

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 676**

51 Int. Cl.:

C12N 5/00 (2006.01)

A61F 2/02 (2006.01)

A61K 35/42 (2006.01)

A61K 35/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2005 E 11193959 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014 EP 2453008**

54 Título: **Tratamiento de enfermedades por medio del 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:

14.04.2015

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
(100.0%)**

**At the Weizmann Institute of Science P.O. Box 95
76100 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 533 676 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 enfermedades por medio del trasplante de injertos no singénicos en desarrollo

5 La presente invención se refiere a un injerto pulmonar de un mamífero no humano en desarrollo para generar tejido pulmonar para el uso en el tratamiento de una enfermedad pulmonar o una insuficiencia pulmonar en un sujeto mamífero que necesite del mismo de acuerdo con la reivindicación 1.

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

15 La diabetes es una enfermedad debilitante y potencialmente letal que se desarrolla en aproximadamente el 5 por ciento de la población mundial. Solamente en los Estados Unidos, un número estimado de 18 millones de personas tienen diabetes mellitus, y cada año aproximadamente 1 millón de americanos de 20 años de edad o mayores son diagnosticados con la enfermedad. Es la sexta mayor causa de muerte en los Estados Unidos y es responsable de más de 200.000 muertes al año. Las personas con diabetes tienen un déficit 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 la secreción de la insulina. La terapia convencional para la diabetes, de inyecciones diarias de insulina, no previene satisfactoriamente las consecuencias debilitantes y letales de esta enfermedad.

20 La insuficiencia pulmonar es una afección altamente debilitante y potencialmente letal que puede aparecer a partir de numerosos tipos de enfermedades, incluyendo la fibrosis quística, enfisema, fibrosis pulmonar o hipertensión pulmonar. Mientras que puede emplearse el trasplante de pulmón como un último recurso para tratar dichas enfermedades, existe un suministro insuficiente de órganos donantes, con un cuarto de los candidatos fallecidos en la lista de espera y estableciéndose el límite de inscripción a menudo en los 60 años de edad. La mortalidad postoperatoria a los dos meses es de aproximadamente el 15 por ciento y se relaciona con una disfunción del injerto, infección, complicaciones bronquiales. La supervivencia a los cinco años es aun solamente de aproximadamente el 50 por ciento.

25 El defecto genético que causa la hemofilia A afecta a aproximadamente uno de cada 10.000 varones. Debido a la deficiencia de la coagulación resultante, aquellos que padecen la enfermedad padecen episodios hemorrágicos graves debidos a pequeñas heridas, hemorragias internas y hemorragias en las articulaciones, lo que conduce a artropatía, la causa principal de morbilidad en la hemofilia. Los niveles normales del factor VIII están en un promedio de entre 50 a 200 ng/ml de plasma sanguíneo (Mannucci, P. M. en Practical Laboratory Hematology, ed. Koepke, J. A., Churchill Livingstone, N.Y., págs.: 347-371, 1990); sin embargo, los pacientes que padecen hemofilia A de leve a moderada típicamente tienen niveles plasmáticos muy por debajo de los 2-60 ng/ml, mientras que los niveles por debajo de aproximadamente 2 ng/ml dan como resultado la hemofilia grave.

35 El tratamiento de las enfermedades hematológicas/metabólicas tales como la hemofilia A y la enfermedad de Gaucher generalmente se efectúa por medio de terapia de reemplazo enzimático. Sin embargo, la terapia de reemplazo enzimático tiene numerosas desventajas significativas, incluyendo la necesidad de administrar la enzima de reemplazo por medio de inyección, un proceso doloroso, inconveniente y caro. La administración de dosis discontinuas de una enzima de reemplazo además no consigue alcanzar los niveles fisiológicos continuamente ajustados de la enzima de acuerdo con la necesidad fisiológica, tal como se alcanzarían por una población celular productora de enzimas normal. Por lo tanto, la terapia de reemplazo enzimático en las enfermedades hematológicas/metabólicas no consigue en muchos casos alcanzar el tratamiento satisfactorio/óptimo de la enfermedad.

40 El trasplante de los injertos pancreáticos o pulmonares de haplotipo coincidente completamente diferenciados a partir de donantes en la etapa postgestacional es un procedimiento médico de elección, que salva vidas, para reemplazar los órganos lesionados o enfermos tales como el páncreas o el pulmón. Dicha modalidad de tratamiento, sin embargo, adolece de considerables desventajas. El trasplante alogénico de órganos/tejidos pancreáticos o pulmonares diferenciados es imposible de implementar en una gran parte de los casos debido a la no disponibilidad de donantes de trasplantes inmunológicamente compatibles adecuados. Además, el uso de donantes humanos para proporcionar órganos/tejidos para el trasplante a menudo presenta riesgos para la salud y dilemas éticos. Por lo tanto, un gran número de pacientes que podrían beneficiarse de otro modo del trasplante terapéutico sucumben a enfermedades asociadas con la insuficiencia pancreática o pulmonar mientras esperan a los donantes de trasplantes compatibles. Además, incluso cuando se encuentran los donantes de trasplantes adecuados de haplotipos coincidentes, se requieren generalmente tratamientos inmunosupresores permanentes y dañinos, tales como la administración diaria de ciclosporina A, para prevenir el rechazo de los trasplantes. El uso de fármacos tales como la ciclosporina A puede ser indeseable pero el beneficio del trasplante para salvar la vida supera al riesgo del tratamiento inmunosupresor. La terapia inmunosupresora sin embargo es altamente indeseable ya que ésta causa efectos secundarios graves tales como la carcinogenicidad, nefrototoxicidad y la susceptibilidad aumentada a infecciones oportunistas. Los tratamientos inmunosupresores contribuyen a los inconvenientes de los trasplantes

allogénicos dado que éstos a menudo no son exitosos en la prevención del rechazo a corto plazo, y generalmente son incapaces de prevenir el rechazo a largo plazo. El rechazo agudo de los injertos trasplantados a menudo es mortal.

5 Una alternativa al trasplante de aloinjertos implica el trasplante de xenoinjertos, es decir, el trasplante de injertos derivados de animales, en particular los injertos porcinos, que están bien establecidos como una alternativa en animales potencial para injertos en humanos. Las grandes ventajas de usar xenoinjertos para el trasplante son su disponibilidad en demanda a todos los pacientes que necesiten un trasplante, así como la evitación de la carga médica y ética de recoger injertos de donantes humanos vivos o cadavéricos. Sin embargo, hasta la fecha, los
10 injertos de órganos/tejidos xenogénicos se han descartado para el trasplante en humanos debido a su hasta ahora insalvable incompatibilidad inmunológica con los receptores humanos.

Una estrategia potencialmente efectiva para tratar enfermedades que son el resultado de o están asociadas con la actividad anormal de al menos una biomolécula (por ejemplo, enfermedades monogénicas, hematológicas, metabólicas) tales como la hemofilia A y la enfermedad de Gaucher podrían implicar el trasplante de tejidos/órganos linfoides de donantes no singénicos, tales como el bazo, que son potencialmente capaces de generar niveles terapéuticos de distintos productos génicos tales como el factor VIII o la glucocerebrosidasa que respectivamente son deficientes en dichas enfermedades. Tal como se describe anteriormente, sin embargo, el estado de la técnica del trasplante terapéutico generalmente permanece asociado con desventajas críticas.

Por lo tanto, en vista de los beneficios curativos potenciales únicos de la terapia de trasplante, existe claramente una necesidad urgente y duradera de órganos/tejidos pancreáticos, pulmonares y linfoides/hematopoyéticos derivados de donantes no singénicos, que puedan obtenerse en cantidades suficientes, y que puedan tolerarse inmunológicamente de forma óptima, así como para viabilizar el trasplante terapéutico de dichos órganos/tejidos rutinario y con la eficacia óptima.

Una estrategia, que se ha propuesto para cumplir este objetivo implica el uso de injertos en la etapa gestacional para el trasplante. Dicho enfoque es prometedor dado que se ha mostrado que la tolerancia inmunológica a injertos derivados del tejido de la etapa gestacional es mejor que la de los injertos derivados de tejidos la etapa adulta (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, la potenciación del crecimiento y la diferenciación potencial de los injertos de la etapa gestacional con respecto a los injertos diferenciados es altamente deseable para generar injertos óptimamente funcionales, integrados en el hospedador. Por ejemplo, las células de los islotes pancreáticos fetales, tales como las células beta productoras de insulina, muestran un crecimiento celular y diferenciación potenciados con respecto a las células de los islotes beta diferenciados.

El potencial de los injertos renales porcinos (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) en la etapa gestacional para generar órganos/tejidos funcionales después del trasplante en hospedadores no singénicos se ha descrito ampliamente. También se ha demostrado el potencial de los injertos pulmonares humanos (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) en la etapa gestacional para generar órganos/tejidos que tienen una función específica del órgano después del trasplante en hospedadores no singénicos.

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

Por ejemplo, se ha mostrado que los islotes fetales humanos, incluyendo las células secretoras de insulina más tempranas, trasplantados en ratas y ratones desnudos muestran un crecimiento y desarrollo continuo, incluyendo la producción de las otras hormonas pancreáticas: glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático (Usadel *et al.*, 1980. *Diabetes* 29 Supl 1: 74-9). De modo similar, se ha mostrado que los injertos derivados de páncreas embrionario humano trasplantado en ratones NOD/SCID, generaron células beta humanas productoras de insulina derivadas del injerto (Castaing M. *et al.*, 2001. *Diabetologia* 44: 2066). Los trasplantes de islotes porcinos en la etapa gestacional en ratones pueden mostrar un programa de diferenciación similar, con tiempos similares, al de los tejidos normales no trasplantados.

Otros ejemplos incluyen el trasplante de células de los islotes porcinos en la etapa 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 roedores inmunodeficientes (Fox A. *et al.*, 2002. *Xenotransplantation* 9: 382-92; Amaratunga A. *et al.*, 2003. *Xenotransplantation* 10: 622-7), de islotes humanos fetales en ratones y ratas desnudos (Beattie GM. *et al.*, 1997. *Diabetes* 46: 244-8); y de tejido de islotes porcinos fetales en ratones desnudos (Korbitt GS. *et al.*, 1996. *J Clin*

Invest. 97: 2119-29). Otro enfoque implica el trasplante de grupos de células similares a las de los islotes porcinos fetales en monos *Cynomolgus* (Soderlund J. *et al.*, 1999. Transplantation 67: 784-91). Aún otro enfoque implica el trasplante intratesticular de islotes porcinos neonatales en sabuesos no inmunosuprimidos (Gores PF. *et al.*, 2003. Transplantation 75: 613-8).

Adicionalmente, se han hecho intentos de trasplantar tejidos pancreáticos porcinos fetales en receptores diabéticos humanos (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).

El documento US 2003/0198628 de Hammerman divulga 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 preferente aproximadamente el día E29.

Las Solicitudes de Patentes de EE.UU. N° 20040082064 y 20040136972, para algunos de los inventores de la presente solicitud, sugieren tratar la enfermedad pancreática en humanos mediante trasplante de injertos de órganos/tejidos pancreáticos porcinos en la etapa del desarrollo de los 20-28 días de gestación, y enseña que la etapa gestacional óptima de cualquier tipo de injerto de órgano/tejido porcino para el trasplante terapéutico está a los 27-28 días de gestación.

Se han descrito en la técnica anterior diversos enfoques de la técnica anterior para usar injertos de órganos/tejidos pulmonares en desarrollo para el trasplante terapéutico.

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

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

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

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

- (i) tolerancia subóptima por los linfocitos del hospedador no singénico;
- (ii) diferenciación estructural y funcional subóptima del injerto, por ejemplo con respecto a la producción de insulina por medio de los injertos de órganos/tejidos pancreáticos;
- (iii) vascularización del injerto predominantemente derivada del injerto, en oposición a la derivada del hospedador, que conduce de este modo al rechazo inmunitario;
- (iv) crecimiento subóptimo;
- (v) disponibilidad inadecuada de órganos/tejidos trasplantables; y/o
- (vi) seguridad subóptima para la administración en humanos, notablemente con respecto a la evitación de la generación de teratomas derivados del injerto.

Los enfoques anteriores que emplean los tejidos no singénicos en desarrollo han sido uniformemente subóptimos dado que el tiempo óptimo de gestación para la implantación basándose en el riesgo de teratoma, crecimiento potencial e inmunogenicidad, todos los cuales pueden variar entre distintos órganos en el desarrollo fetal, no se caracterizó suficientemente.

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

DEKEL Benjamin *et al* se refiere a precursores tempranos de riñón humano y porcino como una nueva fuente para los trasplantes "Nature medicine, nature publishing group, NY, EE.UU., vol. 9, n°. 1, 1 de enero de 2003."

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

- 5 TSUJI K *et al* se refiere a si "un conjunto de injertos de órganos xenofetales (corazón, pulmón, riñón e hígado) puede escapar del rechazo hiperagudo en combinaciones experimentales discordantes en comparación con los xenoinjertos adultos" *transplantation proceedings*, vol. 29, nº 7, noviembre de 1997, páginas 3022-3023 y V Congreso Internacional de la sociedad de Oriente Medio para el trasplante de órganos, Limassol, Chipre, del 20 al 24 de octubre de 1996.
- FOGLIA R *et al* se refiere a que "la supervivencia del injerto fetal en los receptores inmunocompetentes es dependiente de la edad y específica del órgano", (*annals of surgery* vol. 204, nº 4, 1986, páginas 402-410).
- 10 Existe por lo tanto una necesidad ampliamente reconocida de, y podría ser altamente ventajoso tener, un método para tratar enfermedades humanas susceptibles del trasplante terapéutico mediante el trasplante de órganos/tejidos pancreáticos, pulmonares o linfoides/hematopoyéticos no singénicos en desarrollo desprovistos de las limitaciones anteriores.
- 15 El injerto pulmonar de un mamífero no humano en desarrollo para generar el tejido pulmonar para el uso en el tratamiento de una enfermedad pulmonar o una insuficiencia pulmonar en un sujeto mamífero que necesite del mismo se define en la reivindicación 1 de la presente invención.
- 20 La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de ventanas temporales adecuadas para el trasplante exitoso de órganos/tejidos pancreáticos, pulmonares o linfoides/hematopoyéticos no singénicos en desarrollo. Se divulga actualmente por primera vez que los injertos de órganos/tejidos pancreáticos no singénicos, tales como los injertos xenogénicos porcinos, en una etapa del desarrollo que esencialmente corresponde a aquella en la que el páncreas porcino está en una etapa gestacional de 42 a 56 días de gestación son óptimos para el crecimiento y desarrollo de órganos/tejidos pancreáticos productores de insulina. Se divulga además actualmente por primera vez que los injertos de órganos/tejidos linfoides/hematopoyéticos, tales como injertos de órganos/tejidos linfoides/hematopoyéticos xenogénicos porcinos, en una etapa de desarrollo que esencialmente corresponde a aquella en la que el bazo porcino está en una etapa 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 divulga aún más actualmente por primera vez que los injertos pulmonares no singénicos en una etapa de desarrollo, que esencialmente corresponde a aquella en la que el pulmón porcino está en una etapa gestacional de 56 a 80 días, son óptimos para el crecimiento y la diferenciación de órganos/tejidos pulmonares que comprenden alvéolos.
- 25
- 30 De acuerdo con aún otro aspecto de la presente invención se proporciona un método para generar un tejido pulmonar en un sujeto mamífero que necesite del mismo, comprendiendo el método trasplantar al sujeto un injerto pulmonar de un mamífero en desarrollo, en el que el injerto pulmonar está en una etapa de desarrollo que esencialmente corresponde con la del órgano/tejido pulmonar porcino de una etapa gestacional seleccionada de un intervalo de aproximadamente 42 a aproximadamente 80 días de gestación, generando por lo tanto tejido pulmonar en el sujeto.
- 35
- 40 De acuerdo con características adicionales en realizaciones preferidas de la invención que se describen a continuación, el injerto pulmonar está en una etapa de desarrollo que esencialmente se corresponde con la de un órgano/tejido pulmonar porcino en una etapa gestacional seleccionada de un intervalo de aproximadamente 56 a aproximadamente 80 días de gestación.
- 45
- De acuerdo con características aún adicionales de las realizaciones preferidas descritas, el injerto pulmonar es no singénico con respecto al sujeto.
- 50 De acuerdo con características aún adicionales de las realizaciones preferidas descritas; el injerto pulmonar es xenogénico con respecto al sujeto.
- De acuerdo con características aún adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el injerto de órgano/tejido pulmonar es de origen porcino.
- 55 La presente invención aborda exitosamente los inconvenientes de las configuraciones actualmente conocidas proporcionando nuevos injertos de órganos/tejidos pulmonares en desarrollo/no singénicos que están en etapas de desarrollo que permiten el tratamiento eficaz/óptimo en un receptor de los mismos de esencialmente cualquier enfermedad que sea susceptible del trasplante terapéutico de injertos de tejidos/órganos pulmonares, respectivamente.
- 60
- 65 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se usan en el presente documento tienen el mismo significado tal como se entiende comúnmente por un experto ordinario en la materia a la cual pertenece esta invención. A pesar de que algunos métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos que se describen en el presente documento pueden usarse en la práctica o el ensayo de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen a continuación. En caso de conflicto, estos serán controlados por la memoria

descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos solamente y no pretenden ser limitantes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5 La invención se describe en el presente documento, solamente a modo de ejemplo, con referencia a las figuras anexas. Con referencia específica ahora a las figuras en detalle, se hace hincapié en que las figuras particulares se muestran a modo de ejemplo y para fines de la explicación ilustrativa de las realizaciones preferentes de la presente invención solamente, y se presentan con el motivo de proporcionar la que se cree la que es la descripción más útil y
10 fácilmente entendible de los principios y aspectos conceptuales de la invención. En este respecto, no se hace ningún intento de mostrar los detalles estructurales de la invención en más detalle del que sea necesario para un entendimiento fundamental de la invención, la descripción tomada con las figuras hace aparente a aquellos expertos en la materia cómo se pueden realizar en la práctica las varias formas de la invención.

15 En las figuras:

Las FIGS. 1a-e son fotografías que representan el desarrollo del pulmón porcino en E56 y E80 a las 6 semanas después de la implantación bajo la cápsula renal. En la Figura 1a que representa el crecimiento del tejido trasplantado obtenido en E56 se ilustra macroscópicamente. La Figura 1b representa el tejido pulmonar teñido (H&E): bronquio respiratorio (flecha), bronquiólos (asteriscos) y alvéolos (cabezas de flecha). La Figura 1c
20 representa el cartílago teñido con azul alciano/PAS de los implantes pulmonares de E56. Las Figuras 1d-e representan la tinción con H&E de la estructura de la pared alveolar y el espesor de los implantes de E56 y E80, respectivamente.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES MENCIONADAS

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

Los principios y operación de la presente invención pueden entenderse mejor en referencia a las figuras y las descripciones anexas.

40 Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, se entenderá que la invención no se limita en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados mediante los Ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de practicarse o llevarse a cabo de diversos modos. También, se entenderá que la fraseología y terminología empleada en el presente documento es para el fin de la descripción y no debe considerarse como limitante.

45 El trasplante de órganos o tejidos es la terapia óptima o única para numerosas enfermedades pancreáticas, pulmonares y hematológicas/metabólicas altamente debilitantes/mortales. Sin embargo, los métodos actuales de trasplante terapéutico se han visto obstaculizados gravemente por fuentes inadecuadas de órganos/tejidos de donantes inmunológicamente y/o morfológicamente compatibles, y por el requisito permanente de tratamiento inmunosupresor altamente intensivo y perjudicial de los receptores del injerto para prevenir el rechazo al injerto. Las estrategias sugeridas para superar estos obstáculos implican usar injertos de órganos/tejidos en desarrollo/no singénicos, tales como injertos de cerdo o humanos en desarrollo - estando dichos injertos potencialmente disponibles en cantidades suficientes, y habiendo mostrado tener mejor tolerancia por receptores no compatibles que los injertos de órganos/tejidos completamente diferenciados en virtud de haberse derivado de donantes en la
50 etapa gestacional.

Sin embargo, todos los enfoques anteriores que implicaban el trasplante de órganos/tejidos pancreáticos, pulmonares o linfoides/hematopoyéticos en desarrollo/no singénicos adolecen de desventajas significativas, incluyendo: la tolerancia subóptima por los linfocitos del hospedador no singénico; diferenciación estructural y funcional subóptima del injerto, por ejemplo con respecto a la producción de insulina por los injertos de
60 órganos/tejidos pancreáticos; vascularización del injerto predominantemente derivada del injerto, en oposición a la derivada del hospedador, conduciendo de ese modo al rechazo inmunitario; crecimiento subóptimo; disponibilidad inadecuada de órganos/tejidos trasplantables; y/o seguridad subóptima para la administración en humanos, notablemente con respecto a la evitación de la generación de teratomas derivados del injerto.

65

Los enfoques anteriores que emplean injertos en desarrollo no singénicos han sido subóptimos de modo uniforme dado que el tiempo óptimo de gestación para la implantación basándose en el riesgo para teratomas, crecimiento potencial e inmunogenicidad, los cuales pueden variar entre los distintos órganos en el desarrollo fetal, no se caracterizó suficientemente. Además, la técnica anterior falla en enseñar cualquier método para practicar el trasplante terapéutico de injertos de órganos/tejidos linfoides en desarrollo no singénicos.

Mientras se reduce la presente invención a la práctica, los presentes inventores han descubierto etapas de desarrollo específicas de los injertos de órganos/tejidos pulmonares no singénicos durante las cuales éstos pueden trasplantarse en un receptor de modo que se generen, en ausencia de teratomas derivados de injerto, células, órganos y tejidos que muestran crecimiento, diferenciación estructural y funcional y requisitos de inmunosupresión mínima para el receptor óptimos.

Específicamente, mientras que se reducía la presente invención a la práctica, se descubrió lo siguiente; los xenoinjertos de órganos/tejidos pulmonares de cerdos en una etapa gestacional de 42 a 80 días de gestación pueden generar después del trasplante órganos/tejidos pulmonares bien desarrollados incluyendo estructuras alveolares.

Tal como se muestra más adelante en el presente documento y en la sección de los Ejemplos siguiente, los injertos terapéuticos de la presente invención se recogen en una ventana de desarrollo específica que transmite a estos injertos características de funcionalidad y resistencia que son superiores a los injertos proporcionados por la técnica anterior.

La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de distintas ventanas de tiempo gestacional óptimas para el trasplante terapéutico de órganos/tejidos pulmonares en la etapa de desarrollo. Existen tres criterios principales para seleccionar injertos en desarrollo/no singénicos para el trasplante terapéutico: (i) el injerto debería estar en una etapa de desarrollo lo suficientemente avanzada para ser capaz de generar un órgano/tejido estructuralmente y funcionalmente diferenciado, vascularizado por el hospedador *in situ*; (ii) el injerto debería estar en una etapa de desarrollo suficientemente avanzada para no inducir teratomas derivados del injerto; y (iii) el injerto debería estar a una etapa de desarrollo lo suficientemente temprana para que sea tolerado inmunológicamente de un modo óptimo por los linfocitos humanos no singénicos. A menudo existe una compensación entre estos tres criterios, siendo la funcionalidad del tejido u órgano el más urgente.

Tal 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.

Tal como se usa en el presente documento, el término "enfermedad" se refiere a cualquier enfermedad, trastorno, o afección o cualquier afección patológica o no deseada, estado, o síndrome, o a cualquier anomalía física, morfológica o fisiológica.

Las enfermedades de la presente invención típicamente son el resultado de o están asociadas con la actividad anormal de al menos una biomolécula que se produce naturalmente por el sujeto. Dicha actividad anormal de la biomolécula puede ser el resultado de la síntesis o degradación anormal de la biomolécula. Como alternativa, ésta puede ser el resultado de la actividad catalítica anormal (es decir, aumentada o disminuida en comparación con una actividad producida por un tejido sano).

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

Mientras que dicho injerto puede originarse de cualquiera de diversos mamíferos donantes, tal como se describe adicionalmente más adelante en el presente documento, dicho injerto es preferentemente no singénico con respecto al sujeto y/o se deriva de un cerdo, más preferentemente ambos de éstos.

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

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

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

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "injerto singénico" se refiere a un injerto que es esencialmente genéticamente idéntico con respecto al sujeto o esencialmente a todos los linfocitos del sujeto. Los

ejemplos de injertos singénicos incluyen un injerto derivado del sujeto (también mencionado en la técnica como un "injerto autólogo"), de un clon del sujeto, o de un gemelo idéntico del sujeto.

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

El método de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación puede usarse para tratar cualquier enfermedad en la que el sujeto es susceptible al tratamiento por medio del trasplante de un injerto de órgano/tejido pulmonar.

Preferentemente, el injerto pulmonar está en una etapa de desarrollo que esencialmente corresponde a la de un órgano/tejido pulmonar porcino en una etapa gestacional de aproximadamente 56 a aproximadamente 80 días de gestación.

Mientras que dicho injerto puede originarse de cualquiera de diversos mamíferos donantes, tal como se describe adicionalmente más adelante en el presente documento, dicho injerto preferentemente es de origen porcino y/o es no singénico con respecto al sujeto, más preferentemente ambos de éstos.

Tal como se describe e ilustra en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos a continuación, un xenoinjerto de órgano/tejido pulmonar de origen porcino en una etapa de desarrollo de 56 a 80 días puede usarse para generar, en ausencia de formación de teratomas, órganos/tejidos pulmonares bien desarrollados que comprenden estructuras alveolares. Por lo tanto, dichos injertos de tejidos/órganos pulmonares pueden usarse para el trasplante terapéutico para el tratamiento de la insuficiencia pulmonar.

Se apreciará en la presente divulgación, que un injerto de tejido/órgano pulmonar de un mamífero que está en dicha etapa de desarrollo puede proporcionar tejidos/órganos pulmonares a un receptor del mismo, es claramente nuevo y no es predecible con respecto a la técnica anterior.

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

Dependiendo del contexto del trasplante, con el fin de facilitar el prendimiento del injerto no singénico de la presente invención trasplantando un injerto de la presente invención que puede comprender ventajosamente además tratar un sujeto de la presente invención con un régimen inmunosupresor antes de, concomitantemente con, o después de trasplante del injerto. En general se apreciará que el prendimiento de los injertos de etapas más tardías requerirá mayor inmunosupresión de un receptor del injerto que los injertos en etapas más tempranas. Las desventajas de la terapia inmunosupresora pueden superarse claramente por los beneficios de un órgano/tejido completamente funcional, tal como en el caso de un trasplante para salvar la vida.

Preferentemente, con el fin de facilitar el prendimiento de un injerto no singénico, el régimen inmunosupresor puede comprender ventajosamente la administración transitoria al sujeto de al menos un inhibidor de la co-estimulación de las células T y al menos un inhibidor del ligando CD40, y más preferentemente puede comprender además administrar al sujeto un inhibidor de la proliferación de las células T.

Preferentemente, el inhibidor de la co-estimulación de células T es una Ig de CTLA4, el inhibidor de ligando CD40 es un anticuerpo anti-ligando CD40, y el inhibidor de la proliferación de células T es rapamicina. Como alternativa, el inhibidor de la co-estimulación de las células T puede ser un anticuerpo anti-CD40. Como alternativa, el inhibidor de la co-estimulación de las células T puede ser un anticuerpo específico para B7-1, B7-2 o CD29. Dichos fármacos polipeptídicos son particularmente ventajosos dado que éstos, al contrario que los fármacos inmunosupresores de uso común tales como la ciclosporina A, son esencialmente no tóxicos y/o no carcinogénicos, y en virtud del bloqueo pasivo de las interacciones con los receptores de la superficie celular, permiten una inmunosupresión reversible y temporal del sujeto.

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

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

Se proporciona una amplia guía para seleccionar y administrar los regímenes inmunosupresores adecuados para trasplantes en la bibliografía de la técnica (por ejemplo, referirse a: 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).

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

Un injerto de acuerdo con la presente divulgación puede trasplantarse en el sujeto en cualquiera de diversos modos, dependiendo de la aplicación o del fin, de modo que proporcione una función específica del órgano/tejido al sujeto de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención. Un experto ordinario en la materia, tal como un cirujano de trasplantes especializado en la enfermedad a tratar, poseerá la experiencia necesaria de modo que aplicará las enseñanzas de la presente invención para trasplantar un injerto terapéuticamente eficaz de la presente invención a un sujeto de la presente invención. Se apreciará que con el fin de tratar la enfermedad, que el trasplante del injerto debería efectuarse de tal modo que reemplace o repare terapéuticamente el órgano o tejido que muestra una fisiología o morfología patológica asociada con la enfermedad.

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

25 El trasplante de un injerto de la presente invención puede efectuarse de numerosos modos, dependiendo de diversos parámetros, tales como, por ejemplo, el tipo, etapa o gravedad de la enfermedad a tratar, los parámetros físicos o fisiológicos específicos del sujeto individual, y/o el desenlace terapéutico deseado. Por ejemplo, dependiendo de la aplicación y del fin, el trasplante del injerto puede efectuarse implantando el 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 mediante el uso de un injerto que consiste en diversos números discretos de órganos, tejidos, y/o partes de los mismos.

Un injerto de la presente invención puede derivarse de un donante que es de una cualquiera de diversas especies. Las especies adecuadas de origen para el injerto comprenden los principales animales domésticos o de granja, y primates, que se han caracterizado ampliamente con respecto a la correlación de las etapas de diferenciación con la etapa gestacional que puede ser adecuada para practicar el método. Dichos animales incluyen bovinos (por ejemplo, vacas), 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, jerbo, hámster), y primates (por ejemplo, chimpancé, mono rhesus, mono macaco y tití).

40 Pueden emplearse diversos métodos para obtener un injerto en una etapa de desarrollo que esencialmente se corresponde con la de un injerto derivado de porcino o de humanos, tal como se enseña actualmente. La obtención de dicho injerto se efectúa óptimamente recogiendo el injerto de embriones o fetos donantes de un injerto en desarrollo en dicha etapa de gestación. Se entenderá por aquellos expertos en la materia que la etapa gestacional de un organismo es el período de tiempo que transcurre después de la fertilización del oocito que genera el organismo.

Puede obtenerse un injerto en una etapa de desarrollo deseada mediante el cultivo *in vitro* de células, órganos/tejidos. Dicha diferenciación controlada *in vitro* de células, tejidos u órganos se realiza rutinariamente, por ejemplo, utilizando 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; linajes ectodérmicos tales como cerebro, piel y adrenal; y linajes mesodérmicos tales como músculo, cartílago, conducto muleriano, y corazón, referirse, por ejemplo, a Schuldiner M. *et al.*, 2000. Proc Natl Acad Sci EE.UU. 97:11307-11312 e Itskovitz-Eldor J. *et al.*, 2000. Mol Med 6:88; para la diferenciación pancreática de las células madre embrionarias, referirse, por ejemplo, a: 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 EE.UU. 97:11307-11312). Para la diferenciación de linajes pulmonares, referirse, por ejemplo, a Otto WR., 1997. Int J Exp Pathol. 78:291-310.

60 La siguiente tabla proporciona los ejemplos de las etapas estacionales de injertos humanos y porcinos en las cuales pueden estos proporcionar injertos que están esencialmente a las etapas en desarrollo correspondientes:

Etapas gestacionales correspondientes de cerdos y humanos

Etapa gestacional del injerto porcino (días)	Etapa gestacional del 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

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

5 Tal como se describe anteriormente en el presente documento, el trasplante del injerto puede efectuarse mediante trasplante del mismo en diversas localizaciones anatómicas adecuadas de modo que sea de efecto terapéutico.

10 Dependiendo de la aplicación y del fin, el injerto puede trasplantarse en una localización anatómica homotípica (una localización anatómica normal para el tipo de órgano o tejido del injerto), o en una localización anatómica ectópica (una localización anatómica anormal para el tipo de órgano o tejido del injerto). Opcionalmente, cuando se trasplanta el injerto para reparar o reemplazar un tejido/órgano dañado, este último puede eliminarse, por ejemplo, de modo que permita el crecimiento y prendimiento del injerto, por ejemplo en el contexto del reemplazo de órganos mediante trasplante del injerto en una localización anatómica homotípica.

15 Dependiendo de la aplicación y del fin, el injerto puede implantarse ventajosamente 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 intra-abdominal.

20 Tal como se describe adicionalmente y se ilustra en la sección de Ejemplos a continuación, un injerto de órgano/tejido pulmonar puede trasplantarse bajo una cápsula renal de un mamífero de modo que generen órganos/tejidos pulmonares bien desarrollados que comprenden estructuras alveolares en el sujeto. Dichos órganos/tejidos pulmonares pueden reimplantarse adecuadamente en el tórax del sujeto después de dicho desarrollo de modo que proporcione función pulmonar al sujeto.

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

30 Por ejemplo, el trasplante de números discretos crecientes de injertos de órganos o tisulares puede emplearse ventajosamente para aumentar el efecto terapéutico fisiológico o físico del injerto hasta los niveles deseados. Por ejemplo, cuando el injerto es un injerto de islotes pancreáticos, el aumento del número de injertos puede usarse para generar niveles suficientemente altos en suero de una hormona pancreática, tal como la insulina, de modo que se trate una deficiencia de hormonas pancreáticas tal como la diabetes de tipo 1. De modo similar, el aumento del número y/o la masa de injertos de órganos/tejidos linfoides/hematopoyéticos puede usarse para generar niveles

suficientemente altos de un factor hematopoyético, tal como factor VIII o glucocerebrosidasa, de modo que permita el tratamiento de la hemofilia A o la enfermedad de Gaucher, respectivamente.

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

La evaluación de los niveles en suero del sujeto de esencialmente cualquier biomolécula producida por un injerto de órganos/tejidos pancreáticos o linfoides/hematopoyéticos, tales como insulina, factor VIII, glucocerebrosidasa y similares, cuya deficiencia se conoce por estar asociada con una enfermedad, puede controlarse fácilmente de acuerdo con métodos diagnósticos médicos convencionales, incluyendo tal como se describe en la sección de los 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 la funcionalidad del injerto (es decir, la secreción de insulina regulada fisiológicamente por el injerto). En general, el desarrollo histológico del injerto puede controlarse por medio de una biopsia, y el desarrollo morfológico/estructural bruto del injerto puede controlarse por medio de cualquiera de diversos métodos de imagen médica y de diagnóstico convencionales.

Pueden emplearse diversos métodos para evaluar la tolerancia inmunológica del sujeto para el injerto. Por ejemplo la tolerancia puede evaluarse controlando la infiltración específica de leucocitos o linfocitos T específicos del sujeto en el injerto, controlando el origen de la vasculatura del injerto, y/o controlando la apariencia histológica de las estructuras específicas del órgano o tejido. Dicho control puede efectuarse ventajosamente usando métodos, tales como por medio de la biopsia de una muestra, conocidos por aquellos expertos en la materia. La infiltración de leucocitos, neutrófilos, células citolíticas naturales o células T del sujeto en el injerto, o la falta de la misma, es típicamente indicativa del prendimiento subóptimo u óptimo de un injerto no singénico en el sujeto, respectivamente. En casos en los que la tolerancia del sujeto al injerto requiere mejora, puede realizarse o ajustarse el tratamiento inmunosupresor auxiliar terapéutico del sujeto ventajosamente, tal como se describe anteriormente en el presente documento. El experto apreciará que un injerto que se tolera óptimamente es un injerto que no se rechaza o que no está sustancialmente infiltrado en el sujeto por linfocitos T no singénicos con respecto al injerto. Un injerto puede rechazarse por medio de rechazo hiperagudo, rechazo agudo o rechazo crónico. Se proporciona una amplia guía para comprobar el rechazo de trasplantes en la bibliografía de la técnica (por ejemplo, referirse a: 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 del injerto generalmente se correlacionará con el prendimiento pobre, y tenderá a aumentar con la etapa gestacional del injerto en el tiempo de la implantación.

Se apreciará que la presente invención permite la identificación de las etapas de desarrollo apropiadas de los injertos de órganos/tejidos de cualquiera de diversos linajes que pueden utilizarse para el tratamiento de esencialmente cualquier enfermedad asociada con la fisiología o morfología patológica de un órgano o tejido que es susceptible al tratamiento por medio de trasplante. Dichas enfermedades incluyen enfermedades renales, esplénicas, pancreáticas, cardíacas, hepáticas, hematológicas, genéticas, pulmonares, cerebrales, gastrointestinales, musculares, endocrinas, óseas, neurológicas, hematológicas/metabólicas, dérmicas, cosméticas, oftalmológicas y vasculares.

Por lo tanto, la presente invención identifica etapas del desarrollo de los injertos de órganos/tejidos pulmonares, tales como injertos porcinos que pueden obtenerse en cantidades esencialmente ilimitadas, a las que dichos injertos pueden usarse para tratar óptimamente enfermedades en humanos, tales como la diabetes de tipo 1 y la hemofilia A, que son susceptibles de tratamiento por medio de trasplante, respectivamente, de órganos/tejidos pulmonares.

Se espera que durante la vida de esta patente se desarrollen numerosas técnicas diagnósticas médicas relevantes y se entienda que el alcance de la frase "método de evaluar la etapa de diferenciación de un órgano de un mamífero más adecuado para el trasplante del mismo en un sujeto mamífero" incluye todas estas nuevas tecnologías a priori.

Los objetos adicionales, ventajas y características nuevas de la presente invención serán aparentes para un experto ordinario en la materia después de examinar los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes. Adicionalmente, cada una de las distintas realizaciones y aspectos de la presente invención tal como se ha delineado anteriormente en el presente documento y tal como se reivindica en la sección de las reivindicaciones a continuación encuentra un soporte experimental en los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS DE REFERENCIA

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, los cuales conjuntamente con las descripciones anteriores, ilustran la invención de un modo no limitante.

Generalmente, la nomenclatura que se usa en el presente documento y en los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluye 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 and 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 las expuestas en las patentes de EE.UU. 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); los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía de patente y científica, véase, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. 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). Otras referencias generales se proporcionan a lo largo de este documento. Se cree que los procedimientos del presente documento se conocen bien en la técnica y se proporcionan para la conveniencia del lector.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se usan en el presente documento tienen el mismo significado tal como se entiende comúnmente por un experto ordinario en la materia a la cual pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, los métodos adecuados y materiales se describen a continuación.

EJEMPLO 1

Identificación de las etapas gestacionales de los injertos pulmonares porcinos funcionales capaces del desarrollo significativo específico de órganos sin o con riesgo mínimo de formación de teratomas

La identificación de las etapas gestacionales durante las cuales los injertos pulmonares porcinos son capaces de generar, sin o con el mínimo riesgo de formación de teratomas, el crecimiento de tejidos pulmonares alveolares normalmente diferenciados después de trasplante en receptores xenogénicos: al contrario que en la implantación de tejido embrionario de riñón, hígado, páncreas o corazón, la implantación de injertos de tejido pulmonar de porcino a los 24, 28 o incluso 42 días de gestación, no condujo a ningún crecimiento significativo. El crecimiento y diferenciación de tejido pulmonar se detectó únicamente después de la implantación de tejido precursor en la etapa gestacional relativamente tardía de 56 días. Después de la implantación subcapsular de tejido pulmonar a una etapa 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, tal como puede observarse en las Figuras 1a-d, los injertos de precursores pulmonares del día 56 de la etapa gestacional mostraron un crecimiento impresionante (Figura 1a), y se desarrollaron en tejido pulmonar maduro que contenía todos los elementos del sistema respiratorio incluyendo los bronquios respiratorios, bronquiolos y alvéolos (Figura 1b, flecha, asteriscos, cabezas de flecha, respectivamente), y cartilago (tinción de azul intenso mediante azul de alciano, Figura 1c). Los tipos apropiados de células epiteliales para el tejido pulmonar se detectaron en el revestimiento de las distintas estructuras pulmonares. De modo importante, tal como puede observarse en la Figura 1d, los alvéolos generados de los injertos del día 56 de la etapa gestacional mostraron septos intraalveolares delgados que comprendían plexos capilares dentro, sostenidos por cantidades mínimas de tejido conectivo fino, cumpliendo el requisito del fino equilibrio de perfusión-ventilación para permitir el intercambio de gas extrauterino. A pesar de que los injertos pulmonares porcinos del día 80 de la etapa gestacional también se desarrollaron en tejido pulmonar, los tejidos desarrollados fueron significativamente menores que aquellos derivados de los injertos del día 56 de la etapa gestacional ($p < 0,001$). Además del potencial de crecimiento subóptimo, los hallazgos microscópicos anormales que incluyeron engrosamiento de la pared alveolar y displasia epitelial, fueron evidentes. Las diferencias en la estructura de la pared alveolar y el espesor de los tejidos pulmonares generados por los implantes de los días 56 y 80 de la etapa gestacional pueden observarse fácilmente en las Figuras 1d-e, respectivamente, después de la tinción con H&E.

Análisis: Por lo tanto, es difícil saber si el fallo del prendimiento de los tejidos fetales porcinos notificado en estudios de animales grandes o en seres humanos, está solamente mediado por rechazo o podría atribuirse también a la elección de tejido embrionario con bajo potencial de crecimiento recogido en el tiempo de gestación subóptima. Este problema claramente se ilustra por los datos presentes que muestran que la etapa gestacional óptima para la implantación de injertos de órganos/tejidos pancreáticos está entre los 28 y los 56 días de gestación, mientras que el crecimiento potencial y la capacidad de secreción de insulina se reduce significativamente después de la implantación de tejido obtenido más allá del día 80 de gestación, momento en el cual se llevaron a cabo la mayor

parte de los trasplantes en humanos (Reinholt FP. *et al.*, 1998. Xenotransplantation 5: 222-5; Groth CG. *et al.*, 1998. Transplantation Proceedings 30: 3809-10).

Mientras que el establecimiento del umbral superior de la etapa gestacional por encima del cual es poco probable el desarrollo de teratomas después del trasplante de los injertos se alcanzó para todos los tipos de órganos/tejidos ensayados, definiendo el umbral inferior de la etapa gestacional por debajo del cual el potencial de crecimiento es subóptimo representó un reto más difícil para los tipos de órganos, tales como pulmón, cuyo rendimiento funcional no puede establecerse mediante la secreción de una proteína en la sangre, como es el caso con el páncreas o el bazo.

Al contrario que en la ventana temporal de la etapa gestacional identificada para los injertos pancreáticos, las etapas gestacionales tempranas no fueron favorables para el desarrollo de injertos pulmonares en la etapa gestacional. Por lo tanto, no se observó el desarrollo de los injertos pulmonares en la etapa gestacional de 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 en la etapa gestacional de E56 o E80. En la etapa gestacional de 80 días, sin embargo, inesperadamente se encontró que los injertos pulmonares en etapa gestacional eran subóptimos dado que éstos mostraban tanto un potencial de crecimiento disminuido como un desarrollo de tejido pulmonar subóptimo caracterizado por el engrosamiento de la pared alveolar y la displasia epitelial.

Conclusión: Los datos que se describen actualmente demuestran inesperadamente por primera vez que existen para cada uno de los órganos/tejidos pulmonares porcinos de la etapa gestacional, las etapas gestacionales durante las cuales los injertos de dichos órganos/tejidos tienen la capacidad de generar, sin o con riesgo mínimo de formación de teratoma y una mínima respuesta inmunitaria del hospedador, tejidos específicos de órganos en crecimiento, estructuralmente y funcionalmente diferenciados después de un trasplante. Los datos que se divulgan actualmente demuestran además inesperadamente por primera vez que cada uno de dichos tejidos/órganos porcinos en etapa gestacional tiene etapas gestacionales inequívocas durante las cuales estos tienen la capacidad de generar, sin o con mínimo riesgo de formación de teratomas, tejidos específicos de órganos en crecimiento, estructuralmente y funcionalmente diferenciados después del trasplante. Por lo tanto, los datos que se divulgan actualmente fueron inesperadamente exitosos en la caracterización por primera vez, de cada uno de esos órganos/tejidos, las etapas gestacionales de los injertos durante las cuales éstos tienen la capacidad de generar, sin o con mínimo riesgo de formación de teratomas, tejidos específicos de órganos en crecimiento, estructuralmente y funcionalmente diferenciados después del trasplante. En particular, los datos que se divulgan actualmente inesperadamente demuestran por primera vez que los injertos de órganos/tejidos pancreáticos porcinos en etapas gestacionales que varían de aproximadamente el día 24 a aproximadamente el día 80 tienen la capacidad de generar, sin o con mínimo riesgo de formación de teratomas, tejidos pancreáticos secretores de insulina en crecimiento, estructuralmente y funcionalmente diferenciados después del trasplante, junto con los de las etapas gestacionales que varían de aproximadamente el día 28 a aproximadamente el día 56 que tienen la capacidad de generar tejidos pancreáticos secretores de insulina que crecen óptimamente y se diferencian estructuralmente y funcionalmente.

Además, los datos que se divulgan actualmente demuestran inesperadamente por primera vez que los injertos esplénicos porcinos en las etapas gestacionales que varían de aproximadamente el día 24 a aproximadamente el día 80, junto con los que están en las etapas gestacionales que varían de aproximadamente el día 42 a aproximadamente el día 56 que tienen la capacidad de generar, sin o con mínimo riesgo de formación de teratomas, tejido esplénico en crecimiento óptimo, estructuralmente y funcionalmente diferenciado.

Adicionalmente, los datos que se divulgan actualmente demuestran inesperadamente por primera vez que la etapa gestacional óptima para el trasplante de injertos pulmonares porcinos está aproximadamente el día 42 y aproximadamente antes del día 80 de gestación, teniendo los injertos del día 56 de la etapa gestacional la capacidad de generar, sin o con mínimo riesgo de formación de teratomas, tejidos pulmonares en crecimiento óptimo, estructuralmente y funcionalmente diferenciados.

Como tales, los métodos que se describen actualmente para trasplantar injertos pulmonares de etapas gestacionales son abrumadoramente superiores a los métodos conocidos, y por lo tanto son óptimos para tratar enfermedades asociadas con la insuficiencia de órganos de dichos tipos en ratones SCID.

En conclusión, sin importar las modalidades de inmunosupresión que se requerirán y que deben definirse en modelos de animales mayores, los datos que se divulgan actualmente proporcionan una prueba de concepto del potencial curativo del tejido embrionario esplénico libre de células T como una nueva fuente para el trasplante en pacientes con deficiencias genéticas.

Se aprecia que determinadas características de la invención, que, por claridad, se describen en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una sola realización. A la inversa, diversas características de la invención, que, por brevedad, se describen en el contexto de una sola realización, pueden proporcionarse también por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

REFERENCIAS CITADAS

(Las referencias adicionales se citan en el texto)

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

35 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

40 <120> TRATAMIENTO ENFERMEDADES POR MEDIO DE NO SINGÉNICOS EN DESARROLLO

<130> 30014

<160> 6

45

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 16

50

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

55

<400> 1

catggacctg cttcac 16

<210> 2

60

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

65

<223> Oligonucleótido de ADN monocatenario

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un injerto pulmonar de un mamífero no humano en desarrollo para generar tejido pulmonar para el uso en el tratamiento de una enfermedad pulmonar o una insuficiencia pulmonar en un sujeto mamífero que necesite del mismo, en el que dicho injerto pulmonar está en una etapa de desarrollo que corresponde a la de un órgano/tejido pulmonar porcino en una etapa gestacional seleccionada de un intervalo de 56 a 80 días de gestación.
- 10 2. El injerto pulmonar para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho injerto pulmonar está en una etapa de desarrollo que se corresponde con la de un órgano/tejido pulmonar porcino a una etapa gestacional de 56 días de gestación.
- 15 3. El injerto pulmonar para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho injerto pulmonar es xenogénico con respecto al sujeto.
- 20 4. El injerto pulmonar para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho injerto de órgano/tejido pulmonar es de origen porcino.
- 25 5. El injerto pulmonar para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho sujeto es un sujeto humano.
- 30 6. El injerto pulmonar para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad pulmonar se selecciona del grupo que consiste en fibrosis quística, enfisema, asbestosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y fibrosis pulmonar.
7. El injerto pulmonar para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende el uso de un régimen inmunosupresor antes de, conjuntamente con, o después del trasplante de dicho injerto pulmonar.
8. El injerto pulmonar para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende el uso de al menos un inhibidor de la co-estimulación de las células T y al menos un inhibidor de ligando CD40.
9. El injerto pulmonar para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho injerto está vascularizado.



Fig. 9a
1a



Fig. 9b
1b



Fig. 9c
1c

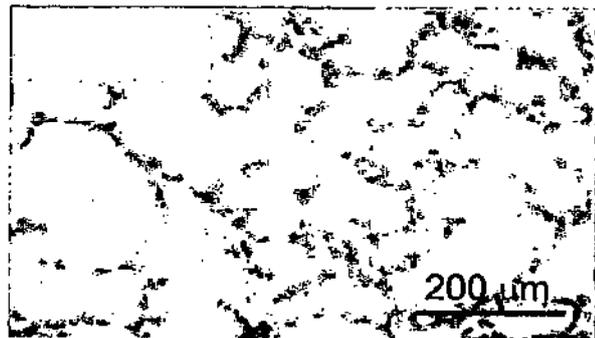


Fig. 9d
1d

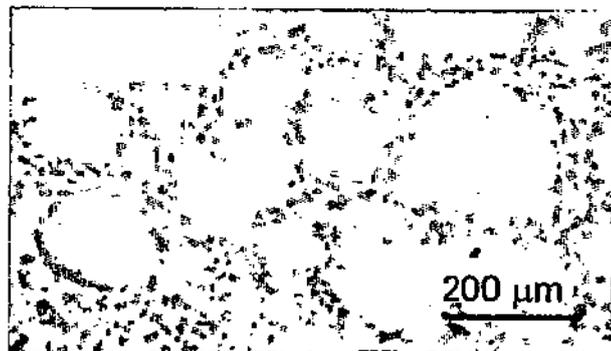


Fig. 9e
1e