75	1,9 ± 3,4***
E100	53 ± 7	0,09 ± 0,02	387 ± 53	0,02 ± 0,05

\*p<0,002  
\*\*p<0,0001  
\*\*\*p<0,02

10 Aislamiento y transferencia de PBMC humanas. Se generaron PBMC humanas a partir de capas leucocíticas obtenidas de voluntarios normales, se extendieron sobre solución de Ficoll-Paque y se centrifugaron a 2000 rpm durante 20 minutos. La capa de interfaz se recogió, se lavó dos veces, se contó y se resuspendió a la concentración celular deseada. Se inyectaron 80 células humanas por vía intraperitoneal, 1-3 días después del trasplante de los precursores pancreáticos humanos o de cerdo en ratones NOD-SCID. Los ratones de control no recibieron PBMC humanas.

15 La respuesta inmunogénica de injertos fetales porcinos se determinó a partir de ratones con trasplante de injertos de páncreas porcino fetal recogidos de diferentes edades gestacionales. La Tabla 4 muestra los resultados histológicos que caracterizan los trasplantes de páncreas después de la infusión de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) en los ratones SCID inmunodeficientes hospedadores.

20 El grado semicuantitativo revela aumento de la infiltración celular y fibrosis con cantidades decrecientes de componentes pancreáticos a medida que aumenta la edad gestacional de los injertos (E56 a E100), alcanzando una diferencia estadística cuando se compara la infiltración celular en los injertos de E42 frente a E80 y E100 (p < 0,03). Además, 6 semanas después del trasplante, aparece destrucción completa y fibrosis en injertos obtenidos a E80 o E100 en comparación con precursores pancreáticos trasplantados más tempranos. Sin embargo, en injertos E42 y E56 aún se detecta tejido pancreático, a pesar de la presencia de PBMC humanas (teñidas con respecto a anti CD45 humano).

**Tabla 4. Hallazgos histológicos que caracterizan trasplantes pancreáticos de cerdo que permiten la infusión de PBMC humanas en ratones NOD-SCID.\***

Estadio gestacional	Sin PBMC Humanas				Con PBMC Humanas			
	Islotes	Conductos/acinos	Infiltrado celular	Fibrosis	Islotes	Conductos/acinos	Infiltrado celular	Fibrosis
E24	0,75 ± 0,5	0,75 ± 0,5	0,5 ± 0,6	0,5 ± 0,5	0,3 ± 0,5	0,6 ± 0,6	1,3 ± 0,6	1,3 ± 0,6
E28	1,6 ± 0,6	1,6 ± 0,6	0,7 ± 0,6	1 ± 1	0,3 ± 0,6	1,3 ± 0,6	1,3 ± 0,6	1,7 ± 0,6
E42	2,8 ± 0,4	2,6 ± 0,5	0,8 ± 0,8	1,2 ± 0,4	1,8 ± 0,8	1,8 ± 0,8	2 ± 0,7	1,6 ± 0,5
E56	2,75 ± 0,5	2,75 ± 0,5	0,25 ± 0,5	0,75 ± 0,5	1,4 ± 0,5	1,75 ± 0,5	2,5 ± 0,4	2,12 ± 0,2

E80	1,3 ± 0,6	1,7 ± 0,6	0,7 ± 0,6	1,7 ± 0,6	0,7 ± 0,6	1,5 ± 0,5	3 ± 0	2,3 ± 0,3
E100	0,8 ± 0,5	0,3 ± 0,6	0,3 ± 0,5	3 ± 0	0,3 ± 0,6	0,3 ± 0,6	3 ± 0	2,3 ± 0,6

\*Grado semicuantitativo para diversos componentes histológicos:  
 Islotes- 1+, 1 islote; 2+, 2-4; 3+, >4 islotes por HPF.  
 Conductos y acinos- 1+, 1-2; 2+, 2-5; 3+, >5 conductos/acinos por HPF.  
 Infiltración celular (células positivas para CD45 humano)- 0-1+, infiltrado escaso; 2+, infiltrado denso focal; 3+, infiltrado denso difuso.  
 Clasificación de fibrosis: 1+, tejido conectivo suelto; 2+, distribución focal de fibrosis densa; 3+, fibrosis distribuida densa.

5 Las Figuras 7a-d muestran el nivel de rechazo de tejido de tejidos pancreáticos embrionarios porcinos (E56 y E80) mediado por PBMC humanas, 6 semanas después del trasplante bajo la cápsula renal en ratones NOD-SCID. La Figura 7a muestra tinción de H y E de tejido pancreático de cerdo E56. PBMC humanas (flechas) se infiltran focalmente en el tejido, aunque pueden detectarse otros componentes del páncreas tales como acinos (cabeza de flecha) o islotes (asterisco). La Figura 7b muestra la infiltración focal de PBMC humanas en el injerto E56 teñidas con respecto a anti CD45 humano. La Figura 7c muestra tinción de H y E de un injerto de órgano/tejido pancreático E80. El injerto experimenta destrucción tisular, fibrosis y hemorragias focales con mínimos restos del tejido pancreático. La Figura 7d muestra PBMC humanas teñidas con anticuerpo anti CD45 humano que invaden el injerto de órgano/tejido pancreático E80.

15 Las Figuras 8a-c muestran el tejido pancreático recogido de un donante porcino fetal de edad gestacional E42. La Figura 8a muestra el tejido en un ratón NOD-SCID, mientras que la Figura 8b muestra el tejido en un ratón C57BL/6 inmunocompetente. La Figura 8c muestra el tejido en un ratón tratado con el siguiente régimen inmunosupresor: rapamicina administrada por vía subcutánea a 1,5 miligramos por kilogramo diariamente desde el día 0 + 200 microgramos de CTLA4-Ig por ratón (es decir 8 miligramos por kilogramo) y 250 microgramos de anticuerpo anti ligando CD40 por ratón (es decir 10 miligramos por kilogramo) administrado por vía intraperitoneal los días 0, 2, 4, 6 después del trasplante. El régimen inmunosupresor permite la supervivencia del tejido porcino y supera cualquier problema de rechazo inmunitario. Este protocolo corresponde al régimen de inmunosupresión número 3 descrito en la sección de Materiales y Métodos, anterior.

**EJEMPLO de referencia 7**

25 **Identificación de estadios gestacionales de injertos pulmonares porcinos funcionales con capacidad de desarrollo específico de órgano significativo sin riesgo/con riesgo mínimo de formación de teratomas**

30 Para detalles de Material y Métodos, véase el Ejemplo 6, anterior. Identificación de estadios gestacionales durante los que los injertos pulmonares porcinos son capaces de generar, sin riesgo/con riesgo mínimo de formación de teratomas, tejidos pulmonares alveolares normalmente diferenciados, crecientes, después del trasplante en receptores xenogénicos: a diferencia de la implantación de tejido embrionario de riñón, hígado, páncreas o corazón, la implantación de injertos de tejido pulmonar porcino a los 24, 28 o incluso 42 días de gestación, no condujo a crecimiento significativo. Solamente se detectó crecimiento y diferenciación de tejido pulmonar después de la implantación de tejido precursor en el estadio gestacional relativamente tardío de 56 días. Después de la implantación subcapsular de tejido pulmonar en un estadio gestacional de 24, 28 o 42 días, no se detectó formación de teratomas y solamente se encontraron algunas células epiteliales y fibrosas 6 semanas después del trasplante. Sin embargo, como puede verse en las Figuras 9a-d, los injertos precursores de pulmón de estadio gestacional de 56 días presentaron un crecimiento impresionante (Figura 9a), y se desarrollaron a tejido pulmonar maduro que contenía todos los elementos del sistema respiratorio incluyendo bronquios respiratorios, bronquiolos y alvéolos (Figura 9b, flecha, asteriscos, cabezas de flecha, respectivamente) y cartílago (tinción azul intensa por azul alciano Figura 9c). Se detectaron tipos apropiados de células epiteliales para tejido pulmonar que revestían las diferentes estructuras pulmonares. Resulta importante que, como se puede ver en la Figura 9d, los alvéolos generados a partir de los injertos de estadio gestacional de 56 días mostraron septos interalveolares finos que comprendían plexos capilares dentro, soportados por cantidades mínimas de tejido conectivo fino, que cumplían el requisito de equilibrio de perfusión-ventilación fino para permitir el intercambio de gas extrauterino. Aunque los injertos de pulmón porcino del estadio gestacional de 80 días también se desarrollaron a tejido pulmonar, los tejidos desarrollados eran significativamente más pequeños que los derivados de injertos de estadio gestacional de 56 días (p < 0,001). Además del potencial de crecimiento subóptimo, resultarán evidentes hallazgos microscópicos anómalos incluyendo el engrosamiento de la pared alveolar y la displasia epitelial. Las diferencias en la estructura y grosor de la pared alveolar de tejidos pulmonares generados por implantes de estadio gestacional de 56 y 80 días pueden verse fácilmente en las Figuras 4d-e, respectivamente, después de la tinción de H y E.

**Análisis:** por lo tanto, es difícil saber si el fallo del injerto de tejidos porcinos fetales presentados en estudios de animales grandes o en seres humanos, está mediado solamente por el rechazo o podría también atribuirse a una

elección de tejido embrionario con potencial de crecimiento débil recogido en un tiempo de gestación subóptimo. Este problema se ilustra claramente por los presentes datos que muestran que el estadio gestacional óptimo para implantación de injerto de órgano/tejido pancreático es entre los días 28 a 56 de gestación, mientras que el potencial de crecimiento y la capacidad de secreción de insulina se reduce significativamente tras la implantación de tejido  
 5 obtenido más allá del día 80 de gestación, momento en el cual se llevan a cabo la mayoría de los trasplantes en seres humanos (Reinholt FP. *et al.*, 1998. Xenotransplantation 5: 222-5; Groth CG. *et al.*, 1998. Transplantation Proceedings 30: 3809-10).

Aunque el establecimiento del umbral de estadio gestacional superior sobre el que es poco probable que se desarrollen teratomas después del trasplante de injerto podía conseguirse para todos los tipos de órganos/tejidos  
 10 ensayados, la definición del umbral de estadio gestacional inferior por debajo del que el crecimiento potencial es subóptimo representó un reto más difícil para los tipos de órganos, tales como pulmón, cuyo rendimiento funcional no podía establecerse por la secreción de una proteína a la sangre, como sucede con el páncreas o el bazo.

A diferencia de la ventana de tiempo de estadio gestacional identificada para injertos pancreáticos, los estadios  
 15 gestacionales tempranos no eran favorables para el desarrollo de injertos pulmonares de estadio gestacional. Por lo tanto, no se observó desarrollo de injertos pulmonares de estadio gestacional E28 a E42, mientras que se formaron pulmones de crecimiento rápido y diferenciados que contenían esencialmente todos los componentes del árbol respiratorio adulto, incluyendo alvéolos maduros, después de la implantación de injertos pulmonares de estadio  
 20 gestacional E56 o E80. En un estadio gestacional de 80 días, sin embargo, se descubrió inesperadamente que los injertos pulmonares de estadio gestacional eran subóptimos ya que estos mostraban tanto potencial de crecimiento reducido como desarrollo de tejido pulmonar subóptimo caracterizados por engrosamiento de la pared alveolar y displasia epitelial.

**Conclusión:** los datos descritos en el presente documento demuestran inesperadamente por primera vez que existe  
 25 para cada órgano/tejido pancreático o pulmonar de estadio gestacional porcino, estadios gestacionales durante los que los injertos de dichos órganos/tejidos tienen la capacidad de generar, sin riesgo/con riesgo mínimo de formación de teratomas y respuesta inmunitaria del hospedador mínima, tejidos específicos de órganos crecientes, estructural y funcionalmente diferenciados después del trasplante. Los datos desvelados en el presente documento demuestran  
 30 además inesperadamente por primera vez que los órganos/tejidos de dichos estadios gestacionales tienen cada uno distintos estadios gestacionales durante los que estos tienen la capacidad de generar, sin riesgo/con riesgo mínimo de formación de teratomas, tejidos específicos de órgano crecientes, estructural y funcionalmente diferenciados después del trasplante. Por lo tanto, los datos desvelados en el presente documento tienen éxito inesperado en la  
 35 caracterización por primera vez, para cada uno de dichos órganos/tejidos, los estadios gestacionales de los injertos durante los que estos tienen la capacidad para generar, sin riesgo/con riesgo mínimo de formación de teratomas, tejidos específicos de órganos crecientes, estructural y funcionalmente diferenciados después del trasplante. En particular, los datos desvelados en el presente documento demuestran inesperadamente por primera vez que los  
 40 injertos de órganos/tejidos pancreáticos porcinos en estadios gestacionales que varían de aproximadamente el día 24 a aproximadamente el día 80 tienen la capacidad de generar, sin riesgo/con riesgo mínimo de formación de teratomas, tejidos pancreáticos secretores de insulina crecientes, estructural y funcionalmente diferenciados, después del trasplante, teniendo los de estadios gestacionales que varían de aproximadamente el día 28 a aproximadamente el día 56 la capacidad de generar tejidos pancreáticos secretores de insulina óptimamente  
 45 crecientes y estructural y funcionalmente diferenciados.

Además, los datos desvelados en el presente documento demuestran inesperadamente por primera vez que injertos  
 45 esplénicos porcinos en estadios gestacionales que varían de aproximadamente el día 24 a aproximadamente el día 80 teniendo los estadios gestacionales que varían de aproximadamente día 42 a aproximadamente el día 56 la capacidad de generar sin riesgo/con riesgo mínimo de formación de teratomas, tejido de bazo de crecimiento  
 50 óptimo, estructural y funcionalmente diferenciado.

Adicionalmente, los datos desvelados en el presente documento demuestran inesperadamente por primera vez que  
 50 el estadio gestacional óptimo para el trasplante de injertos pulmonares porcinos es aproximadamente el día 42 y menos de aproximadamente el día 80 de gestación, teniendo los injertos de estadio gestacional de 56 días la capacidad de generar, sin riesgo/con riesgo mínimo de formación de teratomas, tejidos pulmonares óptimamente  
 55 crecientes y estructural y funcionalmente diferenciados.

Como tales, los métodos descritos en el presente documento de trasplante de injertos pancreáticos y pulmonares de  
 60 estadio gestacional porcino son enormemente superiores a los métodos conocidos y son por lo tanto óptimos para el tratamiento de enfermedades asociadas con la insuficiencia de órganos de dichos tipos.

#### **EJEMPLO de referencia 8**

**Identificación de los estadios gestacionales durante los que los injertos esplénicos de ratón son capaces de  
 65 generar órganos esplénicos crecientes**

**Antecedentes:** numerosas enfermedades altamente debilitantes/letales provocadas por la actividad o expresión anómala de una biomolécula para la que no hay métodos de tratamiento óptimos se asocian con una deficiencia en una sustancia que se produce por células hematopoyéticas/del estroma que pueden encontrarse en órganos/tejidos linfoides/hematopoyéticos tales como el bazo. Dichas enfermedades incluyen, por ejemplo, hemofilia A o enfermedad de Gaucher que se asocian respectivamente con la deficiencia de factor VIII o glucocerebrosidasa.

La presente invención proporciona un método para tratar dichas enfermedades que comprende el trasplante de órganos/tejidos linfoides/hematopoyéticos alogénicos fetales que tendrían la gran ventaja de obviar la necesidad de terapia de reemplazo enzimática, el método de tratamiento del estado de la técnica para dichas enfermedades. Sin embargo, hasta la fecha, no se sabe si y cómo puede conseguirse óptimamente dicho trasplante terapéutico en ausencia de formación de teratomas. Mientras se concebía la presente invención, los presentes inventores plantearon la hipótesis de que los injertos de órganos/tejidos linfoides/hematopoyéticos en el estado gestacional apropiado tendrían la capacidad de generar órganos esplénicos crecientes, con diferenciación normal sin riesgo o con riesgo mínimo de formación de teratomas después del trasplante y respuesta inmunitaria del hospedador mínima en un hospedador singénico/allogénico. Por lo tanto, mientras se reducía la presente invención a la práctica, los presentes inventores han validado con éxito esta hipótesis, como se describe posteriormente, superando de este modo las limitaciones críticas de la técnica.

**Materiales y métodos:**

Para detalles véase el Ejemplo 6, anteriormente. Trasplante de injertos esplénicos de estadio gestacional en receptores ratones singénicos/allogénicos: el estadio gestacional más temprano durante el que el bazo es distinguible de otros órganos y puede separarse del páncreas en ratones es aproximadamente el día 13 de gestación, por lo tanto se trasplantaron injertos esplénicos de ratón de estadio gestacional de 13, 14, 15, 16 o 17 días bajo la cápsula renal de ratones singénicos o alogénicos hospedadores, y se analizó su crecimiento y desarrollo.

**Resultados experimentales:**

**Modelo de trasplante singénico/de ratón:** identificación de los estados gestacionales óptimos de injertos esplénicos para la generación de órganos esplénicos con diferenciación normal sin riesgo/con riesgo mínimo de formación de teratomas/fibrosis después de su implantación en huéspedes singénicos: se trasplantaron injertos esplénicos de ratón los días 13, 14, 15, 16 o 17 de gestación en receptores singénicos, y se analizó su desarrollo de forma histológica 6 semanas después del trasplante.

Como puede verse a partir de los resultados que se resumen en la Tabla 5, los injertos en los días 13 o 14 de gestación formaron tejidos mesenquimales desorganizados, sin embargo con pruebas de infiltración de células linfoides difusas, y formación de áreas linfoides con lagunas y senos agrandados con componentes de pulpa roja y blanca. En gran contraste, los tejidos derivados de injertos esplénicos de estadio gestacional de 15 o 16 días generaron tejidos que mostraban buena organización tanto del estroma como del tejido linfoide con más trabéculas maduras y estructuras foliculares, apareciendo las áreas de pulpa de tipo blanco y rojo más claramente que en tejidos generados por injertos de estadios más tempranos, y la aparición de encapsulación. Ocasionalmente, se observan estructuras de estroma mesenquimal vacías con mínima colonización por células linfoides. La implantación de injertos el día 17 de gestación condujo a tejidos que mostraban pulpas blanca y roja bien definidas. En la pulpa blanca, la formación de compartimentos de linfocitos T y B se demostró claramente mediante inmunotinción doble.

Como se indica en la Tabla 5, se descubrieron estructuras de tipo teratoma quístico en uno de cada siete ratones a los que se implantó un injerto esplénico el día 13 de gestación. Sorprendentemente y en claro contraste, los injertos esplénicos de estadio gestacional de 14 días generaron órganos esplénicos que carecían de formación de teratomas, mostrando diferenciación esplénica con áreas linfoides correspondientes a la pulpa blanca en el bazo del adulto, y que mostraban trabéculas, estructuras de tipo seno y arterias centrales.

**Tabla 5. Identificación del estadio gestacional óptimo de injertos esplénicos de estadio gestacional para la generación de órganos esplénicos con diferenciación normal sin riesgo/con riesgo mínimo de formación de teratomas/fibrosis**

Estadio gestacional del injerto (días)	Incidencia del desarrollo esplénico	del no	Incidencia el desarrollo esplénico			
			Organización mesenquimal	Incidencia de la formación de folículos linfoides	Incidencia de la formación de pulpa roja	Incidencia de los grupos de linfocitos difusos y pequeños
13	1\7-teratoma 2\7-fibrosis	++		2\7	2\7	2\7
14	2\14 fibrosis	+ \+++		2\14	8\14	9\14

15	3\10 fibrosis	++\+++	4\10	7\10	3\10
16		++\+++	1\4	3\4	3\4
17		++\+++	3\4	3\4	1\4

Los datos mostrados resumen los resultados de 11 experimentos no relacionados en los que se trasplantaron injertos entre los días 13 a 17 de gestación en ratones C57BL/6 o Balb/c singénicos. (+), estroma caótico; (++) , alguna organización con pocos senos y trabéculas; (+++), organización de tipo bazo normal.

**Modelo de trasplante de ratón/allogénico:**

5 El trasplante de bazo esplénico en todos los estadios gestacionales en ratones receptores allogénicos dio como resultado el rechazo de injertos con generación de fibrosis importante en el área de injerto. No se vieron señales de supervivencia de injerto 6 semanas después del trasplante.

10 Caracterización de los perfiles de población de linaje de esplenocitos durante el desarrollo de bazo de ratón: el origen linfóide, mielóide o mesenquimal de suspensiones monocelulares de bazo de ratones neonatos, de 4 semanas de edad y ratones de 8 semanas de edad se fenotiparon por análisis de FACS. Los anticuerpos usados incluyeron anticuerpos contra CD3, CD4, CD8, CD11b, CD11c, CD29, CD44, CD49e, B220, Sca, Gr-1 y H2B. Los niveles relativos de los diferentes fenotipos durante el desarrollo del bazo se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6. Caracterización de perfiles de linaje hematopoyético durante la maduración del bazo de ratón.**

Marcador analizado en tejidos derivados de injertos	Estadio del desarrollo							
	14-días de gestación	15-días de gestación	17-días de gestación	18-días de gestación	Neonatal	1 semana de edad	4 semanas de edad	8 semanas de edad
CD3	+	+		+	++	-	++	+
CD4			-	-	-	-	+	+
CD8		-	-	-	-	-	++	++
B220		+	+	-	++	+	+++++	+++++
CD11b		++	+++	+++		+	+	+
CD11c				-		-	+++	+++
Gr-1			++	+	+	+	+	+
H2-K <sup>b</sup>			+++	+++	+++++	++++	+++++	+++++
integrina-beta1 (CD29)	+			+++	+++++	+++++	++++	+++
Pgp-1 (CD44)				+++	+++++	+++++	+++++	
integrina-alfa5 (CD49e)				++	+++	+++++	++	
Sca-1 (Ly6A/E)	-			-	+	+	+++++	+++++

Índice de claves: porcentaje de esplenocitos totales. (-), 0-10 por ciento; (+), 10-20 por ciento; (++) , 20-30 por ciento; (+++), 30-40 por ciento; (++++), 40-50 por ciento; (+++++), 50-100 por ciento.

15 El análisis de los niveles de esplenocitos que presentaban los marcadores específicos linfoides CD4, CD8 y B220 indica que están presentes poblaciones de linfocitos T y B esplénicos a niveles basales hasta una semana después del nacimiento y comienzan a aumentar a continuación según la maduración del bazo. Sorprendentemente, el fenotipo CD3 no se correlacionó con los fenotipos CD4 y CD8 y apareció antes. El CD3+CD4-CD8 podría representar linfocitos T NK y otros linfocitos no T.

20

25 Los niveles de esplenocitos que presentaban el marcador específico de macrófago CD11b, o el marcador específico de células dendríticas CD11c se analizaron durante la maduración esplénica. Se descubrió que los macrófagos estaban presentes en el bazo durante todo el desarrollo postgestacional, sin embargo se descubrió sorprendentemente que los niveles de dichas células se reducían durante el transcurso de la maduración del bazo.

En contraste significativo, se descubrió que los niveles de células dendríticas aumentaban durante el transcurso de la maduración del bazo.

Los injertos esplénicos de estadio gestacional tienen la capacidad de generar órganos esplénicos que albergan células linfoides y mieloides derivadas del hospedador después del trasplante en huéspedes alogénicos: para distinguir células hematopoyéticas originarias del hospedador y del donante dentro de tejidos generados por injertos esplénicos de estadio gestacional, se trasplantaron injertos de estadio gestacional de 14 días de ratones C57BL/6 de tipo silvestre, que expresaban el isotipo de CD45 Ly5.2 en células de linaje hematopoyético, a ratones receptores B6SJL que expresaban el isotipo de CD45 Ly5.1 en su lugar. El análisis de FACS de los tejidos generados por los injertos mostró inesperadamente que el tejido creciente contenía células linfoides originarias del hospedador. Por lo tanto, se concluyó que dichos injertos dan lugar a tejido del estroma/mesenquimal esplénico capaz de acomodar la colonización por linfocitos del hospedador alogénico. Se han documentado niveles relativamente altos de linfocitos CD4+ y CD8+, así como linfocitos B B220+ en los órganos esplénicos derivados de injertos crecientes. Estos datos sugieren que después de 6 semanas de desarrollo la constitución de células linfoides del bazo derivado de injerto se asemeja a la de un bazo normal a las 3-4 semanas después del nacimiento. También se descubrió que los tejidos derivados de injerto albergaban macrófagos originarios del hospedador. En tejidos generados por injertos esplénicos alogénicos del estadio gestacional de 15 días, la composición celular del órgano creciente fue similar a la generada por los injertos del estadio gestacional de 14 días, sin embargo se han documentado niveles mayores de macrófagos.

La irradiación induce maduración y hematopoyesis esplénica potenciada en órganos esplénicos derivados de injertos esplénicos de estadio gestacional trasplantados a receptores alogénicos: en ratones, se produce hematopoyesis en el bazo y está notablemente potenciada después de la irradiación. Al concebir la presente invención, los presentes inventores plantearon la teoría de que podría emplearse radiación para potenciar la hematopoyesis en el contexto descrito en el presente documento de tejidos generados por injertos esplénicos de estadio gestacional después de trasplante en receptores alogénicos. Sin embargo, no se sabe si la irradiación podría de hecho dar como resultado hematopoyesis potenciada en este nuevo contexto, y qué modalidad de irradiación podría usarse para conseguir dicha potenciación. Por lo tanto, para intentar dilucidar estos asuntos se sometió a ratones receptores de injertos esplénicos de estadio gestacional de 15 días alogénicos a diversas dosis subletales/letales de irradiación corporal total (TBI) y se analizó el efecto de dicha irradiación en la hematopoyesis dentro de los injertos. La irradiación corporal total de 300, 600 o 1000 rad (TBI) de ratones receptores de injerto indujo en los injertos organización de pulpa blanca del estroma y folicular de tipo adulto, y formación de trabéculas, senos y áreas hematopoyéticas con megacariocitos y maduración de granulocitos. En claro contraste, no se detectaron dichas estructuras esplénicas maduras en receptores no irradiados de control. Además, se descubrió que el tamaño de los órganos injertados era mayor en los hospedadores irradiados en comparación con los no irradiados.

Tras la irradiación de 1000 rad y radioprotección con médula ósea singénica o NOD-SCID, 3 de cada 12 injertos esplénicos de estadio gestacional de 14 días trasplantados a receptores alogénicos generaron estructuras de tipo teratoma acompañadas por crecimiento del bazo.

**Sumario:** el trasplante de injertos esplénicos de estadio gestacional de 13 días de ratón a hospedadores alogénicos/singénicos es capaz de generar teratomas derivados de injerto, mientras que se consiguió desarrollo esplénico normal sin formación de teratomas por el trasplante de injertos esplénicos en un estadio del desarrollo al menos tan avanzado como 14 días de gestación. En general, en injertos de estadio gestacional de 13 a 17 días, se descubrió que la capacidad de dichos injertos para mostrar diferenciación esplénica aumentaba con el aumento del estadio gestacional. Se descubrió que la irradiación corporal total de receptores con 300 rad o mayor conducía a maduración acelerada y crecimiento de injertos esplénicos de estadio gestacional. Los resultados de experimentos en el modelo alogénico revelaron que el compartimento hematopoyético en el bazo creciente es originario del hospedador a diferencia del mesénquima que es originario del donante.

**Conclusión:** los resultados anteriormente descritos demuestran por primera vez que los injertos de órganos/tejidos linfoides/hematopoyéticos de estadio gestacional, tales como injertos esplénicos tienen la capacidad para generar estroma mesenquimal creciente con diferenciación normal en el que puede tener lugar linfopoyesis del hospedador en órganos/tejidos linfoides/hematopoyéticos en ausencia de formación de teratomas después del trasplante en receptores singénicos, o alogénicos inmunodeficientes. Los resultados anteriormente descritos identifican además por primera vez estadios gestacionales durante los que dichos injertos tienen de forma óptima dicha capacidad. Como tales, ya que los órganos/tejidos del bazo y otros linfoides/hematopoyéticos tienen la capacidad de producir sustancias cuya deficiencia se asocia con una enfermedad, tal como la deficiencia de factor VIII o glucocerebrosidasa en la hemofilia A o enfermedad de Gaucher, respectivamente, los métodos de trasplante anteriormente descritos pueden usarse para tratar de forma óptima dicha enfermedad en un sujeto en relación con métodos conocidos.

**EJEMPLO de referencia 9****Trasplante de bazo porcino**

5 Se realizaron los siguientes experimentos para identificar estadios gestacionales durante los que los injertos esplénicos porcinos después del trasplante a receptores xenogénicos son capaces de generar órganos esplénicos crecientes, con diferenciación normal sin riesgo/con riesgo mínimo de formación de teratomas y mínima inmunosupresión.

10 **Antecedentes:** numerosas enfermedades monogénicas letales/altamente debilitantes para las que no hay métodos de tratamiento óptimos se asocian con una deficiencia en una sustancia que se produce por células hematopoyéticas/mesenquimales que pueden encontrarse en órganos/tejidos linfoides/hematopoyéticos tales como el bazo. Dichas enfermedades incluyen, por ejemplo, hemofilia A o enfermedad de Gaucher que se asocian respectivamente con deficiencia en factor VIII y glucocerebrosidasa. Una estrategia que se ha propuesto para tratar dichas enfermedades implica el trasplante de órganos/tejidos linfoides/hematopoyéticos xenogénicos fetales que tendrían las grandes ventajas de proporcionar una fuente esencialmente ilimitada de tejidos trasplantables y de eliminar la necesidad de terapia de reemplazo enzimática, el método de tratamiento del estado de la técnica para dichas enfermedades. Sin embargo, hasta la fecha, no se sabe si y cómo puede conseguirse de forma óptima dicho trasplante terapéutico en ausencia de la formación de teratomas.

20 Al concebir la presente invención, los presentes inventores descubrieron que los injertos de órganos/tejidos linfoides/hematopoyéticos en el estadio gestacional apropiado tienen la capacidad de generar órganos esplénicos crecientes, con diferenciación normal sin riesgo/con riesgo mínimo de formación de teratomas e inmunosupresión mínima después del trasplante a un hospedador xenogénico.

25 Los presentes inventores han determinado inesperadamente que la ventana de tiempo óptima para el trasplante de tejido de bazo fetal porcino, cuando se consideran todos los factores, es decir funcionalidad, organogénesis, riesgo de formación de teratomas e inmunosupresión, es de aproximadamente E42 a aproximadamente E56.

**Materiales y métodos:**

30 PCR en tiempo real: se diseccionaron cuidadosamente tejidos derivados de injertos del sitio de implantación subcapsular y se aisló ARN total del mismo usando el método Tri-Reagent® (Molecular research center, Inc., Cincinnati, Ohio), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se trató con DNasa sin RNasa RQ1 (Promega Corp. Madison, Wisconsin). El ARN purificado se transcribió de forma inversa a ADNc, y el ADNc se usó como molde para análisis por PCR cuantitativo de transcritos de ARNm en los injertos usando un instrumento Light Cycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, usando cebadores específicos para el factor VIII porcino [cebador directo, 5'-CATGGACCTGCTTCAC-3' (SEC ID N°: 1); cebador inverso, 5'-TGACACATGATTTAATCCCG-3' (SEC ID N°: 2)]; y para los genes constitutivos: receptor de transferrina porcina [cebador directo, 5'-TGTGGCAGCTCAGAAT-3' (SEC ID N°: 3); cebador inverso, ACCGATGTGGTTACTCC-3' (SEC ID N°: 4)], y GAPDH de ratón [cebador directo, 5'-CTGCGACTTCAACAGC-3' (SEC ID N°: 5); cebador inverso, 5'-GGTGCAGCGAACTTTAT-3' (SEC ID N°: 6)]. Se llevaron a cabo reacciones de PCR cuantitativas por triplicado para cada muestra, y se calcularon las cantidades relativas de transcritos para cada trasplante basándose en la cantidad correspondiente de receptor de transferrina porcina.

**Resultados experimentales:**

45 Los injertos esplénicos de estadio gestacional de 28 a 80 días porcinos muestran crecimiento y desarrollo extensivo de estructuras esplénicas en ausencia de teratomas tras el trasplante a receptores xenogénicos inmunodeficientes: se trasplantaron injertos esplénicos porcinos en estadios gestacionales diferentes a ratones NOD/SCID o CB17/ICR para ensayar la capacidad de dichos injertos para generar órganos esplénicos y teratomas después del trasplante a receptores xenogénicos inmunodeficientes. Se proporciona un sumario de los resultados obtenidos en estos experimentos, que describe el desarrollo de los injertos esplénicos de estadio gestacional implantados obtenidos en diferentes estadios gestacionales, en la Tabla 7.

55 Como se ve en la Tabla 7, se consiguió un crecimiento impresionante en los injertos de estadio gestacional de día 28, 42, 56 y 80, 6 semanas después del trasplante, creciendo los injertos de estadio gestacional de 42 y 56 días hasta más del doble del tamaño de los injertos de estadio gestacional de 28 y 80 días. No se observó el crecimiento de teratomas después del trasplante de precursores de bazo porcino de estadio gestacional de 28 a 80 días. Los injertos de estadio gestacional de 28 días presentaron desarrollo esplénico caracterizado por la organización de vasos sanguíneos y encapsulación del órgano derivado de injerto. Los órganos esplénicos derivados de implantes de estadio gestacional de 42 y 56 días se asociaron con una estructura más heterogénea que comprendía componentes mesenquimales sueltos y condensados, mostrando los primeros vascularización esplénica, encapsulación y una estructura de tipo trabecular con lagunas probablemente correspondientes a un sistema de senos sin un componente linfóide que no puede proporcionarse por los hospedadores SCID. Después del trasplante de injertos de estadio gestacional de 80 días, aparece un fenotipo diferente caracterizado por estroma homogéneo

bien vascularizado con zonas enfatizadas de matriz extracelular, y por difusión de granulocitos y macrófagos inflamatorios a lo largo del órgano esplénico derivado de injerto. Las Figuras 10a-b muestran la tinción inmunohistoquímica con H y E y anti vimentina (v9), respectivamente, de tejido esplénico porcino trasplantado E42 6 semanas después del trasplante.

Por lo tanto, de acuerdo con los hallazgos anteriormente descritos en el modelo de ratón singénico en el que los linfocitos que habitan el órgano esplénico derivado de injertos son esencialmente exclusivamente originarios del hospedador, los injertos esplénicos después del trasplante a receptores SCID representan principalmente estructuras de estroma esencialmente sin un componente linfoide. El origen porcino de los elementos del estroma en el órgano esplénico derivado de injerto se demostró mediante inmunotinción con un anticuerpo contra vimentina porcina, que es específica del mesénquima porcino, y la colonización del estroma esplénico derivado de injerto porcino por macrófagos de ratones hospedadores xenogénicos se demostró por inmunotinción con un anticuerpo para el marcador de macrófagos F4/80 que es específico de ratón y no reacciona de forma cruzada con el antígeno porcino.

Órganos esplénicos derivados de injertos esplénicos porcinos del estadio gestacional trasplantados a receptores xenogénicos producen el factor VIII porcino: teniendo en cuenta que hay varias indicaciones en la bibliografía de que el factor VIII, que participa en la cascada de coagulación, se produce en el tejido de bazo, los presentes inventores plantearon la hipótesis de que los injertos esplénicos porcinos de estadio gestacional descritos en el presente documento serían capaces de producir sustancias útiles, tales como factor VIII, después de su trasplante a receptores xenogénicos. Esto demostraría específicamente que el método de trasplante descrito en el presente documento podría usarse para producir niveles terapéuticos de dicha sustancia en un receptor de injerto que tiene una enfermedad, tal como hemofilia A, que se asocia con la deficiencia de una sustancia tal como el factor VIII. Sin embargo, se desconocía si los injertos descritos en el presente documento serían capaces de hecho de secretar el factor VIII después del xenotrasplante.

Para cuantificar de forma más precisa los niveles de la expresión del factor VIII porcino, se analizaron precursores de tejidos porcinos y tejidos derivados de injerto mediante ensayo de RT-PCR en tiempo real. Como puede verse en la Figura 11, la expresión del ARNm de factor VIII porcino en el hígado y el bazo aumenta durante la gestación. Además, los bazos porcinos derivados de adultos o de E80 o E100 embrionarios expresan altos niveles de ARNm del factor VIII porcino, aunque ligeramente menores que los niveles expresados por el hígado porcino derivado de los mismos estadios gestacionales, respectivamente. La Figura 11 muestra las cantidades relativas de ARNm del factor VIII porcino en diferentes tejidos antes y después del trasplante que se evaluaron por PCR en tiempo real usando cebadores específicos para el factor VIII porcino. Los resultados se dividieron por la expresión del gen constitutivo Beta actina, usando cebadores específicos para la Beta actina porcina. El ARNm total que se purificó de tejido adulto o de tejido precursor E80 o E100 de hígado porcino y bazo porcino actuó como control positivo. El ARNm total que se purificó del riñón de ratón, de un área distante del implante embrionario, actuó como control negativo.

Seis semanas después del trasplante de tejido de bazo embrionario de E28, E42, E56 a ratones inmunodeficientes, los injertos de bazo mostraron niveles significativos de expresión de ARNm de factor VIII porcino. Por el contrario, los injertos pancreáticos y pulmonares de estadio gestacional de control generaron tejidos que no expresaban o mostraban niveles notablemente reducidos de ARNm del factor VIII, respectivamente. Dichos niveles bajos de la expresión de ARNm del factor VIII porcino observado en tejidos derivados de los injertos pulmonares probablemente se deban a la red de vasos sanguíneos densa que se formó en dichos tejidos.

**Sumario:** de acuerdo con los resultados del modelo de trasplante de ratón alogénico descrito anteriormente, los injertos esplénicos de estadio gestacional porcinos implantados en ratones SCID generaron órganos esplénicos caracterizados por crecimiento y desarrollo del mesénquima en ausencia de un componente linfoide. El trasplante de injertos esplénicos de estadio gestacional de 28 a 80 días porcinos generaron órganos esplénicos derivados de injertos que mostraban una organización histológica similar en ausencia de teratomas, con crecimiento y desarrollo óptimo y consiguiéndose respuesta inmunitaria del hospedador baja usando implantes de estadio gestacional de 42 y 56 días. Los órganos esplénicos derivados de injertos esplénicos porcinos de estadio gestacional mostraron niveles significativos de expresión de ARNm del factor VIII, como se define por el análisis de RT-PCR.

**Conclusión:** Los resultados anteriormente descritos demuestran por primera vez que los injertos de órganos/tejidos linfoides/hematopoyéticos porcinos de estadio gestacional, tales como injertos esplénicos fetales porcinos, tienen la capacidad para generar órganos/tejidos linfoides/hematopoyéticos crecientes, con diferenciación normal, en ausencia de formación de teratomas después del trasplante a receptores xenogénicos. Los resultados anteriormente descritos identifican además por primera vez estadios gestacionales durante los que dichos injertos tienen de forma óptima dicha capacidad. Como tales, dichos injertos porcinos están disponibles en cantidades esencialmente ilimitadas, y ya que los órganos/tejidos linfoides/hematopoyéticos tienen la capacidad de producir sustancias cuya deficiencia se asocia con una enfermedad, tal como la deficiencia del factor VIII o glucocerebrosidasa en hemofilia A o enfermedad de Gaucher, respectivamente, los métodos de trasplante anteriormente descritos son claramente superiores a los métodos conocidos de tratamiento de dicha enfermedad en un sujeto.

**Tabla 7. Los injertos esplénicos de estadio gestacional de día E28 a E80 porcinos tienen la capacidad de generar, sin riesgo/con riesgo mínimo de formación de teratomas, órganos esplénicos ampliamente crecientes, con diferenciación normal después del trasplante a receptores xenogénicos inmunodeficientes**

Estadio gestacional de los injertos (días)	Fracción de injertos que presentan diferenciación esplénica*	Crecimiento del injerto (milímetros cuadrados, media ± desviación típica)
28	14/17	30,6 ± 10,5
42	6/10	76 ± 9,9
56	4/5	70,6 ± 9
80	4/5	27 ± 19

\* No se observó que ninguno de los injertos generara teratomas después del trasplante. Los injertos se analizaron 6 semanas después del trasplante

5 **EJEMPLO de referencia 10**

**Tratamiento de la hemofilia A mediante el trasplante de bazo xenogénico en desarrollo**

10 Resumen: los intentos clínicos previos de corregir deficiencias genéticas tales como la hemofilia A o Gaucher por trasplante de bazo alogénico no tuvieron éxito, y se asociaron con enfermedad de injerto contra hospedador agresiva (GVHD), mediada por linfocitos T maduros en el bazo donante. En los presentes estudios se desvela que el bazo de cerdo fetal recogido en el estadio E42, antes de la aparición de linfocitos T, mostraba crecimiento óptimo potencial tras la implantación en ratones SCID, y el tejido mesenquimal creciente expresaba ARNm del factor VIII. La implantación del tejido precursor del bazo E42 en ratones SCID hemófilos condujo a alivio completo de la hemofilia A en un periodo de 3 meses después del trasplante, como se demostró por sangrado de la cola, y por ensayos con respecto a los niveles en sangre del factor VIII. Estos resultados proporcionan una prueba de principios para el concepto de que la implantación del tejido precursor de bazo embrionario obtenido antes de la aparición de los linfocitos T podría proporcionar una nueva modalidad de tratamiento en la hemofilia A y en otras deficiencias genéticas de una enzima o un factor que puede producirse por el tejido de bazo creciente.

20 **Introducción:** las enfermedades genéticas heredadas representan dianas naturales para la terapia génica, pero surgen dificultades considerables en la dirección del suministro génico a tipos celulares específicos *in vivo*, la regulación de la expresión de genes recombinantes y el control de la inmunogenicidad del vector (1).

25 Se cree que la hemofilia A heredada es una diana de terapia génica particularmente prometedora, porque la proteína deficiente (factor VIII) circula de forma sistémica y puede sintetizarse, en teoría, por diversos tipos celulares. De hecho, los ensayos preliminares han demostrado la expresión del factor VIII humano en animales y en pacientes después de la transferencia génica (2-4). En paralelo, el progreso en los trasplantes durante la última década, ha promovido la consideración del trasplante de células u órganos como un tratamiento potencial para enfermedades genéticas, tales como la hemofilia A.

35 Se cree que el hígado es la principal fuente de proteína de factor VIII. Los hepatocitos y las células endoteliales sinusoides del hígado, pero no células de Kupffer, producen el factor VIII en el hígado de ratón (5). El papel del hígado en la síntesis de factor VIII está apoyada por estudios de trasplante de hígado tanto en animales como en seres humanos hemófilos, después de lo cual, se detectaron niveles de factor VIII crecientes (6-8). Los estudios de trasplante en animales hemófilos mostraron que órganos tales como el bazo y el pulmón también contribuyen a la presencia del factor VIII en circulación (9, 10).

40 La viabilidad del trasplante de bazo en el tratamiento de la hemofilia A en seres humanos se documentó en primer lugar en 1969 por Hathaway, que trasplantó un bazo donado por un miembro de la familia (11). El receptor presentó un notable aumento del factor VIII poco después del trasplante, pero el injerto de bazo tuvo que retirarse 4 días después debido a rechazo grave.

45 Posteriormente, se han indicado varios trasplantes de bazo (donante vivo o muerto) en pacientes hemófilos. Al menos uno dio como resultado niveles normalizados, sostenidos, del factor VIII con producción de factor VIII estable durante 5 meses después de la operación (12, 13). Están disponibles pocos datos con respecto al trasplante de bazo en el tratamiento de otras enfermedades genéticas pero hay varios informes de casos en la bibliografía que sugieren el potencial de trasplante de bazo como un tratamiento para la enfermedad de Gaucher e hipogammaglobulinemia (13-15).

50 Un obstáculo importante en el trasplante de bazo está asociado con la enfermedad de injerto contra hospedador (GVHD) mediada por linfocitos T donantes presentes en el injerto de bazo. En principio, esta complicación potencialmente letal podría prevenirse si fuera posible usar tejido de bazo precursor embrionario obtenido antes de

la aparición de linfocitos T maduros en el bazo.

Teniendo en cuenta el reciente interés en el tejido fetal como fuente de trasplantes, es sorprendente que el papel del tejido de bazo embrionario como fuente de proteínas secretadas no se haya estudiado nunca. Claramente, si el tejido de bazo embrionario temprano resulta ser viable, podría ser particularmente importante, ya que este tejido precursor está desprovisto de linfocitos T que se sabe que median en la GVHD típica del trasplante de bazo adulto.

En el presente estudio, el potencial del tejido de bazo embrionario de cerdo como una nueva fuente tisular para el trasplante se examinó por primera vez, enfatizando los puntos temporales gestacionales relativamente tempranos en los que no se encuentran linfocitos T maduros en el implante. La prueba de concepto, concretamente la capacidad de corregir la hemofilia A usando tejido de bazo embrionario temprano, se demostró después en ratones SCID hemófilos con anulación del factor VIII.

#### **Materiales y métodos:**

**Animales:** los animales se mantuvieron en condiciones aprobadas por el Comité de Cuidado y Uso de Animales Institucional en el Instituto Weizmann. Se obtuvo una pareja reproductora de ratones KO para el factor VIII de Jackson laboratory (nombre de la cepa: B6; 12954-F8tm1Kaz/J, número de lote: 004424).

Para obtener ratones hemófilos inmunodeficientes (designados como factor VIII KO-SCID), se cruzaron ratones deficientes para FVIII con ratones SCID. Se realizó genotipación y caracterización fenotípica de la descendencia de FVIII KO y factor VIII KO-SCID confirmando que todos los ratones deficientes en FVIII usados en este estudio son ratones factor VIII KO-SCID.

Se usaron ratones inmunodeficientes NOD-SCID o factor VIII KO-SCID (Centro de Reproducción Animal del Instituto Weizmann, Rehovot, Israel) como hospedadores para los estudios de trasplante a la edad de 8-10 semanas. Todos los ratones se mantuvieron en jaulas pequeñas (hasta cinco animales en cada jaula) y se les alimentó con comida estéril y agua ácida que contenía ciprofloxacina (20 mg/ml).

Se obtuvieron embriones de cerdos del Instituto Lahav de Investigación Animal, Kibbutz Lahav, Israel. Se operó a cerdas preñadas en estadios específicos del embarazo (E24, E28, E42, E56, E80 y E100) con anestesia general. El tiempo de isquemia caliente fue menor de 10 minutos y los embriones se transfirieron a PBS frío. Se extrajeron precursores de bazo para su trasplante bajo un microscopio óptico y se mantuvieron en condiciones estériles a 40 grados centígrados en RPMI 1640 (Biological Industries, Beit HaEmek, Israel) antes del trasplante. El tiempo de isquemia fría hasta el trasplante fue menor de 2 horas. El protocolo de estudio se aprobó por el comité de ética en Kibbutz Lahav y el Instituto Weizmann.

**Procedimiento de trasplante:** se realizaron trasplantes de los precursores embrionarios con anestesia general (2,2,2-tribromoetanol 2,5 por ciento, 97 por ciento en PBS, 10 ml/kg por vía intraperitoneal). Se expuso el riñón del hospedador a través de una incisión lateral izquierda. Se realizó una incisión de 1,5 mm en el extremo caudal de la cápsula renal y se injertaron precursores donantes bajo la cápsula renal en fragmentos de 1-2 mm de diámetro.

**Análisis morfométrico:** se fijaron en formalina y se incluyeron en parafina muestras de ensayo de bazo embrionario de cerdo, 6 semanas después del trasplante, a diferentes edades gestacionales (de E-28 a E-100). Se cortaron y tiñeron secciones consecutivas. La distancia entre las secciones fue de 40 micrómetros. Las áreas de interés se cuantificaron usando el programa Image Pro program (Media Cybernetics).

**Inmunohistoquímica:** para el marcaje inmunohistoquímico, se usaron los siguientes anticuerpos: anti vimentina de ratón (clon V9) (Dako, DakoCytomation Dinamarca), anti Ki67 humano de ratón (clon MIB-1) (Dako), anti CD3 humano de conejo (Dako), anti CD31 porcino de ratón (Serotec, Enco Scientific Services Ltd Israel), anti Laminina de conejo (SIGMA-ALDRICH, Israel), anti CD11b de ratón de rata (antígeno Mac-1, clon M1/70) (BD Pharmingen, BD biosciences) y anti TER-119 de ratón de rata (BD Pharmingen).

Las secciones de parafina (de 4 micrómetros) se desparafinizaron en xileno y se rehidrataron. Se bloqueó la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 0,3 por ciento en metanol al 70 por ciento durante 10 minutos. Se realizaron procedimientos de recuperación de antígenos por cocinado con microondas a pH 6 o pretratamiento enzimático de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Después del bloqueo, se incubaron tanto secciones de parafina como criosecciones de 6 micrómetros con un primer anticuerpo específico durante 60 minutos. Se realizó detección de la unión de anticuerpos usando el Sistema Envision de peroxidasa de Dako para la detección de anticuerpos de ratón y conejo. En ambos casos, se usó diaminobencidina (DAP) como un cromógeno.

**PCR en tiempo real:** se diseccionaron cuidadosamente injertos del sitio subcapsular y se homogeneizaron en Tri-reagent. Se aisló ARN total usando el método de Tri-reagent de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, Ohio). Se trató ARN purificado con DNasa sin RNasa RQ1 (Promega

Corp. Madison, Wisconsin), después se transcribió de forma inversa a ADNc, y se amplificó usando la PCR cuantitativa Light Cycler usando cebadores específicos para el factor VIII de cerdo y los genes constitutivos, receptor de transferrina de cerdo y GAPDH de ratón.

- 5 Se llevaron a cabo reacciones de PCR cuantitativas usando triplicados de cada muestra usando la reacción de Light Cycler como se enseña por el fabricante (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania). Se normalizó la cantidad relativa del producto en cada trasplante al nivel del receptor de transferrina de cerdo.

10 Los cebadores usados para el factor VIII de cerdo fueron: directo-CATGGACCTGCTTCAC; inverso-TGACACATGATTTAATCCCG (SEC ID N°: 2). Los cebadores usados para el receptor de transferrina de cerdo fueron: directo-TGTGGCAGCTCAGAAT (SEC ID N°: 3); inverso-ACCGATGTGGTTACTCC (SEC ID N°: 4). Para mostrar la especificidad de estos cebadores, también se usaron cebadores específicos para GAPDH de ratón: directo-CTGCGACTTCAACAGC (SEC ID N°: 5); inverso-GGTGCAGCGAACTTTAT (SEC ID N°: 6).

15 **Ensayos de factor VIII en plasma:** se ensayó la actividad del factor VIII en plasma citratado recogido de receptores. Se determinó el PTT con un coagulómetro Sysmex CA-6000 (Los ensayos se realizaron en el laboratorio de hematología clínica; Centro Médico Kaplan, Rehovot). Se realizó el ensayo de actividad cromogénica, que mide la generación dependiente de FVIII de FXa a partir de FX (COATEST FVIII: Chromogenix, Molndal, Suecia).

20 **Corte de la cola:** se realizó un corte de la cola (a aproximadamente 1,5 cm de la punta) sin cauterización posterior para medir la propensión a hemorragia. Después del procedimiento, se comprobó a los ratones cada 4 horas. Se registró la proporción de ratones supervivientes a las 24 horas después del procedimiento.

25 **Análisis estadístico:** se evaluaron comparaciones entre grupos por el ensayo de t de Student. Los datos se expresaron como la media  $\pm$  DT, y se consideraron estadísticamente significativos a p valores de 0,05 o menos.

#### Resultados experimentales:

30 Se ha establecido previamente la ventana de tiempo gestacional que permite la recogida de tejido precursor de riñón embrionario humano y de cerdo para riñones pequeños funcionales crecientes en ratones SCID (16). Más recientemente, se han definido "ventanas" similares para páncreas, hígado y pulmón embrionario de cerdo (17). En el presente estudio, se recogió tejido embrionario de bazo en puntos temporales gestacionales diferentes y se tiñó con respecto a células positivas para CD3 para determinar el periodo de tiempo preciso en la ontogenia del cerdo en el que los linfocitos T maduros están presentes en primer lugar en estos tejidos. Como puede verse en las Figuras 12a-e, los linfocitos T fueron detectables inicialmente en el tejido obtenido en la edad gestacional E56.

Por lo tanto, para evitar la GVHD, la recogida de tejido de bazo para trasplante debería limitarse a E42 o puntos temporales anteriores. Para definir el punto temporal gestacional más temprano en el que se muestra el potencial de crecimiento máximo de tejido trasplantado, se implantaron tejidos de bazo embrionario de cerdo obtenidos en diferentes estadios, que variaban de E28 a E100 en ratones NOD/SCID y 6 semanas después se evaluó el tamaño del implante, así como su diferenciación, por análisis morfométrico computarizado. Se cortaron secciones consecutivas a intervalos de 40 micrómetros y se tiñeron con respecto a vimentina (clon V9, que tiñe el tejido mesenquimal de cerdo pero no de ratón), Ki67 (marcador de proliferación) y CD31 de cerdo (marcador de células endoteliales); a continuación, usando el programa Image Pro, se determinaron el volumen de injerto total y las fracciones de volumen de compartimentos mesenquimales. Como puede verse en la Tabla 8, que resume los resultados del análisis morfométrico, se encontró el volumen de implante mayor después del trasplante de tejido obtenido en E42. El crecimiento se aceleró significativamente en comparación con implantes obtenidos en puntos temporales gestacionales más tempranos (E28) o posteriores (E56, E80 y E100), lo que sugiere un potencial de crecimiento único de precursores del bazo en puntos temporales particulares durante la gestación.

50

**Tabla 8. Análisis morfométrico de precursores esplénicos de cerdo**

Edad gestacional	Volumen del implante (mm <sup>3</sup> )	Volumen de vimentina (mm <sup>3</sup> )	Vimentina (porcentaje del volumen)
E28	4,9 $\pm$ 0,99	2,34 $\pm$ 0,454	47,8
E42	21,94 $\pm$ 4,95	10,275 $\pm$ 2,736	46,8
E56	10,49 $\pm$ 5,01	3,146 $\pm$ 1,419	30,0
E80	5,82 $\pm$ 5,92	1,131 $\pm$ 0,063	19,4
E100	0,088 $\pm$ 0,01	0,011 $\pm$ 0,006	12,2

55 Se muestra una imagen macroscópica del implante creciente 6 semanas después del trasplante de tejido de bazo de cerdo E42 en la Figura 13a. El origen porcino del componente del estroma se demostró por inmunomarcaje con vimentina (Figura 13b). Estas células del estroma están apoyadas por vasos sanguíneos de cerdo teñidos con anti

CD31 (Figura 13c) (no reactivo de forma cruzada con CD31 de ratón) y son altamente proliferativos, como se demuestra por los altos niveles de marcaje de Ki67 (Figura 13d).

5 La evaluación histológica del tejido de bazo E42 creciente en diferentes puntos temporales reveló un estadio temprano desorganizado en la formación del compartimento hematopoyético a los 2 meses después del trasplante. Gradualmente, se forman nidos de tejido esplénico de tipo pulpa roja hematopoyética en el mes 3 (Figura 14).

10 La inmunotinción de antígeno Mac1 expresado en células mieloides de ratón y con anti Terr1 específico para las células eritroides de ratón, demuestra que el estroma de cerdo se puebla gradualmente con mielopoyesis y eritropoyesis de tipo hospedador, como se encuentra normalmente en el bazo de ratón adulto. Sin embargo, no se observa linfopoyesis de ratón debido a la mutación de SCID de los receptores del implante.

15 Se observaron patrones similares de nidos hematopoyéticos, separados por septos de tejido conectivo, 5 meses después del trasplante. En estos nidos, se observaron células hematopoyéticas adyacentes a elementos del estroma mesenquimal distribuidos libremente (datos no mostrados). Por lo tanto, el tejido de bazo E42 asume gradualmente su carácter hematopoyético sin ninguna señal de diferenciación aberrante típica de los tumores y, en particular, de los teratomas.

20 Tomados juntos, estos resultados sugieren que de los estadios gestacionales tempranos desprovistos de linfocitos T, E42 muestra el potencial de crecimiento óptimo y podría, por lo tanto, proporcionar una fuente adecuada para el trasplante para corregir la hemofilia A u otras deficiencias genéticas.

**Corrección de la hemofilia A por tejido de bazo de cerdo E42:**

25 Basándose en varias indicaciones en la bibliografía de que el factor VIII se produce en el bazo del tejido adulto (11-13), se han realizado intentos de medir la expresión del factor VIII de cerdo en los implantes que crecen de tejido de bazo embrionario obtenido en diferentes puntos temporales. Ya que no está disponible ningún anticuerpo anti factor VIII específico porcino, se evaluó inicialmente la expresión de ARNm tisular en el mesénquima de bazo embrionario creciente en comparación con implantes de páncreas embrionario de cerdo. Se desarrollaron cebadores específicos de cerdo para el factor VIII y se usaron para explorar los implantes crecientes. Este análisis confirmó la expresión de ARNm del factor VIII de cerdo en el estroma del bazo derivado de tejido de edad gestacional E28 a E56 porcino embrionario, implantado en ratones SCID (datos no mostrados).

35 Para determinar de forma más precisa los niveles de expresión del factor VIII porcino en implantes de bazo embrionario de cerdo, se analizaron tejidos derivados de injerto por RT-PCR. Como puede verse en la Figura 15, 6 semanas después del trasplante de tejido de bazo E28, E42 o E56, los injertos mostraron niveles notables de expresión de ARNm de factor VIII porcino, mientras que el tejido pancreático que crecía a partir del tejido precursor de páncreas embrionario no mostró una expresión apreciable de ARNm del factor VIII.

40 Para determinar la funcionalidad del tejido trasplantado en la producción de factor VIII, se realizaron intentos de tratar los ratones factor VIII KO (fondo B6-129) mediante implantación de tejido de bazo de cerdo E42. Sin embargo, ya que los ratones KO receptores tienen un sistema inmunitario relativamente normal, la implantación de tejido de cerdo requería inmunosupresión continua que implicaba la inyección intraperitoneal de fármacos inmunosupresores, un procedimiento que provocó una hemorragia notable y alta tasa de mortalidad debido al estado hemófilo de los receptores (no mostrado). (Se anticipa que la inmunosupresión será técnicamente más fácil en seres humanos, como se describe posteriormente). Por lo tanto, para evitar la necesidad de inyección continua de agentes inmunosupresores, se usó una cepa de ratones VIII KO-SCID (18) para analizar adicionalmente el potencial de tejido de bazo E42 para corregir la hemofilia A. De hecho, la implantación de estos ratones, realizada con tratamiento a corto plazo con factor VIII soluble para permitir que los animales toleraran el procedimiento quirúrgico, no se asoció con una alta mortalidad, y los ratones fueron capaces de soportar ensayos repetidos con respecto a la actividad del factor VIII.

55 Tradicionalmente, se usa un ensayo de coagulación que mide el tiempo de tromboplastina parcial (PTT) para ensayar la actividad del factor VIII. Además, el ensayo cromogénico Coatest indirecto ofrece una determinación más sensible de la presencia del factor VIII midiendo su actividad en la escisión del Factor X.

60 Como puede verse en la Figura 16, los receptores de tejido de bazo E42 mostraron niveles de PTT normalizados a los 3-4 meses después del trasplante. Por lo tanto, aunque los ratones factor VIII KOS CID no tratados o los de 2 semanas después del trasplante mostraron niveles de PTT de  $43,06 \pm 1,07$  segundos y  $39,63 \pm 5,12$  segundos, respectivamente, los ratones a los que se implantó bazo E42 mostraron a las 12 semanas después del trasplante valores de PTT notablemente reducidos ( $23,8 \pm 3,94$  segundos,  $P = 0,001$ ), comparables con los niveles hallados en ratones SCID no hemófilos, de control ( $22,12 \pm 1,14$  segundos,  $P = 0,001$ ).

65 De forma similar, el nivel en sangre del factor VIII determinado por el ensayo Coatest (Figura 17a-b) reveló niveles significativamente elevados en la sangre de ratones trasplantados a las 14 semanas después del trasplante ( $63,4 \pm 49,6$  por ciento de niveles normales) en comparación con los niveles hallados en ratones factor VIII KO-SCID

(valores cero) y en ratones SCID no hemófilos ( $102 \pm 31,2$  por ciento). Teniendo en cuenta que los estados hemófilos grave, moderado y leve, definidos por el porcentaje de factor VIII están por debajo de 1, 4 y 6 por ciento, respectivamente, es significativo que los niveles en el grupo completo de ratones trasplantados variaran por encima de esas cantidades (entre 7 y 100 por cien de la actividad del factor VIII).

5 Finalmente, cuando se expusieron a corte de la cola, 7 de los 7 ratones implantados sobrevivieron, mientras que casi todos los ratones de control sin implante murieron por hemorragia en un periodo de 24 horas (Tabla 9).

**Tabla 9. Supervivencia después del corte de la cola.**

Cepa de ratón	Tratamiento	Frecuencia de supervivencia
SCID	Ninguno	5/5
SCID	Trasplante de bazo E42	3/3
Factor VIII KO-SCID	Ninguno	1/13
Factor VIII KO-SCID	Trasplante de bazo E42	7/7

10 **Análisis:** tomados juntos, los resultados desvelados en el presente documento muestran por primera vez la viabilidad de usar tejido de bazo embrionario, antes de la aparición de linfocitos T en el tejido, para la corrección de una deficiencia genética.

15 La hemofilia A es una enfermedad hemorrágica provocada por deficiencia del factor VIII. La terapia de reemplazo del factor VIII puede reducir la hemorragia pero es cara, inconveniente y con frecuencia complicada por el desarrollo de anticuerpos que inhiben la actividad del factor VIII en el 30 por ciento de los pacientes. Claramente, una nueva fuente alternativa de factor VIII, tal como tejido de bazo embrionario, podría abrir nuevas modalidades de tratamiento que podrían proporcionar beneficios a largo plazo a los pacientes con hemofilia A.

20 Un obstáculo importante para la implementación de alo o xenotrasplante embrionario en pacientes se relaciona con su inmunogenicidad potencial. Por lo tanto, el problema de la inmunosupresión es crítico, y se requieren estudios adicionales en modelos de animales grandes para definir si puede inducirse inmunotolerancia a largo plazo hacia el bazo embrionario implantado con toxicidad mínima. Numerosos estudios durante las últimas cuatro décadas han sugerido que los tejidos embrionarios son menos propensos a rechazo inmunitario (19-22). No obstante, exactamente cuánta y durante cuánto tiempo se requerirá supresión inmunitaria para permitir el injerto de tejido de bazo fetal determinará su aplicabilidad para tratar enfermedades heredadas monogénicas. Los resultados preliminares sugieren que el bazo de cerdo E42 es mucho menos inmunogénico en comparación con el tejido de bazo fetal obtenido en puntos temporales posteriores o en comparación con el bazo adulto (no mostrado) y, además, la implantación en ratones inmunocompetentes sugiere que el rechazo puede prevenirse por bloqueo coestimulador, que se sabe que también inhibe eficazmente la producción de anticuerpos. Por lo tanto, podría ser posible en el futuro abordar el problema de los anticuerpos inhibidores anti factor VIII mediante estrategias que combinaran el trasplante neonatal del bazo fetal con bloqueo coestimulador a corto plazo u otras modalidades inductoras de tolerancia leve. Sin embargo, teniendo en cuenta que dichos enfoques se asociarán con algunos riesgos, se prevé que el trasplante de bazo fetal será más adecuado en enfermedades para las que no haya terapia actualmente disponible. Aunque se demuestra en el presente documento como prueba de principio que el trasplante del bazo fetal puede aliviar deficiencias genéticas en ratones hemófilos, la evaluación clínica de este enfoque se justificará inicialmente en otras enfermedades tales como fenilcetonuria (PKU) o deficiencia de ornitina transcarbamilasa (OTC), para las que no está disponible terapia de reemplazo con una enzima o factor exógeno.

40 Un segundo problema importante que debe abordarse en estudios adicionales se relaciona con la elección del tejido fetal. Como prueba de principio, se evaluó el potencial del tejido embrionario de cerdo. Varias preocupaciones sobre la seguridad, en particular los peligros potenciales asociados con retrovirus endógenos (PERV), han presentado obstáculos importantes para esta aplicación (23-25). Sin embargo, es importante observar que los xenotrasplantes de cerdo a humano previos no han revelado ni un solo caso de transmisión de PERV a un sujeto humano (26). Además, un estudio reciente ha sugerido que los PERV podrían erradicarse de piaras criadas para xenotrasplante (27). Por lo tanto, como se ha sugerido recientemente por Ogata y Platt (28), aunque el peligro potencial de PERV para la salud pública no puede descartarse completamente, debería enfocarse con una atención cuidadosa para los reactores de xenoinjertos, en lugar de ser necesario abandonar los estudios de xenotrasplantes. Sin embargo, el tejido embrionario de cerdo, aunque evita los problemas éticos asociados con las células madre o tejidos embrionarios humanos, podría ser más propenso a su rechazo en comparación con el tejido de bazo fetal humano.

45 Por lo tanto, el uso de tejido de bazo fetal humano de abortos tempranos, si se considera éticamente aceptable, representa una fuente de tejidos potencialmente superior. El tiempo de gestación óptimo para recoger tejido de bazo humano se está investigando actualmente en ratones SCID.

En conclusión, independientemente de las modalidades de supresión inmunitarias que se requerirán y deben definirse en modelos de animales grandes, los datos desvelados en el presente documento proporcionan una prueba de concepto del potencial curativo de tejido de bazo embrionario, sin linfocitos T, como una nueva fuente de trasplante en pacientes con deficiencias genéticas.

Se apreciará que ciertas características de la invención, que se describen, para mayor claridad, en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. Por el contrario, también pueden proporcionarse diversas características de la invención que se describen, para mayor brevedad, en el contexto de una única realización, por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

Aunque la invención se ha descrito junto con realizaciones específicas de la misma, resulta evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán manifiestas para los expertos en la materia. Además, la citación o identificación de cualquier referencia en la presente solicitud no se interpretará como una admisión de que dicha referencia está disponible como técnica anterior a la presente invención.

## REFERENCIAS CITADAS

(Se citan Referencias Adicionales en el texto)

1. G. J. Nabel, *Nat Med* 10, 135 (Feb, 2004).
2. S. Gonnely *et al.*, *Blood* 91, 3273 (1 Mayo, 1998).
3. A. Tiede *et al.*, *Gene Ther* 10, 1917 (Oct, 2003).
4. A. e. a. Van Damme, *Haemophilia* 9 (2003).
5. H. Do, J. F. Healey, E. K. Waller, P. Lollar, *J Biol Chem* 274, 19587 (9 Jul, 1999).
6. A. A. Ashrani *et al.*, *Haemophilia* 10, 735 (Nov, 2004).
7. J. H. Lewis, F. A. Bontempo, J. A. Spero, M. V. Ragni, T. E. Starzl, *N Engl J Med* 312, 1189 (2 May, 1985).
8. T. L. Marchioro, C. Hougie, H. Ragde, R. B. Epstein, E. D. Thomas, *Science* 163, 188 (10 Ene, 1969).
9. C. G. Groth *et al.*, *Surgery* 75, 725 (May, 1974).
10. J. J. Veltkamp *et al.*, *Transplantation* 18, 56 (Jul, 1974).
11. W. E. Hathaway *et al.*, *Transplantation* 7, 73 (Ene, 1969).
12. W. Z. Xiang, Z. W. Jie, X. S. Sheng, *Transplant Proc* 34, 1929 (Ago, 2002).
13. F. J. Dor, B. Gollackner, D. K. Cooper, *Transpl Int* 16, 451 (Jul, 2003).
14. C. G. Groth *et al.*, *Lancet* 1, 1260 (19 Jun, 1971).
15. M. H. Pappworth, *Lancet* 2, 220 (24 Jul, 1971).
16. B. e. a. Dekel, *Nat Med* 9, 53 (2003).
17. S. Eventov-Friedman *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2928 (22 Feb, 2005).
18. M. K. Chuah *et al.*, *Blood* 101, 1734 (1 Mar, 2003).
19. P. B. Medawar, *Symp. Soc. Exp. Biol.* 7,320 (1953).
20. G. Erdag, J. R. Morgan, *Transplantation* 73, 519 (27 Feb, 2002).
21. R. P. Foglia, M. LaQuaglia, J. DiPreta, P. K. Donahoe, *J Pediatr Surg* 21, 608 (Jul, 1986).
22. R. P. Foglia, J. DiPreta, M. B. Statter, P. K. Donahoe, *Ann Surg* 204, 402 (Oct, 1986).
23. G. A. e. a. Langford, *Transplantation* 72, 1996 (2001).
24. S. J. Tacke, K. Bodusch, A. Berg, J. Denner, *Xenotransplantation* 8, 125 (May, 2001).
25. R. B. e. a. Elliott, *Cell Transplant* 9, 895 (2000).
26. K. Paradis *et al.*, *Science* 285, 1236 (20 Ago, 1999).
27. D. A. e. a. Clark, *Xenotransplantation* 10, 142 (2003).
28. K. Ogata, J. L. Platt, *J Heart Lung Transplant* 23, 515 (May, 2004).

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Yeda Research And Development Co. Ltd. Reisner, Yair Dekel, Benjamin Eventov-friedman, Smadar Katchman, Helena Shezen, Elias Aronovitch, Anna Tchorsh, Dalit

<120> TRATAMIENTO DE ENFERMEDAD MEDIANTE NO SINGÉNICOS EN DESARROLLO

<130> 30014

<160> 6

<170> Patent In versión 3.3

<210> 1

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

	<220>		
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario		
5	<400> 1	catggacctg cttcac	16
	<210> 2		
	<211> 20		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario		
15	<400> 2	tgacacatga ttaatcccg	20
	<210> 3		
	<211> 16		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario		
25	<400> 3	tgtggcagct cagaat	16
	<210> 4		
	<211> 17		
30	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario		
35	<400> 4	accgatgtgg ttactcc	17
	<210> 5		
	<211> 16		
40	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario		
45	<400> 5	ctgcgacttc aacagc	16
	<210> 6		
	<211> 17		
50	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario		
55	<400> 6	ggtgcagcga actttat	17
	<210> 7		
	<211> 18		
60	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de un injerto de órgano/tejido vascularizado pancreático de mamífero no humano para la fabricación de un medicamento para proporcionar una función pancreática a un sujeto mamífero, en donde dicho injerto de órgano/tejido vascularizado pancreático está en un estadio del desarrollo correspondiente al de un órgano/tejido pancreático porcino en un estadio gestacional seleccionado de un intervalo de 42 a 56 días de gestación.
- 10 2. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho injerto de órgano/tejido vascularizado pancreático no es singénico con el sujeto.
- 15 3. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho injerto de órgano/tejido vascularizado pancreático es xenogénico con el sujeto.
4. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho injerto de órgano/tejido vascularizado pancreático es de origen porcino.
5. El uso de la reivindicación 1, en el que el sujeto es un ser humano.
- 20 6. El uso de la reivindicación 1, en el que el sujeto tiene una actividad anómala de una biomolécula producida de forma natural por un páncreas de mamífero.
7. El uso de la reivindicación 1, en el que el sujeto tiene una actividad anómala de una biomolécula producida de forma natural por un islote pancreático de mamífero.
- 25 8. El uso de la reivindicación 6, en el que dicha biomolécula es insulina.
9. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho injerto de órgano/tejido vascularizado pancreático está en un estadio de desarrollo correspondiente al de un órgano/tejido pancreático porcino en un estadio gestacional de 56 días de gestación.

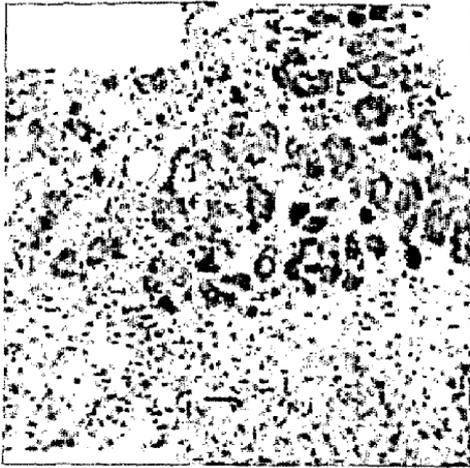


Fig. 1a

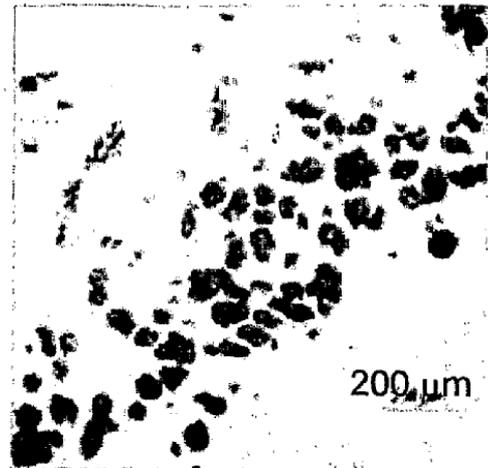


Fig. 1b

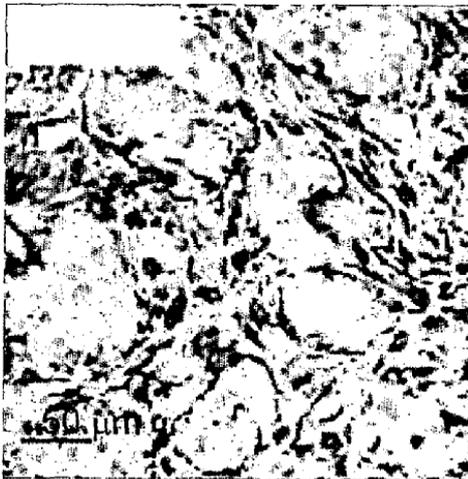


Fig. 1c

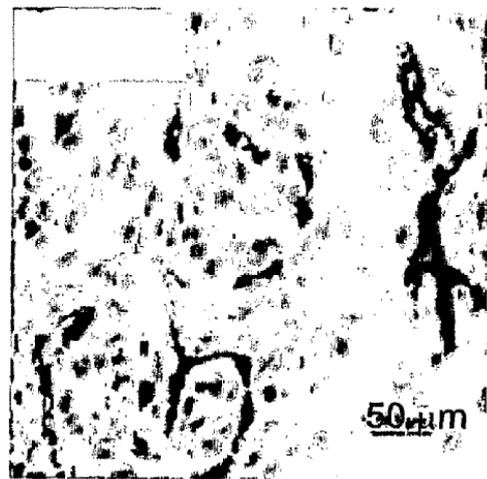


Fig. 1d

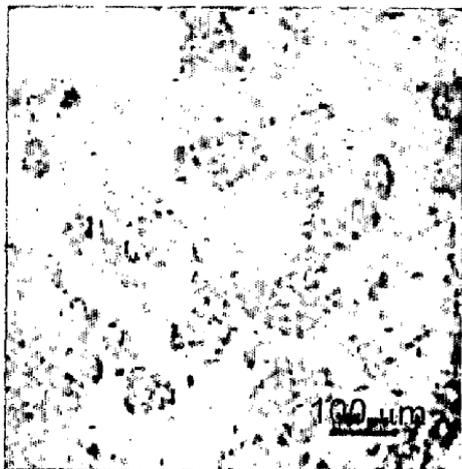


Fig. 1e

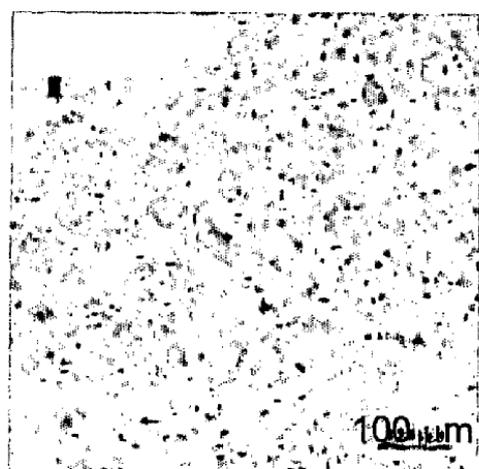


Fig. 1f



Fig. 2a



Fig. 2b

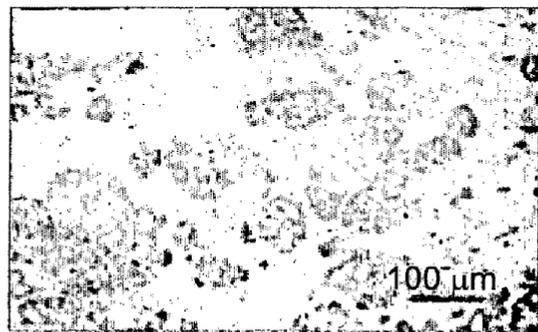


Fig. 2c

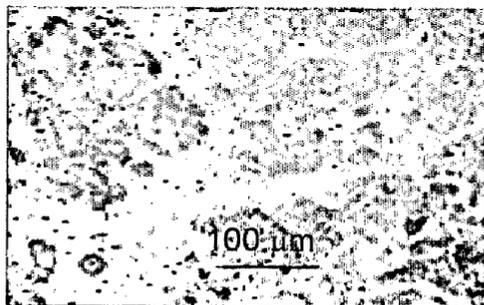


Fig. 2d

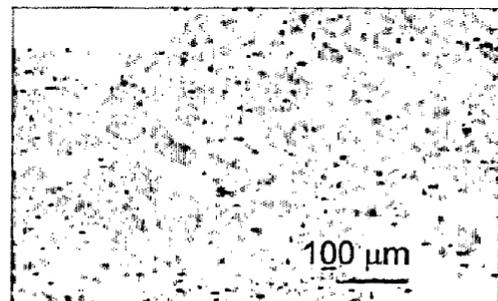


Fig. 2e

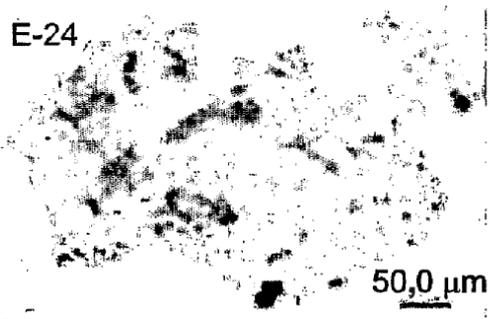
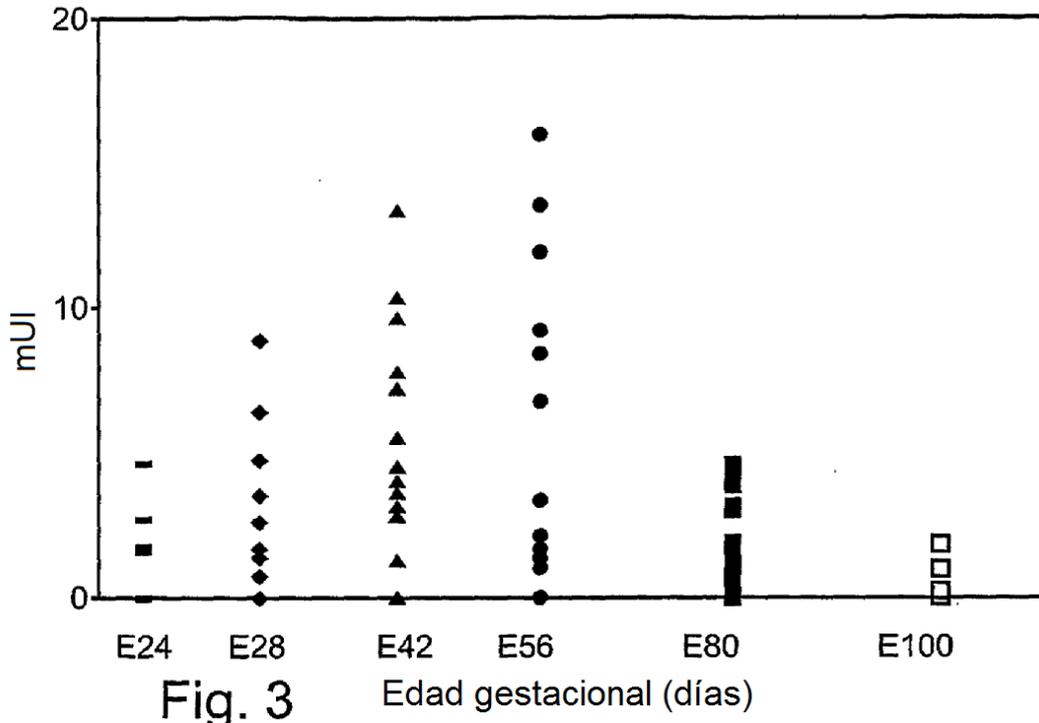


Fig. 4a

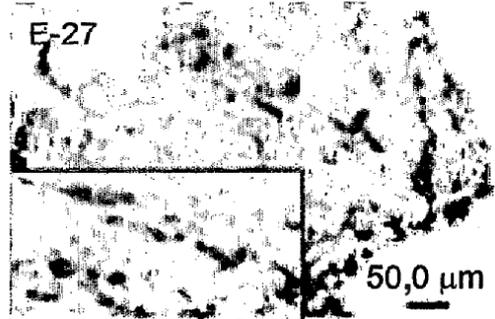


Fig. 4b

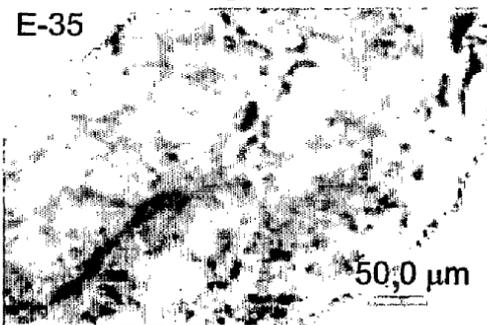


Fig. 4c

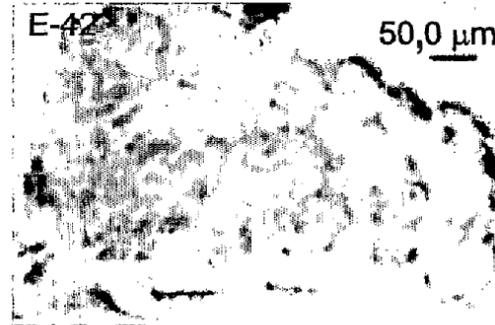


Fig. 4d

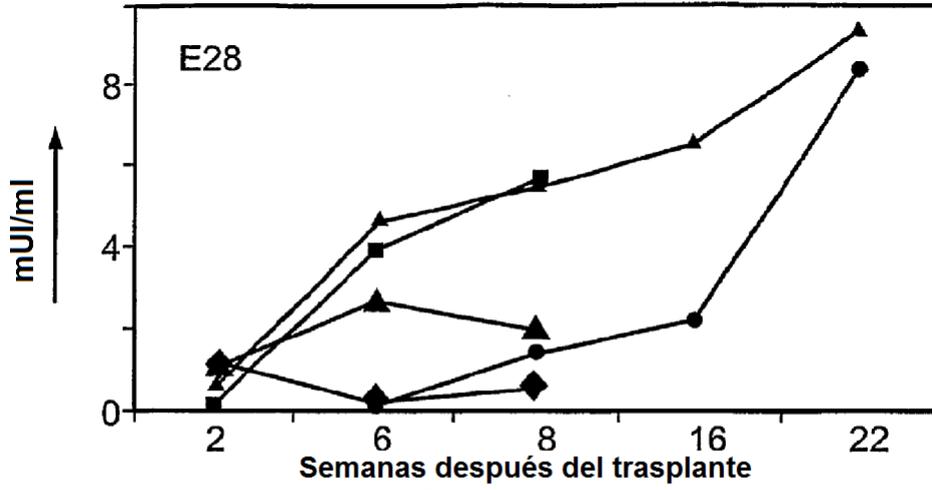


Fig. 5a

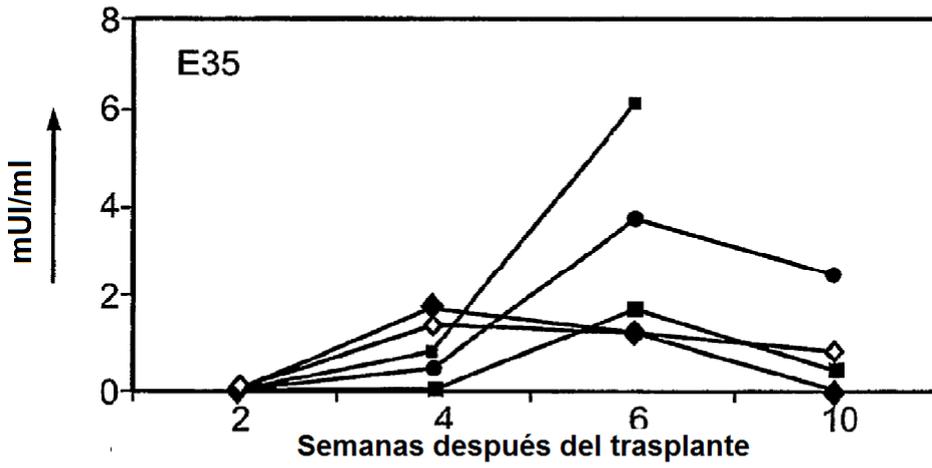


Fig. 5b

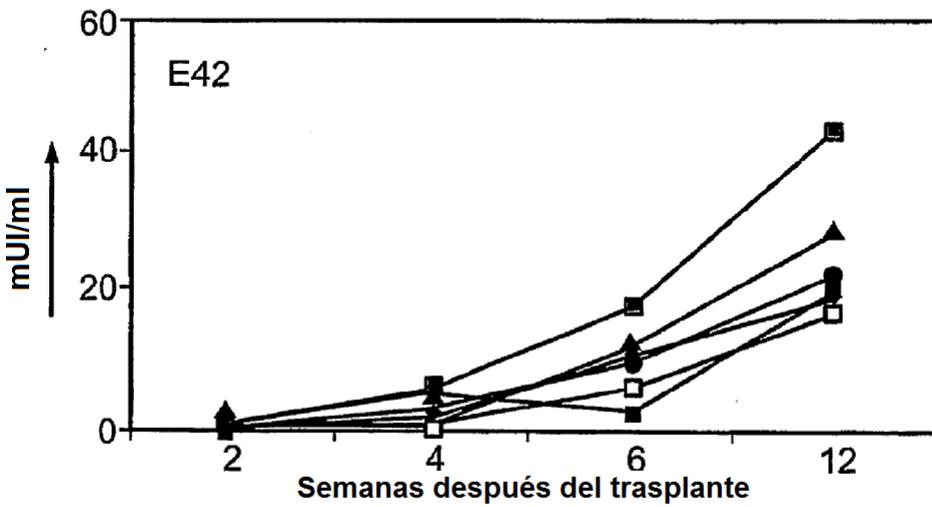


Fig. 5c

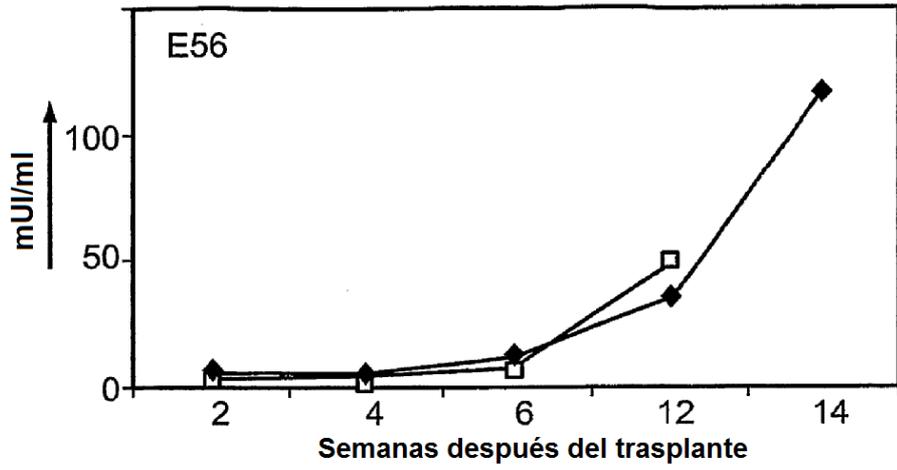


Fig. 5d

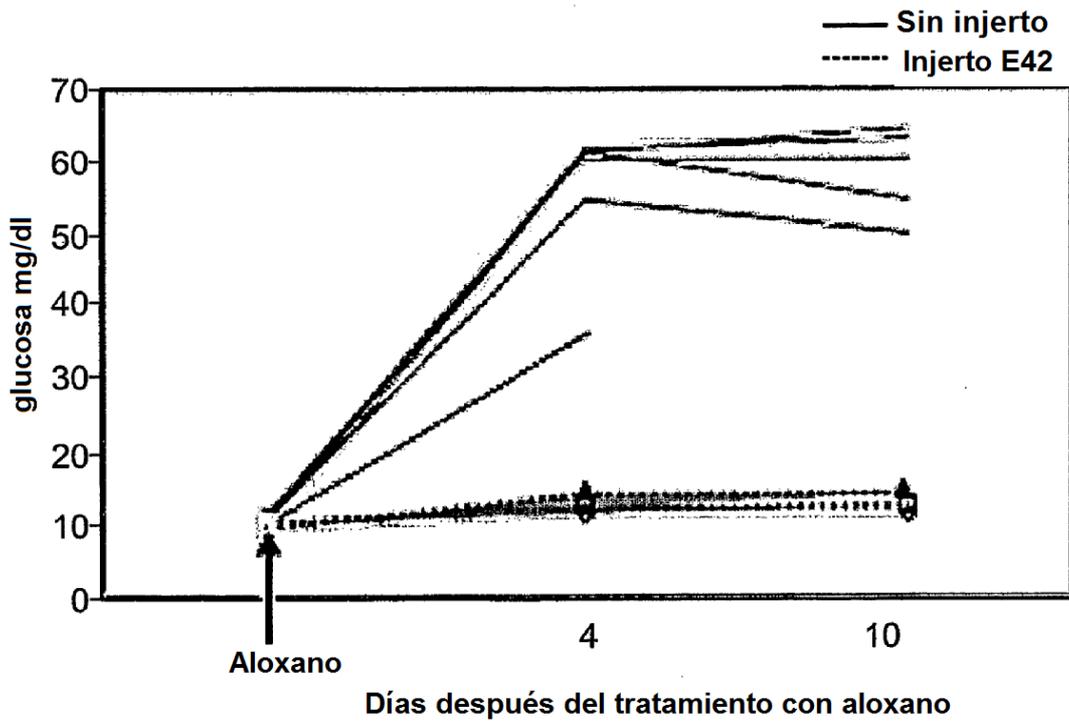


Fig. 6

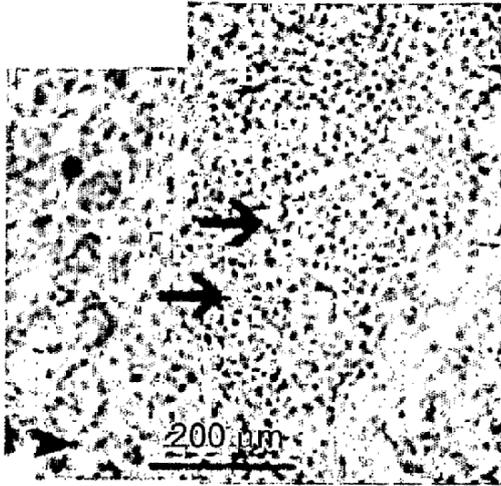


Fig. 7a

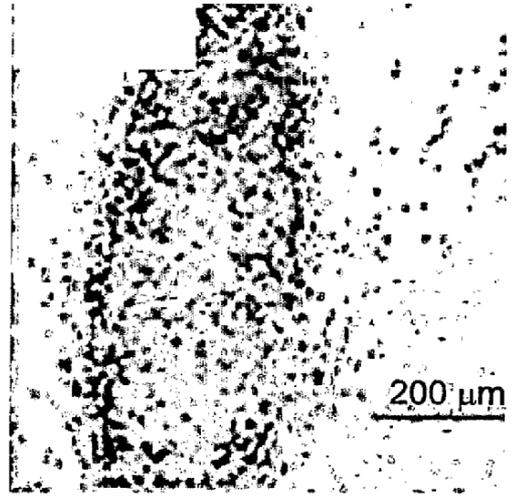


Fig. 7b

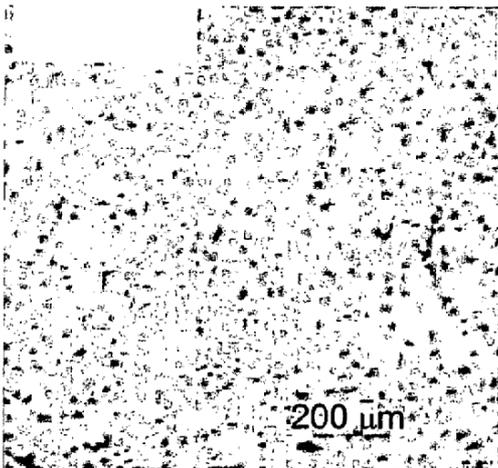


Fig. 7c

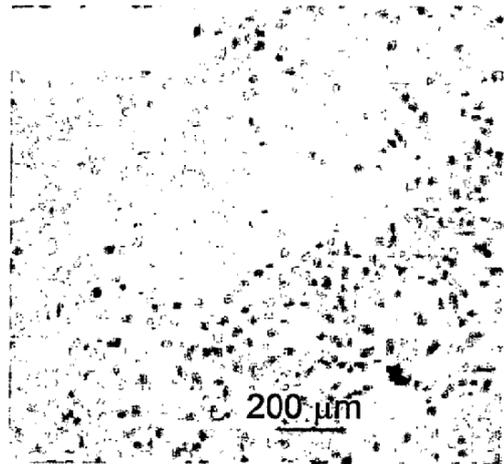


Fig. 7d



Fig. 8a

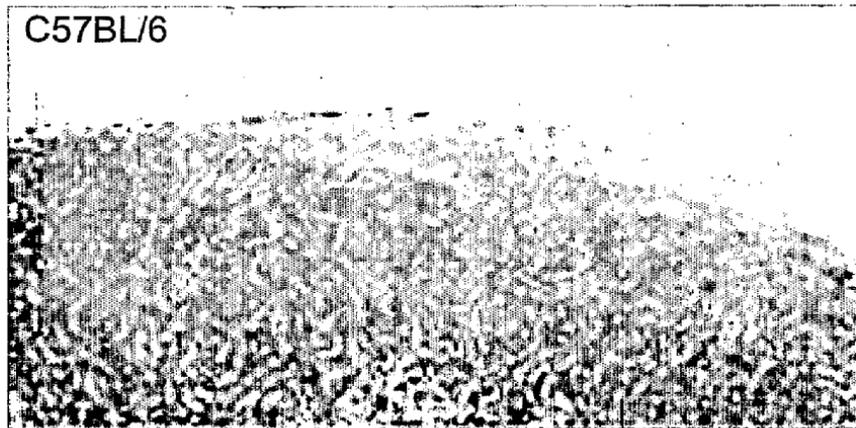


Fig. 8b

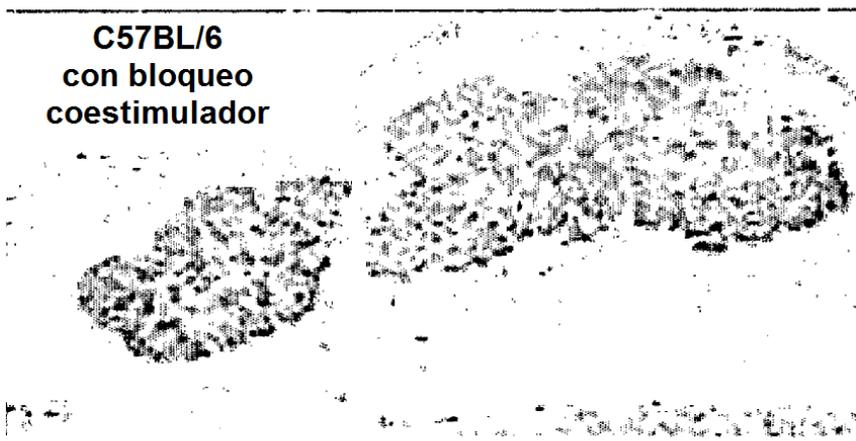


Fig. 8c



Fig. 9a



Fig. 9b



Fig. 9c

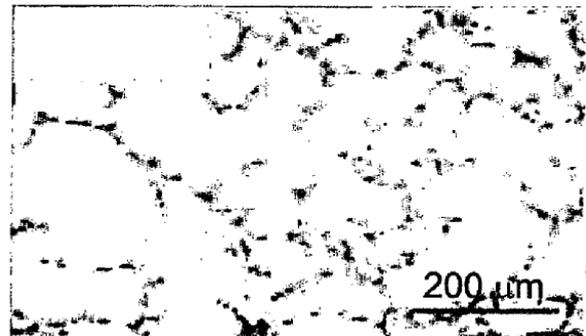


Fig. 9d

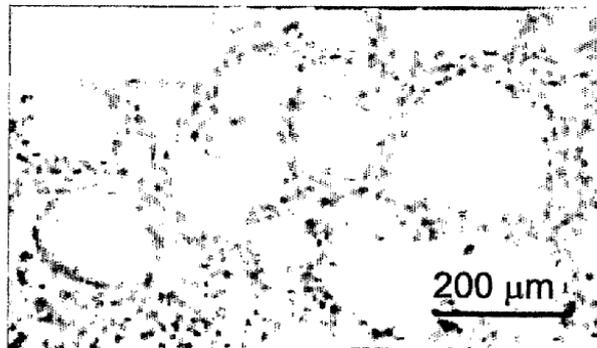


Fig. 9e

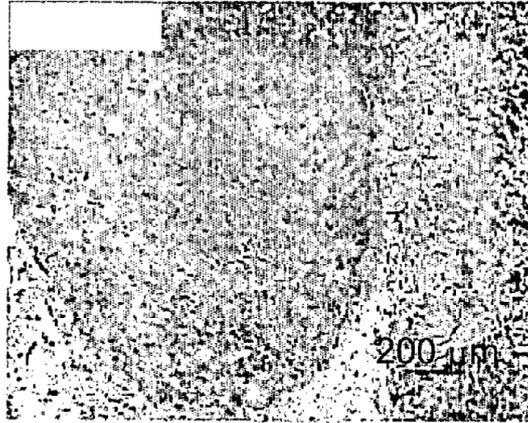


Fig. 10a



Fig. 10b

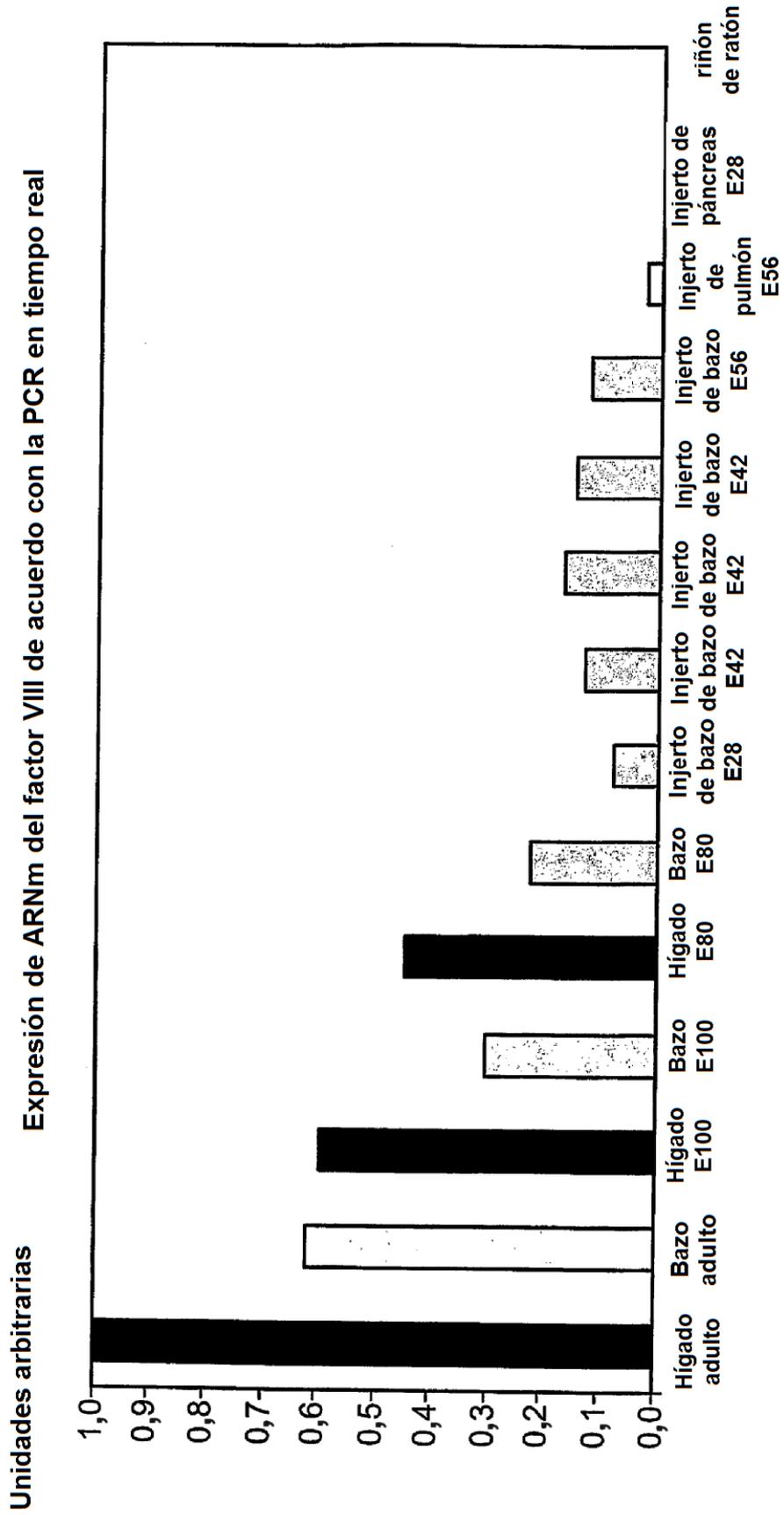
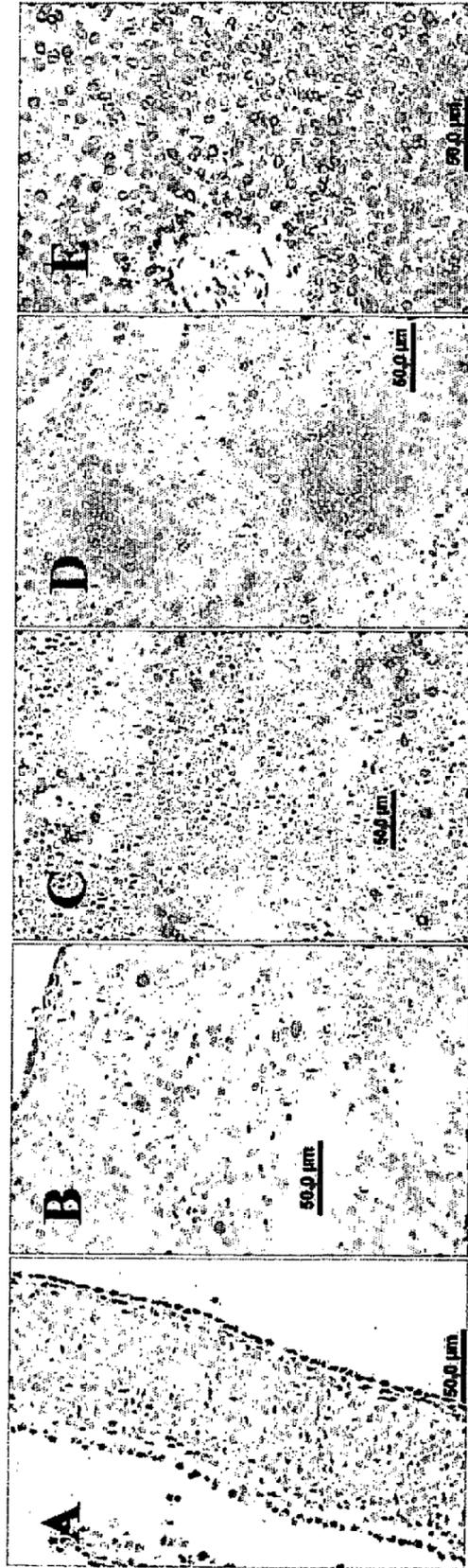


Fig. 11

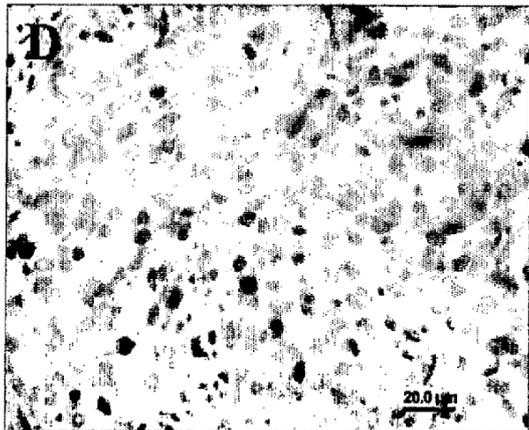
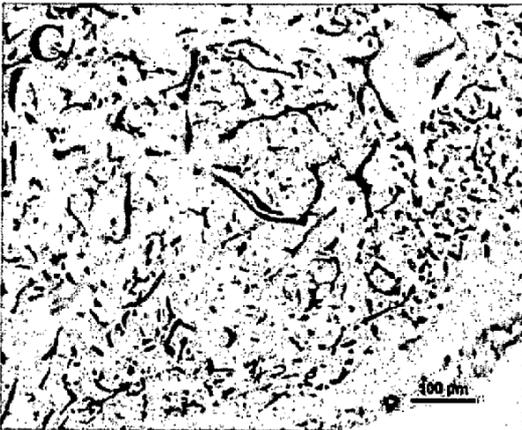
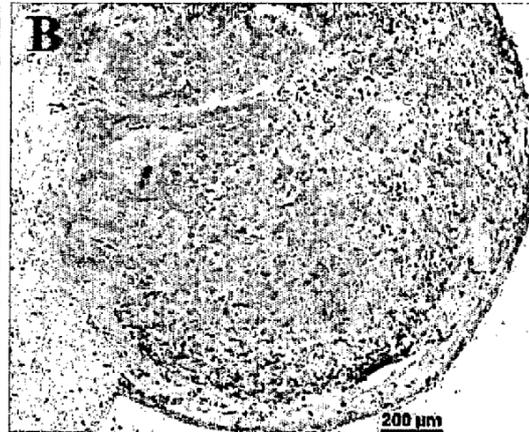
**Fig. 12a**   **Fig. 12b**   **Fig. 12c**   **Fig. 12d**   **Fig. 12e**



**Fig. 13a**



**Fig. 13b**



**Fig. 13c**

**Fig. 13d**

**Fig. 14**

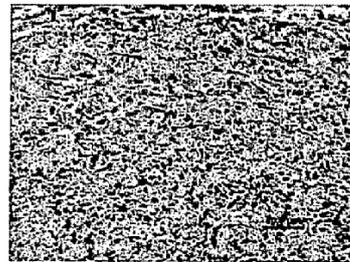
**2 MESES**

**3 MESES**

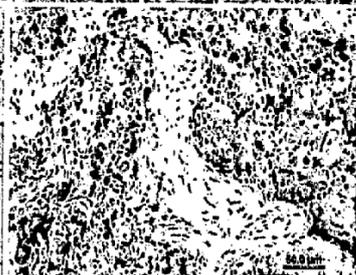
**LAMININA**



**TER-119**



**MAC-1**



**Fig. 15**

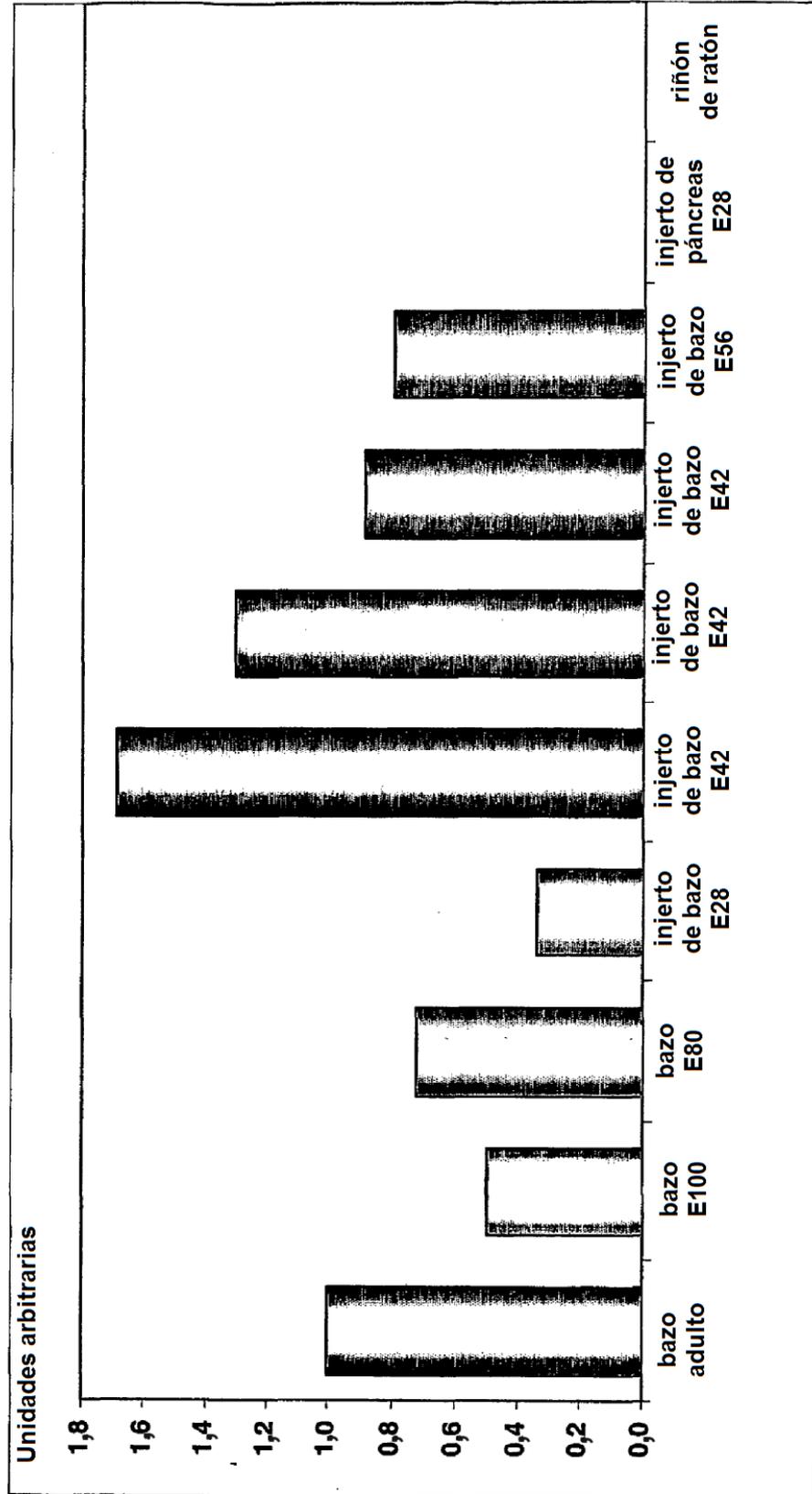
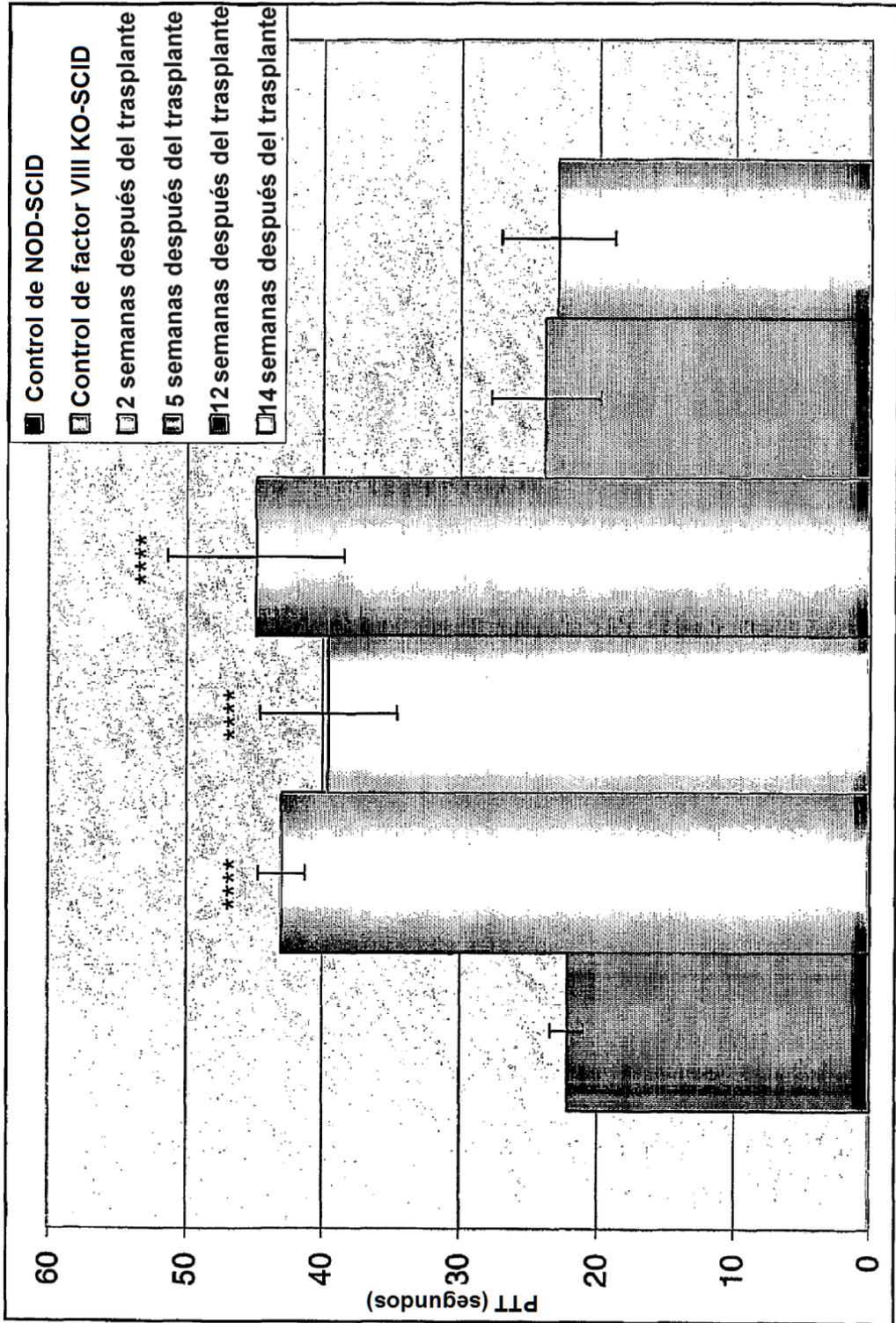
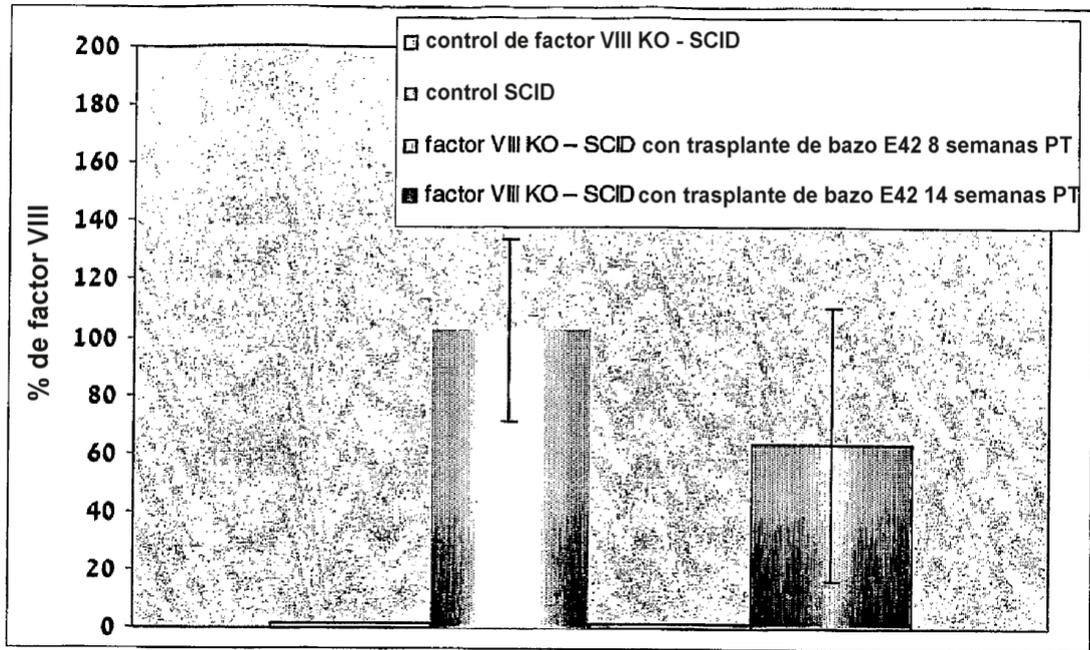


Fig. 16



**Fig. 17a**



**Fig. 17b**

