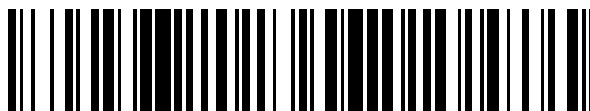


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 561 499**

51 Int. Cl.:

A61K 35/12 (2015.01)

A61K 35/39 (2015.01)

C12N 5/077 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.03.2004** **E 11179593 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.11.2015** **EP 2402019**

54 Título: **Métodos de tratamiento de enfermedades mediante el trasplante de órganos o de tejidos alogénicos o xenogénicos**

30 Prioridad:

06.03.2003 US 379725

20.01.2004 US 759033

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

26.02.2016

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 y
DEKEL, BENJAMIN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 561 499 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

Métodos de tratamiento de enfermedades mediante el trasplante de órganos o de tejidos alogénicos o xenogénicos

La presente invención se refiere a un injerto de un órgano o de un tejido esplénico porcino en fase de gestación para su uso en el tratamiento de un trastorno hematológico y/o genético y/o de una enfermedad de almacenamiento lisosómico / una deficiencia enzimática, asociados con una fisiología o una morfología patológicas de un órgano o de un tejido de acuerdo con la reivindicación 1. Más particularmente, la presente divulgación se refiere a métodos de tratamiento de enfermedades a través del trasplante de órganos / tejidos alogénicos humanos o porcinos en una fase de gestación de entre 7 y 9 semanas o de entre 20 y 28 días, respectivamente.

El trasplante de órganos / tejidos completamente diferenciados es un procedimiento médico ampliamente extendido y que salva vidas, de elección para el tratamiento de numerosas enfermedades muy debilitantes o mortales, incluyendo enfermedades renales, cardíacas, pancreáticas, pulmonares, hematológicas, genéticas y hepáticas. Por ejemplo, el número de trasplantes de riñones humanos ha aumentado rápidamente en los últimos años, pero la demanda supera ampliamente a la disponibilidad de órganos. En el caso de la insuficiencia renal, puede usarse una hemodiálisis permanente para prolongar la vida, sin embargo, esto es un procedimiento muy debilitante, incómodo y caro con una eficacia limitada, que implica un riesgo significativo de infecciones oportunistas. En el caso de la diabetes, una enfermedad con un tremendo impacto médico y económico, la inyección diaria de insulina, el tratamiento habitual de la técnica anterior, no impide satisfactoriamente las consecuencias limitantes o mortales de esta enfermedad. En todo el mundo, la diabetes aparece en prácticamente el 5 por ciento de la población con una edad entre 20 y 79 años, y por lo tanto afecta a 150 millones de personas. Únicamente en Estados Unidos, se estima que 17 millones de personas - más del 6 por ciento de la población - tienen diabetes sacarina, y cada año son diagnosticados con la enfermedad aproximadamente 1 millón de americanos con 20 años o más. En 1999 se produjeron aproximadamente 450.000 muertes en adultos diabéticos en los Estados Unidos. La enfermedad cardíaca es la causa predominante de incapacidad y muerte en todas las naciones industrializadas, y además, la incidencia de insuficiencia cardíaca está aumentando en los Estados Unidos, ya que más de medio millón de americanos muere cada año por esta enfermedad (Braunwald E., 1997. N Eng J Med. 337: 1360; Eriksson H., 1995. J Inter Med. 237: 135). Además, en los Estados Unidos, la enfermedad cardíaca supone aproximadamente 335 muertes por cada 100.000 individuos (aproximadamente el 40 % de la mortalidad total) eclipsando al cáncer, que le sigue con 183 muertes por cada 100.000 individuos. En numerosas afecciones clínicas agudas y crónicas se produce un daño hepático, incluyendo la hepatotoxicidad inducida por fármacos, infecciones víricas, lesiones vasculares, enfermedades autoinmunes y traumatismos contusos. Además, los pacientes con una metabopatía congénita pueden estar en riesgo de desarrollar un daño hepático. Los síntomas del daño hepático que se producen como resultado de estas afecciones clínicas incluyen, por ejemplo, insuficiencia hepática fulminante con colestasis, lesiones hepáticas y necrosis del tejido hepático, y en muchos casos, el restablecimiento de la función hepática normal es vital para la supervivencia de los pacientes.

El trasplante terapéutico en seres humanos normalmente se lleva a cabo mediante el trasplante de órganos / tejidos alogénicos completamente diferenciados entre donantes y receptores adecuadamente haplocompatibles. Sin embargo, dicha modalidad de tratamiento adolece de considerables inconvenientes. El trasplante alogénico de órganos / tejidos diferenciados es imposible de implementar en un gran número de casos debido a la falta de disponibilidad de donantes de trasplantes adecuadamente inmunológicamente y morfológicamente compatibles. Adicionalmente, el uso de donantes humanos para proporcionar órganos / tejidos para su trasplante requiere someter a donantes vivos a una cirugía mayor, por ejemplo, en el caso de un trasplante de riñón. Alternativamente, el uso de órganos / tejidos cadavéricos a menudo presenta también dilemas éticos. En el caso de la diabetes, se ha demostrado que el trasplante de islotes pancreáticos de un donante cadavérico adulto es técnicamente factible, sin embargo, esta metodología no puede llevarse a la práctica de forma rutinaria debido a un número insuficiente de páncreas de donantes alogénicos inmunológicamente compatibles de los que aislar la cantidad suficiente de islotes necesaria.

Por lo tanto, un gran número de pacientes que por lo demás podría beneficiarse de un trasplante terapéutico, sucumben ante enfermedades asociadas con una insuficiencia renal, cardíaca, hepática, pancreática, pulmonar o hematológica, mientras esperan unos donantes de trasplantes compatibles. Además, incluso cuando se encuentran donantes de trasplantes adecuadamente haplocompatibles, generalmente son necesarios unos tratamientos inmunosupresores permanentes y perjudiciales, tales como la administración diaria de fármacos tóxicos tales como la ciclosporina A, para evitar el rechazo del injerto. El uso de fármacos tales como la ciclosporina A es muy poco deseable dado que éstos provocan unos graves efectos secundarios tales como carcinogenicidad, nefrotoxicidad y un aumento de la susceptibilidad frente a infecciones oportunistas. Dichos tratamientos inmunosupresores contribuyen a los inconvenientes del trasplante alogénico, dado que éstos a menudo no tienen éxito en la prevención del rechazo a corto plazo, y generalmente son incapaces de prevenir el rechazo indefinidamente a largo plazo. El rechazo agudo de injertos cardíacos o hepáticos a menudo es mortal. En el caso del trasplante de riñón, la incapacidad de los regímenes inmunosupresores actuales de impedir el rechazo agudo del injerto a menudo requiere de una intervención quirúrgica de emergencia para extraer el injerto, seguida por la necesidad de ser colocado en diálisis renal pendiente de la disponibilidad de otro órgano compatible para el trasplante.

Una alternativa que se ha propuesto al trasplante de un aloinjerto implica el trasplante de un xenoinjerto, es decir, el trasplante de injertos derivados de animales, en particular de injertos porcinos, que están bien establecidos como una potencial alternativa animal de elección para injertos humanos. Las grandes ventajas del uso de xenoinjertos para los trasplantes sería su disponibilidad a demanda para todos los pacientes en necesidad de un trasplante, así como la evitación de la carga médica y ética de recoger injertos de donantes humanos vivos o cadáveres. Sin embargo, hasta la fecha, los xenoinjertos de órganos / tejidos se han descartado para el trasplante en seres humanos debido a su hasta ahora insuperable incompatibilidad inmunológica con los receptores humanos.

Por lo tanto, la capacidad de generar órganos / tejidos, tales como órganos / tejidos pancreáticos, renales, hepáticos, cardíacos o linfoides, adecuados para su trasplante terapéutico en unas cantidades suficientes y tolerados de forma óptima en seres humanos inmunocompetentes sin una inmunosupresión o con una inmunosupresión mínima, es un objetivo muy deseado. Una estrategia que se ha propuesto para cumplir esta aspiración implica el uso de órganos / tejidos en unas etapas tempranas de desarrollo para su trasplante. Dicha metodología es prometedora dado que se ha demostrado que la tolerancia inmunológica a los injertos derivados de un tejido en desarrollo es mejor que a los injertos derivados de tejidos en fase 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). Adicionalmente, el mayor potencial de crecimiento y de diferenciación de los órganos / tejidos en desarrollo es muy deseable para la generación de injertos óptimamente funcionales integrados en el hospedador. Por ejemplo, se ha demostrado que los injertos derivados de tejido renal humano en desarrollo muestran una reducción en la apoptosis y en la destrucción tisular, así como una fase de crecimiento sostenida (Dekel B. *et al.*, 1997. *Transplantation* 64, 550; Dekel B. *et al.*, 2000. *Transplantation* 69, 1470). En el riñón humano en desarrollo, las células madre recientes son inducidas en la ruta nefrógena para formar nefronas hasta las 34 semanas de gestación. Dicha ruta de diferenciación nefrógena implica la invasión de una región especializada del mesodermo intermedio por parte de una fuente epitelial (primordio uretral), que crece y se ramifica para formar un sistema de conductos colectores e induce el agrupamiento de las células madre mesenquimatosas metarrenales desorganizadas y su diferenciación en nefronas [Woolf, A. S. en: *Pediatric Nephrology*, 4ª ed. Barratt, T. M., Avner, A. y Harmon, W. (eds.), Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland. páginas 1 - 19 (1999)]. Por lo tanto, los trasplantes de tejido renal en fase de gestación pueden ser una potencial fuente de células regeneradoras renales y una solución prometedora para la actual escasez de órganos para el trasplante de riñón. En el caso de los tejidos pancreáticos, las células de los islotes pancreáticos, tales como las células beta productoras de insulina, muestran una mejora en el crecimiento y la diferenciación celulares con respecto a las células beta de islotes ya diferenciadas. Por ejemplo, se ha demostrado que los islotes fetales humanos, que incluyen las células secretoras de insulina más tempranas, trasplantados en ratones y ratas atímicos, que son unos hospedadores inmunodeficientes, muestran un crecimiento y un desarrollo continuados, incluyendo la producción de las demás hormonas pancreáticas; glucagón, somatostatina y polipéptido pancreático (Usadel *et al.*, 1980. *Diabetes* 29 Supl. 1: 74 - 9). De forma análoga, se ha demostrado que los injertos derivados de páncreas embrionarios humanos en ratones NOD / SCID, que también son unos hospedadores inmunodeficientes, generaron células beta humanas productoras de insulina derivadas del injerto (Castaing M. *et al.*, 2001. *Diabetologia* 44: 2066). También se ha demostrado que los trasplantes de islotes porcinos en fase de gestación en ratones pueden mostrar un programa de diferenciación similar, con una cronología similar a la de los tejidos normales no trasplantados.

Se han sugerido varios mecanismos para explicar la reducida inmunogenicidad de los injertos de tejidos en desarrollo. Se ha sugerido que dichos injertos derivados de tejidos en desarrollo inducen unas respuestas inmunitarias atenuadas del hospedador frente al injerto en comparación con los injertos derivados de tejidos en fase adulta, debido a que los primeros son predominantemente vascularizados por la vasculatura derivada del hospedador, por oposición a la vascularización del injerto derivada predominantemente del propio injerto observada en los últimos (Hyink D. P. *et al.*, 1996. *Am J Physiol.* 270, F886). Adicionalmente se ha sugerido que unos bajos niveles de expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y de las moléculas de adhesión, y de las células presentadoras del antígeno en los injertos de tejido en fase de gestación, disminuyen la capacidad de dichos injertos para activar las respuestas inmunitarias del hospedador.

Sin embargo, las metodologías que implican la utilización de órganos / tejidos humanos en desarrollo se ven impedidas por los obstáculos prácticos y éticos implicados en la obtención de un número suficiente de embriones / fetos humanos, así como los problemas éticos implicados en el uso de tejido embrionario humano. Para evitar dichos obstáculos se ha sugerido el uso de órganos / tejidos en desarrollo derivados de animales, en particular de órganos / tejidos en desarrollo porcinos (Auchincloss, H. y Sachs, D. H., 1998. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 433 - 470; Hammerman, M. R., 2002. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 11, 11 - 16).

En la técnica interior se han intentado diversas metodologías para la utilización de trasplantes de órganos / tejidos en desarrollo no singénicos para el tratamiento de enfermedades.

Una metodología implica el trasplante de riñones en fase de gestación en receptores alogénicos no inmunosuprimidos, en un intento de generar órganos renales funcionales derivados del injerto inmunológicamente tolerados en dichos receptores, según se muestra mediante el uso del trasplante de injertos de embriones de rata de 15 días bajo la cápsula renal o en el epiplón de ratas hospedadoras adultas no inmunosuprimidas, sin (Rogers, S. A. *et al.*, 1998. *Kidney Int.* 54, 27 - 37; Rogers, S. A. *et al.*, 2001. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280,

R132 - 136) o con (Rogers, S. A. y Hammerman, M. R., 2001. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281, R661 - 665) una previa conservación *in vitro* de los injertos.

5 Otra metodología implica el trasplante de riñones en fase de gestación en receptores xenogénicos tratados con un bloqueo de la coestimulación con CTLA4-Ig, en un intento de generar órganos renales funcionales derivados del injerto inmunológicamente tolerados en dichos receptores, según se muestra mediante el uso del trasplante de injertos de embriones de rata de 15 días en ratones hospedadores (Rogers, S. A. y Hammerman, M. R., 2001. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280, R1865 - 1869).

10 Otra metodología más implica el trasplante de tejido renal en fase de gestación en receptores xenogénicos inmunodeficientes reconstituidos con PBMC humanas, en un intento de generar órganos renales funcionales derivados del injerto inmunológicamente tolerados en dichos receptores, según se muestra mediante el trasplante de tejido humano en una fase de gestación de entre 12 y 22 semanas en ratas quiméricas SCID / Lewis y SCID / atímicas (Dekel B. *et al.*, 1997. *Transplantation* 64, 1550), y el trasplante de órganos / tejidos en una fase de
15 gestación de 70 días en ratones NOD / SCID (Dekel B. *et al.*, 2001. *J Am Soc Nephrol.* 13, 977 - 90; Dekel B. *et al.*, 2000. *Transplantation* 69, 1470).

Aún otra metodología más implica el trasplante de injertos pancreáticos en fase de gestación cultivados en receptores xenogénicos inmunodeficientes, en un intento de generar células y tejidos pancreáticos funcionales
20 derivados del injerto inmunológicamente tolerados en dichos receptores, según se ha intentado mediante el trasplante de células de los islotes porcinos en fase de gestación en ratones atímicos (Otonkoski T. *et al.*, 1999. *Transplantation* 68, 1674), de islotes fetales humanos en ratones y ratas atímicos (Usadel *et al.*, 1980. *Diabetes* 29 Supl 1: 74 - 9) y de páncreas embrionarios humanos en ratones NOD / SCID (Castaing M. *et al.*, 2001. *Diabetologia* 44: 2066).

25 Una metodología adicional implica el trasplante de grupos celulares de islotes fetales porcinos intraportalmente o bajo la cápsula renal en receptores humanos diabéticos, en un intento de tratar la diabetes en dichos receptores (Groth CG. *et al.*, 1999. *J Mol Med.* 77, 153).

30 Una metodología adicional más implica el trasplante de tejido estriado alogénico mesencefálico fetal ventral en receptores humanos con enfermedad de Parkinson, en un intento de tratar esta enfermedad (Subramanian, T., 2001. *Semin Neurol.* 21, 103; Schumacher JM. *et al.*, 2000. *Neurology* 54, 1042).

Sin embargo, todas las metodologías de la técnica anterior que implican el trasplante de tejidos en desarrollo no
35 singénicos adolecen de algunos o todos los siguientes inconvenientes: (i) una tolerancia subóptima por parte de los linfocitos humanos alogénicos / xenogénicos; (ii) una diferenciación estructural y funcional subóptima, por ejemplo, con respecto a la producción de orina por parte de los injertos renales, o con respecto a la producción de insulina por parte de los injertos pancreáticos; (iii) una vascularización derivada predominantemente del injerto, por oposición a la derivada del hospedador; (iv) un crecimiento subóptimo; (v) una inadecuada disponibilidad de los órganos / tejidos
40 trasplantables; y/o (vi) una seguridad subóptima para su administración a seres humanos, especialmente con respecto a evitar de la generación de teratomas derivados del injerto.

Por lo tanto, todas las metodologías de la técnica anterior han fracasado al proporcionar una solución adecuada para el uso de trasplantes de órganos / tejidos en desarrollo no singénicos para el tratamiento de enfermedades humanas
45 susceptibles de un trasplante terapéutico.

Existe por lo tanto una necesidad ampliamente reconocida de, y sería muy ventajoso tener, un método para el tratamiento de enfermedades humanas susceptibles de un trasplante terapéutico mediante el trasplante de órganos /
50 tejidos en desarrollo y/o no singénicos desprovistos de las anteriores limitaciones.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un injerto de un tejido esplénico o de un órgano esplénico porcino en fase de gestación para su uso en el tratamiento de una enfermedad o de un trastorno seleccionado de entre el grupo que
55 consiste en un trastorno de la coagulación, una deficiencia en un factor de la coagulación, un defecto en el estroma linfóide, un trastorno relacionado con la inmunidad y una enfermedad de almacenamiento lisosómico / una deficiencia enzimática, seleccionándose dicho injerto o de un órgano esplénico o de un tejido que no exprese ni presente al menos una molécula capaz de estimular de potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto xenogénico, en el que dicha al menos una molécula es un correceptor de linfocitos o un ligando de un correceptor de
60 linfocitos, y en el que dicha fase de diferenciación de dicho injerto de órgano esplénico o de tejido esplénico porcino corresponde a un porcino de entre 20 y 63 días de gestación.

Preferiblemente en la presente invención el sujeto es un ser humano.

65 Preferiblemente en la presente invención la fase de diferenciación se corresponde con entre 20 y 56 días de gestación.

Preferiblemente en la presente invención la fase de diferenciación se corresponde con entre 20 y 42 días de gestación.

Preferiblemente en la presente invención la fase de diferenciación se corresponde con 42 días de gestación.

5 Preferiblemente en la presente invención el injerto de un órgano esplénico o de tejido esplénico para su uso comprende adicionalmente el uso de un fármaco inmunosupresor, favoreciendo así la incorporación de dicho injerto de un órgano esplénico o de un tejido esplénico en dicho sujeto. Preferiblemente en la presente invención el fármaco inmunosupresor es capaz de bloquear la unión de un correceptor de linfocitos con un ligando de dicho correceptor de linfocitos.

10 Preferiblemente en la presente invención el fármaco inmunosupresor es la CTLA4-Ig. Preferiblemente en la presente invención el correceptor de linfocitos o el ligando del correceptor de linfocitos se elige de entre el grupo que consiste en B7-1, CD40 y CD40L. Preferiblemente en la presente invención la selección del injerto de un órgano esplénico o de tejido esplénico se efectúa a través de un análisis mediante una RT-PCR de dicho injerto de un órgano esplénico o de tejido esplénico.

Preferiblemente en la presente invención la deficiencia en un factor de la coagulación comprende la hemofilia.

15 Preferiblemente en la presente invención la enfermedad de almacenamiento lisosómico / deficiencia enzimática comprende la enfermedad de Gaucher. Preferiblemente en la presente invención el defecto en el estroma linfóide comprende un defecto en el estroma linfóide que da como resultado un deterioro en el crecimiento y/o en la diferenciación de las células hematológicas.

20 La presente invención aborda con éxito los inconvenientes de las configuraciones conocidas actualmente al proporcionar un método óptimo y aplicable de forma general para el tratamiento de esencialmente cualquier enfermedad susceptible de un trasplante terapéutico mediante el uso del trasplante de injertos de órganos o de tejidos alógenos / xenogénicos, en virtud de la capacidad de dichos injertos de generar órganos / tejidos derivados del injerto que muestran una diferenciación específica del linaje estructural y funcional óptima, y son óptimamente tolerados por los linfocitos humanos alorreactivos / xenorreactivos en un receptor sin inmunosupresión o con una inmunosupresión mínima. Salvo que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el
25 presente documento tienen el mismo significado al comprendido habitualmente por el experto habitual en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque en la práctica o en el ensayo de la presente invención pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, a continuación se describen los métodos y los materiales adecuados. En caso de conflicto, predominará la memoria descriptiva de la patente, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, los métodos y los ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Breve descripción de los dibujos

35 La invención se describe en el presente documento únicamente a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos anexos. Haciendo ahora una referencia específica a los dibujos con detalle, se acentúa que los detalles mostrados son a modo de ejemplo y únicamente con el fin de ilustrar el análisis de las formas de realización preferidas de la presente invención, y se presentan con el propósito de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente comprendida de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto no se realiza
40 ningún intento de mostrar los detalles estructurales de la invención con más detalle del necesario para una comprensión fundamental de la invención, permitiendo la descripción, tomada junto con los dibujos, que los expertos en la materia aprecien cómo pueden llevarse a la práctica las diversas formas de la invención.

En los dibujos:

45 Las FIGs. 1 a - j son fotografías que representan el crecimiento y la diferenciación de precursores renales tempranos humanos y porcinos después del trasplante. Las Figuras 1 a - b, respectivamente, representan una imagen macroscópica y la histología (Figura 1 b; H&E; ampliación x 10 del original) de un injerto de tejido renal humano en una fase de gestación de 8 semanas, 8 semanas después del trasplante. Nótese el crecimiento masivo y la
50 formación de la forma de un riñón (flecha) y el aspecto de las capas de los glomérulos y los túbulos. Las Figuras 1 c - d son una imagen macroscópica y un análisis histológico (H&E; ampliación x 10 del original), respectivamente, de un injerto de tejido renal porcino en una fase de gestación de 4 semanas, 8 semanas después del trasplante. Nótese el crecimiento masivo (flecha) y los lechos vasculares externos y los numerosos glomérulos y túbulos. Las células renales embrionarias tempranas trasplantadas se diferencian en otros tipos celulares después del trasplante de injertos renales porcinos en una fase de gestación de entre 20 y 21 días (Figuras 1 e - g) y de injertos renales porcinos en una fase de gestación de entre 24 y 25 días (Figuras 1 h - j). La Figura 1 e es una ampliación x 4 del original de una microfotografía de la histología de H&E que muestra los vasos sanguíneos (cabezas de flecha), el cartílago (flecha grande) y el hueso (flechas pequeñas). Las Figuras 1 f - g son ampliaciones x 40 del original de microfotografías de la histología de H&E que representan el hueso y el cartílago, respectivamente. La Figura 1 h es
60 una ampliación x 10 del original de una microfotografía de la histología de H&E que muestra los miofibroblastos (cabezas de flecha) y el cartílago (flecha grande). Las Figuras 1 i - j son ampliaciones x 40 del original de microfotografías de la histología de H&E que representan los miofibroblastos y una estructura representativa de tejido de tipo glandular, respectivamente.

65 Las FIGs. 2 a - j son microfotografías que representan la vascularización de injertos derivados de tejido renal en una fase de gestación temprana por parte de los vasos sanguíneos del ratón receptor. Se muestra la inmunotinción de injertos de tejido renal humano en una fase de gestación de 8 semanas (Figuras 2 a, 2 c y 2 e) y porcino en una fase

de gestación de 4 semanas (Figuras 2 b, 2 d y 2 f), 4 semanas después del trasplante, con el anticuerpo anti CD31 de ratón (PECAM) (ampliación x 40 del original). Las Figuras 2 c - d representan la tinción positiva (cabezas de flecha) en los vasos más grandes, las Figuras 2 e - f representan los capilares de tamaño medio y pequeño, y las Figuras 2 g - h representan los glomérulos en desarrollo. Las Figuras 2 g - h representan la ausencia de tinción de los glomérulos y de los vasos capilares de pequeño tamaño maduros de tejido renal fetal humano en una fase de gestación de 16 semanas y de porcino en una fase de gestación de 8 semanas, 4 semanas después del trasplante.

Las Figuras 2 i - j muestran la ausencia de vasos derivados del hospedador en riñones fetales de control vascularizados humanos y porcinos, respectivamente (ampliación x 20 del original).

Las FIGs. 3 a - b son fotografías del injerto completo que representan quistes rellenos con un fluido similar a la orina generados por los trasplantes de precursores renales embrionarios tempranos humanos y porcinos. Las Figuras 3 a - b representan, respectivamente, imágenes macroscópicas de injertos intraabdominales derivados de tejido humano en una fase de gestación de 8 semanas y porcino en una fase de gestación de 4 semanas que contienen grandes quistes (indicados por flechas), 8 semanas después del trasplante. El análisis del fluido de los quistes lo identificó como orina diluida.

Las FIGs. 4 a - d son representaciones gráficas de datos que representan las curvas de crecimiento de injertos de tejido renal humano en una fase de gestación de 14, 10, 8 y 7 semanas, respectivamente, en presencia (▲, triángulos negros) o en ausencia (□, cuadrados blancos) de PBMC humanas alorreactivas. En injertos de tejido renal en una fase de gestación de 14 o 10 semanas, 8 semanas después del trasplante, $P < 0,01$ y $P < 0,05$ en comparación con los controles, respectivamente.

Las FIGs. 4 e - f son microfotografías que representan el trasplante de un injerto de tejido renal humano en una fase de gestación de 14 semanas inmunoteñido con anticuerpos contra los CD3 humanos (ampliación x 40 del original) que muestra la destrucción del glomérulo (Figura 4 e) y del túbulo (Figura 4 f) por parte de los linfocitos T humanos.

Las FIGs. 4 g - h son microfotografías que representan un trasplante derivado de un tejido renal en una fase de gestación de 8 semanas inmunoteñido con anticuerpos específicos contra los CD3 humanos (ampliación x 40 del original). Nótese la ausencia de infiltración de linfocitos T y la presencia de glomérulos y de túbulos intactos (Figuras 4 g - h, respectivamente).

Las FIGs. 5 a - b son representaciones gráficas de datos que representan las curvas de crecimiento de injertos derivados de tejido renal humano en una fase de gestación de 8 semanas (Figura 5 a) en receptores que reciben dos infusiones independientes de PBMC humanas alorreactivas en el momento del trasplante y 6 semanas después del trasplante (▲, triángulos negros), o en receptores que no han recibido las PBMC (□, cuadrados blancos). La curva de crecimiento de los trasplantes que se originan a partir de fetos humanos de 14 semanas de edad muestran una detención en el crecimiento (Figura 5 b; ▲, triángulos negros) cuando estos últimos son trasplantados en receptores junto con la segunda dosis de PBMC humanas, en comparación con aquellos que no reciben la infusión de PBMC (□, cuadrados blancos; $P < 0,05$, 8 semanas después del trasplante).

Las FIGs. 6 a - c son microfotografías que representan el rechazo de injertos derivados de tejido renal porcino adulto por parte de los leucocitos humanos. Las Figuras 6 a - b son imágenes ampliadas a x 4 y a x 20, respectivamente, que representan la tinción histológica con hematoxilina y eosina (H&E) de injertos derivados de tejido renal porcino adulto subcapsular 4 semanas después de la infusión intraperitoneal de PBMC humanas. La Figura 6 c representa la infiltración de linfocitos T en el tejido trasplantado, según se determina mediante el uso de una detección inmunohistoquímica de los CD3 humanos.

Las FIGs. 7 a - d son representaciones gráficas de datos que representan las curvas de crecimiento de injertos de tejido renal porcino en una fase de gestación de 8, 6, 4 y 3 semanas (Figuras 7 a - d, respectivamente) en presencia (▲, triángulos negros) o en ausencia (□, cuadrados blancos) de PBMC humanas xenorreactivas. En los trasplantes procedentes de fetos porcinos de 8 o 6 semanas de edad, 8 semanas después del trasplante, $P < 0,01$ y $P < 0,05$ en comparación con los controles, respectivamente.

Las FIGs. 8 a - c son microfotografías que representan la destrucción del tejido trasplantado mediante la invasión de linfocitos T humanos en un trasplante derivado de tejido renal porcino en una fase de gestación de 8 semanas, 4 semanas después del trasplante. Las Figuras 8 a - b (ampliación x 40 del original) representan la inmunotinción con anticuerpos contra los CD3 humanos, y la FIG. 8 c representa la tinción histológica con H&E (ampliación x 10 del original).

Las FIGs. 9 a - b son microfotografías de un trasplante derivado de tejido renal porcino en una fase de gestación de 4 semanas que muestra los glomérulos y los túbulos conservados sin ningún infiltrado positivo de CD3 (ampliación x 40 del original), 4 semanas después del trasplante.

Las FIGs. 10 a - b son representaciones gráficas de datos que representan unas curvas de crecimiento similares de injertos derivados de tejido renal porcino en una fase de gestación de 4 semanas (Figura 10 a) en receptores que reciben 2 infusiones independientes de PBMC humanas xenorreactivas en el momento del trasplante y 4 semanas después del trasplante (▲, triángulos negros), o en receptores que no han recibido las PBMC (□, cuadrados blancos). La curva de crecimiento (Figura 10 b) de los trasplantes procedentes de fetos porcinos de 8 semanas de edad muestran una detención en el crecimiento (▲, triángulos negros) cuando estos últimos son trasplantados en receptores junto con la segunda dosis de PBMC humanas y en comparación con aquellos que no reciben la infusión de PBMC (□, cuadrados blancos) ($P < 0,05$, 8 semanas después del trasplante).

Las FIGs. 11 a - c son fotografías de UV de una electroforesis en gel de agarosa que representan el análisis mediante una RT-PCR de la expresión del ARNm de la molécula coestimulante en tejido renal humano normal en desarrollo (previo al trasplante), en tejido renal humano en desarrollo trasplantado inmediatamente después del trasplante, pero antes de la administración de las PBMC humanas alorreactivas (después del trasplante) y 2, 4 y 6

semanas después de que los ratones receptores fueran reconstituidos con las PBMC humanas. Los trasplantes analizados derivaban de tejidos renales humanos en unas fases de gestación de 8, 14 y 22 semanas (Figuras 11 a - c, respectivamente).

Las FIGs. 12 a - c representan los patrones de expresión génica diferencial de genes relacionados con la inmunidad de tejidos renales humanos normales adultos frente a los que están en fase de gestación. La Figura 12 a es un dendrograma de agrupamiento jerárquico (Zuo, F. *et al.*, 2002. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 99, 6292 - 6297) de los grupos experimentales generados sobre la base de la similitud de sus perfiles de expresión, que representan que los patrones de expresión adulto y fetal se agrupan independientemente. La Figura 12 b es un diagrama del resultado de un análisis en micromatriz que representa los patrones de expresión génica de los 231 genes relacionados con la inmunidad analizados, demostrando que 122 de dichos genes tenían una puntuación de TNoM = 0 o 1 (Kaminski, N. y Friedman, N., 2002. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 27, 125 - 132). Los valores de la expresión génica se dividieron por la media geométrica de todas las muestras, se transformaron logarítmicamente y después se representaron gráficamente mediante el uso del programa informático PLOTTOPGENE (Kaminski, N. y Friedman, N., 2002. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 27, 125 - 132). El color amarillo y el púrpura representan la expresión máxima y mínima, respectivamente. Nótese que la mayoría de los genes relacionados con la humanidad eran expresados a unos niveles menores en la fase de gestación en comparación con el tejido renal adulto. La Figura 12 c es una representación de datos que representa la expresión génica de 68 genes con un TNoM = 0 ($P < 0,05$). Las representaciones gráficas son los valores de la expresión media de todos los genes del grupo. Para eliminar el efecto de los valores atípicos, los genes se normalizaron a un intervalo de [0, 1], lo que significa que el valor máximo de cada gen se establecía en 1, el valor mínimo era de cero y el resto de los valores se ajustaban linealmente en este intervalo. Nótese de nuevo que la mayoría de los genes estadísticamente significativos (57 / 68) eran menores en la fase de gestación en comparación con el tejido renal en fase adulta.

La FIG. 13 es una fotografía del injerto completo que representa un injerto derivado de tejido pancreático humano en una fase de gestación de 12 semanas, 8 semanas después del trasplante, trasplantado en un ratón receptor NOD / SCID portador de PBMC humanas alorreactivos. Nótese el pronunciado crecimiento del injerto y la ausencia de cualquier signo de rechazo del injerto.

Las FIGs. 14 a - b son microfotografías que representan un injerto derivado de hígado porcino en una fase de gestación de 21 días teñido con H&E trasplantado en un ratón receptor NOD / SCID, 7 semanas después del trasplante a una ampliación de x 4 y de x 20 del original, respectivamente. La Figura 14 a muestra el claro desarrollo de un teratoma con una amplia diferenciación del cartílago (Figura 14 b).

Las FIGs. 15 a - d son microfotografías que representan la diferenciación hepática en secciones histológicas de injertos derivados de hígado porcino en una fase de gestación de 28 días trasplantados en el bazo de un ratón NOD / SCID, 6 semanas después del trasplante, teñidos con H&E (Figura 15 a), ácido peryódico-Schiff (PAS; Figura 15 b), anticuerpo anti albúmina porcina (Figura 15 c) y anticuerpo anti Ki67 (Figura 15 d). Nótese los patrones lobulares de la configuración de los hepatocitos en las Figuras 15 a - c. La funcionalidad del hígado en crecimiento es sugerida por la tinción para el PAS y para la albúmina (Figuras 15 b y 15 c, respectivamente). Ampliación original de las microfotografías de las Figuras 15 a - c: x 10. En la Figura 15 d, la tinción positiva de los núcleos de los hepatocitos (flechas) con anticuerpo anti Ki67 demuestra la proliferación de hepatocitos derivados del injerto.

Las FIG. 16 a - b son microfotografías que representan la diferenciación hepática en secciones histológicas de un injerto derivado de hígado porcino en una fase de gestación de 28 días trasplantado bajo la cápsula renal de un ratón NOD / SCID, 6 semanas después del trasplante. Las secciones se tiñeron con PAS y con anticuerpo anti albúmina porcina (Figuras 16 a y 16 b, respectivamente). Ampliación original: x 4. La actividad funcional del hígado trasplantado se demuestra por la síntesis de glucógeno (positividad del PAS) y de albúmina.

Las FIGs. 17 a - b son microfotografías que representan la diferenciación hepática en una sección histológica de un injerto derivado de hígado humano en una fase de gestación de 7 semanas trasplantado bajo la cápsula renal de un ratón NOD / SCID, 6 semanas después del trasplante. La Figura 17 a representa la tinción con H&E, a una ampliación x 4 del original, nótese la diferenciación del conducto biliar (flechas). La Figura 17 b representa la tinción con PAS, a una ampliación x 40 del original, nótese la presencia de hepatocitos diferenciados con glucógeno almacenado.

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

Las FIGs. 18 b - c son microfotografías que representan la diferenciación de tejido pancreático en una sección histológica de un injerto derivado de páncreas porcino en una fase de gestación de 27 días trasplantado bajo la cápsula renal de un ratón NOD / SCID, 6 semanas después del trasplante. Las Figuras 18 b y 18 c representan microfotografías de la sección con poco y mucho aumento, respectivamente. La sección se tiñó con H&E, nótese la diferenciación del lóbulo pancreático, con las estructuras ductales y acinares pancreáticas.

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

Las FIGs. 20 a - b son microfotografías que representan la diferenciación pancreática funcional en una sección de un injerto derivado de páncreas humano en una fase de gestación de 8 semanas trasplantado bajo la cápsula renal de un ratón NOD / SCID, 6 semanas después del trasplante. La sección se inmunotifó con anticuerpo anti insulina, nótese los focos de células beta positivas para la insulina. La Figura 20 a es una microfotografía tomada con poca ampliación, y la Figura 20 b es una microfotografía tomada con mucha ampliación que destaca la expresión de la insulina en un islote de Langerhans.

Las FIGs. 20 c - d son microfotografías que representan la diferenciación pancreática en una sección histológica de un injerto derivado de páncreas humano en una fase de gestación de 8 semanas trasplantado bajo la cápsula renal de un ratón NOD / SCID, 6 semanas después del trasplante. La sección se inmunotifó con anticuerpo anti vimentina (no reactivo con los tejidos del ratón), nótese la diferenciación de las células mesenquimatosas de origen humano en el injerto (Figura 20 d). Las Figuras 20 c y 20 d son microfotografías de la sección teñida tomadas con poco y con mucho aumento del original, respectivamente.

Las FIGs. 21 a - c son microfotografías que representan la diferenciación cardíaca en secciones histológicas de un injerto derivado de corazón humano en una fase de gestación de 9 semanas trasplantado bajo la cápsula renal de un ratón NOD / SCID, 6 semanas después del trasplante. La Figura 21 a representa una sección teñida con H&E, nótese que el trasplante contiene dos tipos distintos de componentes celulares específicos cardíacos: estructuras cardiomiocíticas ("CM") y ganglionares basales ("BG"). Las Figuras 21 b y 21 c representan secciones inmunoteñidas con anticuerpo anti actina alfa-sarcomérica y con anticuerpo anti proteína neurofilamentosa, respectivamente. Nótese los grupos de células cardiomiocíticas identificados por la positividad para la actina alfa-sarcomérica, y las células ganglionares basales por la positividad de la proteína neurofilamentosa.

La FIG. 22 es una microfotografía que representa la diferenciación esplénica en una sección histológica teñida con H&E del injerto derivado de bazo porcino en una fase de gestación de 28 días trasplantado bajo la cápsula renal de un ratón NOD / SCID, 6 semanas después del trasplante. Nótese la diferenciación del bien vascularizado tejido mesenquimatoso. La microfotografía se tomó con un aumento de x 4 del original.

Descripción de las formas de realización preferidas

La presente divulgación es sobre métodos para el tratamiento de enfermedades mediante el trasplante de órganos / tejidos no singénicos en desarrollo y sobre métodos para la evaluación de la idoneidad del trasplante de injertos. Específicamente, la presente divulgación se refiere al trasplante de injertos de órganos o de tejidos humanos en fase de gestación de entre 7 y 9 semanas, o porcinos en una fase de gestación de entre 27 y 28 semanas, para el tratamiento de enfermedades en seres humanos, tales como enfermedades renales, pancreáticas, hepáticas, cardíacas, genéticas y/o hematológicas. Los injertos humanos y porcinos en dicha fase de gestación tienen la capacidad de generar, en ausencia de teratomas derivados del injerto, órganos / tejidos estructuralmente y funcionalmente diferenciados, vascularizados por el hospedador, tolerados óptimamente por los linfocitos humanos alorreactivos / xenoreactivos, sin una inmunosupresión del hospedador o con una inmunosupresión mínima. En particular, dichos injertos, cuando derivan de órganos / tejidos renales, tienen la capacidad de generar órganos renales productores de orina vascularizados por el hospedador; cuando derivan de órganos / tejidos pancreáticos, tiene la capacidad de generar islotes pancreáticos que comprenden células beta productoras de insulina; cuando derivan de órganos / tejidos hepáticos, tienen la capacidad de generar células y tejidos hepáticos estructuralmente y funcionalmente diferenciados. Dichos injertos humanos, cuando derivan de órganos / tejidos cardíacos, tienen la capacidad de generar células y tejidos cardíacos proliferativos. Dichos injertos porcinos, cuando derivan de órganos / tejidos linfoides, tienen la capacidad de diferenciarse en tejidos linfoides mesenquimatosos / estromales bien diferenciados y vascularizados. Como tal, el trasplante de dichos injertos humanos o porcinos en fase de gestación puede usarse para el tratamiento de sujetos humanos que padecen una enfermedad que es susceptible de un trasplante terapéutico de células, tejidos y/u órganos, tales como una enfermedad renal, pancreática, hepática, cardíaca, genética y/o hematológica, sin una inmunosupresión de los receptores de los injertos o con una inmunosupresión mínima.

Antes de explicar con detalle al menos una forma de realización de la invención, debe entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles establecidos en la siguiente descripción o ejemplificados por los Ejemplos. La invención es susceptible de otras formas de realización o de ser llevada a la práctica o llevada a cabo de varias formas. También debe entenderse que la fraseología y la terminología empleadas en el presente documento son con fines descriptivos y no deberían contemplarse como limitantes.

El trasplante de órganos o de tejidos es la terapia óptima o única para numerosas enfermedades devastadoras y mortales, tales como enfermedades renales, pancreáticas, hepáticas, cardíacas, hematológicas y/o genéticas. Sin embargo, los métodos de trasplante actuales se ven gravemente impedidos por unas fuente inadecuadas de donantes adecuados de órganos / tejidos y por el requisito de un tratamiento inmunosupresor permanente y perjudicial de los receptores del injerto para prevenir el rechazo del injerto. Las estrategias sugeridas para superar estos obstáculos implican el uso de injertos de órganos o tejidos xenogénicos, que están disponibles en unas cantidades suficientes, y/o el desarrollo de injertos de órganos o de tejidos que han demostrado ser mejor tolerados por receptores no compatibles que los injertos de órganos o de tejidos completamente diferenciados.

En la técnica anterior se han intentado varias metodologías para el empleo de los trasplantes de órganos / tejidos en desarrollo y/o no singénicos para el tratamiento de enfermedades en seres humanos.

Por ejemplo, se ha intentado el trasplante de órganos / tejidos renales en fase de gestación en receptores alogénicos no inmunosuprimidos, en receptores xenogénicos tratados mediante un bloqueo de la coestimulación con CTLA4-Ig, o en receptores xenogénicos inmunodeficientes reconstituidos con PBMC humanas. Se ha intentado el trasplante de órganos / tejidos pancreáticos en fase de gestación a través del trasplante de células de los islotes, de

- 5 pancreasas o de islotes pancreáticos en fase de gestación cultivados, en receptores xenogénicos inmunodeficientes, o el trasplante de grupos de células de islotes fetales porcinos en receptores humanos diabéticos. Otra metodología ha intentado el trasplante de tejido estriado mesencefálico ventral fetal alogénico en receptores humanos con la enfermedad de Parkinson.
- 10 Sin embargo, todas las metodologías de la técnica anterior que emplean el trasplante de injertos de órganos o de tejidos no singénicos en desarrollo, tales como injertos humanos o porcinos, en un receptor, no han conseguido proporcionar un método para generar en un receptor órganos / tejidos derivados del injerto que: (i) estén óptimamente diferenciados estructuralmente / funcionalmente; (ii) sean totalmente / óptimamente tolerados por los
- 15 linfocitos humanos alorreactivos / xenorreactivos en un receptor sin una inmunosupresión del receptor del injerto o con una inmunosupresión mínima (iii) sean óptimamente vascularizados por el hospedador; y (iv) puedan ser generados en ausencia de teratomas derivados del injerto.

En particular, las metodologías de la técnica anterior no han conseguido proporcionar un método para generar en un receptor órganos / tejidos renales humanos o porcinos derivados del injerto que muestren una diferenciación estructural / funcional óptima, incluyendo la producción de orina, y que puedan ser generados en ausencia de teratomas derivados del injerto y que sean óptimamente tolerados por los linfocitos humanos alorreactivos / xenorreactivos en el receptor sin una inmunosupresión del receptor o con una inmunosupresión mínima.

- 20 Además, las metodologías anteriores no han conseguido proporcionar un método para generar en un receptor órganos / tejidos pancreáticos humanos o porcinos derivados del injerto que incluyan los islotes pancreáticos y células beta productoras de insulina, que puedan ser generados en ausencia de teratomas y que sean óptimamente tolerados por los linfocitos humanos alorreactivos / xenorreactivos en el receptor.

- 25 Adicionalmente, las metodologías de la técnica anterior no han conseguido proporcionar un método para generar en un receptor células / tejidos hepáticos humanos o porcinos derivados del injerto estructuralmente y funcionalmente diferenciados, que puedan ser generados en ausencia de teratomas derivados del injerto y que sean óptimamente tolerados por los linfocitos humanos alorreactivos / xenorreactivos en el receptor.

- 30 Adicionalmente, las metodologías de la técnica anterior no han conseguido proporcionar un método para generar en un receptor células / tejidos cardíacos humanos proliferativos derivados del injerto que puedan ser generados en ausencia de teratomas derivados del injerto y que sean óptimamente tolerados por los linfocitos humanos alorreactivos en el receptor.

- 35 Asimismo, las metodologías de la técnica anterior no han conseguido proporcionar un método para generar en un receptor tejidos linfoides porcinos bien diferenciados y vascularizados derivados del injerto que puedan ser generados en ausencia de teratomas derivados del injerto y que sean óptimamente tolerados por los linfocitos humanos xenorreactivos.

- 40 Al llevar a la práctica la presente invención, se descubrió inesperadamente la existencia de unas fases de gestación específicas para las cuales los órganos / tejidos no muestran / expresan sustancialmente correceptores específicos de los linfocitos o de los ligandos de los mismos, y para las que pueden trasplantarse órganos / tejidos en un receptor de forma que se generen, en ausencia de teratomas derivados del injerto, células, órganos y tejidos que muestren una diferenciación estructural y funcional óptima, tales como, en el caso de injertos renales, la producción de orina; y que sean ópticamente tolerados por los linfocitos humanos alorreactivos / xenorreactivos en el receptor,
- 45 sin una inmunosupresión del receptor o con una inmunosupresión mínima.

- 50 En particular, al llevar a la práctica la presente invención, se descubrieron y definieron unas fases de gestación específicas durante las cuales los injertos renales humanos o porcinos pueden ser trasplantados en un receptor de forma que se generen, en ausencia de una formación de teratomas derivados del injerto, órganos y tejidos renales productores de orina óptimamente diferenciados estructuralmente y funcionalmente que son óptimamente tolerados por los linfocitos humanos alorreactivos / xenorreactivos en el receptor en ausencia de una inmunosupresión del receptor o con una inmunosupresión mínima.

- 55 Adicionalmente, al llevar a la práctica la presente invención, se descubrieron y definieron unas fases de gestación específicas durante las cuales los injertos hepáticos humanos o porcinos pueden ser trasplantados en un receptor de forma que se generen, en ausencia de una formación de teratomas derivados del injerto, órganos / tejidos hepáticos óptimamente diferenciados estructuralmente y funcionalmente que sean óptimamente tolerados por los linfocitos humanos alorreactivos / xenorreactivos.

- 60 Además, al llevar a la práctica la presente invención, se descubrieron y definieron unas fases de gestación específicas durante las cuales los injertos pancreáticos humanos o porcinos pueden ser trasplantados en un

receptor de forma que se generen, en ausencia de una formación de teratomas derivados del injerto, órganos / tejidos pancreáticos estructuralmente y funcionalmente diferenciados que incluyan islotes pancreáticos y células beta productoras de insulina que sean óptimamente tolerados por los linfocitos humanos alorreactivos / xenorreactivos.

Adicionalmente, al llevar a la práctica la presente invención, se descubrieron y definieron unas fases de gestación específicas durante las cuales los injertos cardíacos humanos pueden ser trasplantados en un receptor de forma que se generen, en ausencia de una formación de teratomas derivados del injerto, células / tejidos cardíacos diferenciados y proliferativos que sean óptimamente tolerados por los linfocitos humanos alorreactivos.

Asimismo, al llevar a la práctica la presente invención, se descubrieron y definieron unas fases de gestación específicas durante las cuales los injertos linfoides porcinos pueden ser trasplantados en un receptor de forma que se generen, en ausencia de una formación de teratomas, células / tejidos linfoides mesenquimatosos / estromales bien diferenciados y vascularizados que serán bien tolerados por los linfocitos humanos xenorreactivos.

Por lo tanto, el trasplante de injertos derivados de órganos / tejidos humanos o porcinos en las fases de gestación mencionadas anteriormente puede usarse para la sustitución / reparación estructural / funcional de órganos / tejidos que muestran una fisiología / morfología patológica en los receptores de dichos injertos, y que por lo tanto pueden usarse para el tratamiento de enfermedades relacionadas con dichos órganos / tejidos que muestran dicha fisiología / morfología patológica, sin ninguna inmunosupresión del receptor o con una inmunosupresión mínima.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para el tratamiento de un trastorno relacionado con la fisiología o morfología patológica de un órgano o de un tejido.

El método se lleva a cabo mediante el trasplante en un sujeto en necesidad del mismo de un injerto de un órgano o de un tejido de mamífero terapéuticamente eficaz seleccionado: (i) para que no exprese ni presente sustancialmente ninguna molécula capaz de estimular o de potenciar una respuesta inmunitaria en el sujeto; (ii) en una fase de diferenciación predeterminada lo suficientemente avanzada como para que sea capaz de generar órganos / tejidos estructuralmente y funcionalmente diferenciados de esencialmente un único tipo en el sujeto, preferiblemente en ausencia de una formación de teratomas derivados del injerto, pero lo suficientemente temprana como para permitir que el injerto sea óptimamente tolerado por los linfocitos no singénicos; o (iii) preferiblemente ambos.

Dependiendo del contexto del trasplante, con objeto de facilitar la incorporación del injerto, el método puede comprender adicionalmente ventajosamente el tratamiento del sujeto con un régimen inmunosupresor antes, junto con o después del trasplante del injerto.

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

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

Según se usa en el presente documento, la frase "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 el tratamiento del trastorno.

A continuación se describen adicionalmente métodos para la selección de un injerto que no exprese ni presente sustancialmente la molécula, o en una fase de diferenciación predeterminada.

El trasplante del injerto puede llevarse a cabo de varias formas, dependiendo de diversos parámetros, tales como, por ejemplo, el tipo, la fase o la gravedad del trastorno, los parámetros físicos o fisiológicos específicos del sujeto individual y/o el resultado terapéutico deseado. Por ejemplo, dependiendo de la aplicación y del fin, el trasplante del injerto puede llevarse a cabo mediante el uso de un injerto procedente de cualquiera de las diversas especies de mamíferos y/o de tipos de órganos o de tejidos, mediante la implantación del injerto en diversas ubicaciones anatómicas del sujeto, mediante el uso de un injerto que consiste en un órgano o un tejido total o parcial, y/o mediante el uso de un injerto que consiste en varios órganos o tejidos individuales y/o porciones de los mismos.

El experto habitual en la materia, tal como un médico, en particular un cirujano de trasplantes especializado en el trastorno, poseerá la pericia necesaria para la selección y el trasplante del injerto adecuado, de forma que se trate el trastorno de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención.

Dependiendo de la aplicación y del fin, el método puede llevarse a cabo mediante el uso de un injerto singénico, alogénico o xenogénico derivado esencialmente de cualquier especie de mamífero.

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

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

Según se usa en el presente documento, un injerto "no singénico" se refiere a un injerto alogénico o a un injerto xenogénico.

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

Normalmente, dos mamíferos de la misma especie que no sean clones ni gemelos son alogénicos entre sí.

Según se usa en el presente documento, un "injerto xenogénico" se refiere a un injerto derivado de un donante no singénico con el sujeto o no singénico con una proporción sustancial de los linfocitos presentes en un sujeto, en el que el donante es de una especie diferente a la del sujeto o de una especie diferente a la de una proporción sustancial de los linfocitos presentes en el sujeto.

Normalmente, los mamíferos de diferentes especies son xenogénicos entre sí.

Según se describe y se ilustra en la siguiente sección de Ejemplos, puede usarse el trasplante de un injerto humano o animal de la presente divulgación en un receptor para generar órganos y tejidos óptimamente diferenciados estructuralmente y funcionalmente, en ausencia de una formación de teratoma, que son opcionalmente tolerados por los linfocitos humanos alorreactivos / xenorreactivos del receptor sin una inmunosupresión del receptor o con una inmunosupresión mínima.

Según se usa en el presente documento, un injerto "óptimamente tolerado" es un injerto que no es rechazado o que no es infiltrado sustancialmente por parte de los linfocitos T no singénicos del sujeto en el injerto.

Según se usa en el presente documento, un injerto que es "rechazado" es un injerto que provoca lo que habitualmente se conoce en la materia como rechazo hiperagudo, rechazo agudo o rechazo crónico. En la bibliografía de la técnica se proporciona una amplia guía para la determinación del rechazo del injerto (por ejemplo, consúltese: 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 infiltración de un objeto por parte de los linfocitos T del receptor del injerto normalmente se correlaciona con el rechazo del injerto.

Según se usa en el presente documento, un "tratamiento inmunosupresor mínimo" del sujeto se refiere a un tratamiento inmunosupresor del sujeto restringido a la administración de un fármaco capaz de bloquear una interacción entre un correceptor de linfocitos y un ligando análogo de los mismos, o a un tratamiento inmunosupresor del sujeto aplicado durante un único periodo de 20 días o menos.

Según se ha descrito anteriormente en el presente documento, el injerto puede derivar de varias especies de mamífero.

Dependiendo de la aplicación y del fin, el injerto es preferiblemente un injerto humano o un injerto porcino.

Al llevar a la práctica la presente invención, se identificaron las fases de gestación de los injertos de órganos / tejidos humanos para los que éstos están en una fase de diferenciación predeterminada adecuada para llevar a cabo el método, según se describe en la siguiente sección de Ejemplos.

Preferiblemente, el injerto humano se selecciona en una fase de diferenciación correspondiente a entre 5 y 16 semanas de gestación, más preferiblemente a entre 6 y 15 semanas de gestación, más preferiblemente a entre 7 y 14 semanas de gestación, más preferiblemente a entre 7 y 9 semanas de gestación y lo más preferiblemente a entre 7 y 8 semanas de gestación.

Según se describe y se muestra en la sección de Ejemplos que sigue, pueden usarse los injertos humanos de la presente divulgación seleccionados en una fase de gestación de entre 7 y 8 semanas de gestación para generar órganos y tejidos óptimamente diferenciados funcionalmente y estructuralmente, en ausencia de la formación de un teratoma derivado del injerto, que son óptimamente tolerados por los linfocitos humanos alorreactivos del receptor sin una inmunosupresión del sujeto o con una inmunosupresión mínima.

Según se usa en el presente documento, la frase "linfocitos alorreactivos" se refiere a linfocitos sustancialmente capaces de rechazar un injerto alogénico esencialmente completamente diferenciado.

Al llevar a la práctica el método de la presente invención, se demostró la aplicabilidad universal del método con respecto a los diferentes tipos de células / órganos / tejidos mediante el uso de injertos renales, hepáticos, pancreáticos y cardíacos alogénicos de origen humano.

Según se describe y se muestra en el Ejemplo 1 de la sección de Ejemplos que sigue, puede usarse el trasplante en un receptor de un injerto renal humano de la presente divulgación seleccionado en una fase de diferenciación correspondiente a entre 7 y 8 semanas de gestación para generar, en ausencia de la formación de un teratoma derivado del injerto, órganos y tejidos renales óptimamente diferenciados funcionalmente y estructuralmente que son capaces de producir orina y que son óptimamente tolerados por los linfocitos alorreactivos humanos del receptor, sin una inmunosupresión del receptor o con una inmunosupresión mínima.

Según se describe y se muestra en el Ejemplo 6 de la sección de Ejemplos que sigue, puede usarse un injerto hepático humano de la presente divulgación seleccionado en una fase de diferenciación correspondiente a 7 semanas de gestación para generar, en ausencia de la formación de un teratoma derivado del injerto, órganos / tejidos hepáticos funcionalmente y estructuralmente diferenciados que serán óptimamente tolerados por los linfocitos alorreactivos humanos del receptor, sin una inmunosupresión del receptor o con una inmunosupresión mínima.

Según se describe y se muestra en el Ejemplo 7 de la sección de Ejemplos que sigue, puede usarse el trasplante en un receptor de un injerto pancreático humano de la presente divulgación seleccionado en una fase de diferenciación correspondiente a 8 semanas de gestación para generar, en ausencia de la formación de un teratoma derivado del injerto, órganos / tejidos pancreáticos derivados del injerto funcionalmente y estructuralmente diferenciados que incluyen islotes pancreáticos y células beta productoras de insulina que serán óptimamente tolerados por los linfocitos alorreactivos humanos del receptor, sin una inmunosupresión del receptor o con una inmunosupresión mínima.

Según se describe y se muestra en el Ejemplo 8 de la sección de Ejemplos que sigue, puede usarse el trasplante en un receptor de un injerto cardíaco humano de la presente divulgación seleccionado en una fase de diferenciación correspondiente a 9 semanas de gestación para generar, en ausencia de la formación de un teratoma derivado del injerto, células / tejidos derivados del injerto que muestran un fenotipo cardíaco significativamente proliferativo que serán bien tolerados por los linfocitos alorreactivos humanos del receptor.

Al llevar a la práctica la presente invención, se identificaron las fases de gestación de los órganos / tejidos porcinos durante las cuales éstos están en una fase de diferenciación predeterminada adecuada para llevar a la práctica el método, según se describe en la siguiente sección de Ejemplos.

Preferiblemente, el injerto porcino se selecciona en una fase de diferenciación correspondiente a entre 20 y 63 días de gestación, más preferiblemente a entre 20 y 56 días de gestación, más preferiblemente a entre 20 y 42 días de gestación, más preferiblemente a entre 20 y 35 días de gestación, más preferiblemente a entre 20 y 28 días de gestación, más preferiblemente a entre 24 y 28 días de gestación y lo más preferiblemente a entre 27 y 28 días de gestación.

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

Con objeto de evitar la formación de teratomas, el injerto porcino se selecciona preferiblemente en una fase de diferenciación correspondiente a al menos 22 días de gestación dado que, según se muestra en el Ejemplo 6 de la sección de Ejemplos que sigue, un injerto porcino en una fase de diferenciación correspondiente a una fase de gestación tan temprana como de 21 días presenta el riesgo de provocar teratomas cuando es trasplantado en un hospedador.

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

Según se usa en el presente documento, la frase "linfocitos xenorreactivos" se refiere a linfocitos sustancialmente capaces de rechazar un injerto xenogénico en fase adulta.

Al llevar a la práctica el método de la presente invención, se demostró la aplicabilidad universal del método con respecto a diferentes tipos de células / órganos / tejidos mediante el uso de injertos renales, hepáticos, pancreáticos y linfoides de origen porcino.

Según se describe y se muestra en el Ejemplo de referencia 1 de la siguiente sección de Ejemplos, puede usarse el trasplante en un receptor de un injerto renal porcino de la presente divulgación seleccionado en una fase de diferenciación correspondiente a entre 27 y 28 días de gestación para generar, en ausencia de teratomas derivados del injerto, órganos y tejidos renales derivados del injerto óptimamente diferenciados funcionalmente y estructuralmente que son capaces de producir orina y que son óptimamente tolerados por los linfocitos humanos xenorreactivos del receptor, sin una inmunosupresión del receptor o con una inmunosupresión mínima.

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

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

Según se describe y se muestra en el Ejemplo 9 de la sección de Ejemplos que sigue, puede usarse el trasplante en un receptor de un injerto de un órgano / tejido linfóide porcino de la presente divulgación seleccionado en una fase de diferenciación correspondiente a 28 días de gestación para generar, en ausencia de la formación de un teratoma derivado del injerto, células / tejidos linfoides mesenquimatosos / estromales derivados del hospedador bien diferenciados y vascularizados que serán bien tolerados por los linfocitos humanos xenorreactivos del receptor.

Al llevar a la práctica la presente invención, se descubrió inesperadamente que los órganos / tejidos estructuralmente y funcionalmente diferenciados generados por los injertos muestran una vasculatura predominantemente derivada del sujeto (para detalles adicionales se ruega consultar la siguiente sección de Ejemplos). Sin estar ceñidos a un paradigma, los presentes inventores son de la opinión de que los injertos porcinos de entre 27 y 28 días de gestación, respectivamente, o los injertos derivados de otras especies en unas fases de diferenciación equivalentes, se incorporan óptimamente en el sujeto debido a su capacidad para generar órganos / tejidos que tienen dicha vasculatura derivada predominantemente del sujeto. Apoyándonos en este punto de vista, se ha sugerido en la materia que el grado de vasculatura derivada del hospedador en un injerto trasplantado se correlaciona con la tolerancia de dicho injerto.

El descubrimiento de que el trasplante de órganos / tejidos humanos o porcinos en unas etapas de diferenciación correspondientes a dichas fases de gestación tempranas puede usarse para generar en un receptor unos órganos y tejidos derivados del injerto óptimamente diferenciados estructuralmente y funcionalmente de la estirpe del injerto que son óptimamente tolerados por los linfocitos humanos alorreactivos / xenorreactivos en el receptor, sin una inmunosupresión del receptor o con una inmunosupresión mínima, en ausencia de la formación de un teratoma derivado del injerto, fue inesperado dado que: (i) la técnica anterior enseña que el trasplante de órganos / tejidos en unas etapas de diferenciación más avanzadas es óptimo para dicha aplicación (por ejemplo, consúltese Otonkoski T. *et al.*, 1999. Transplantation 68, 1674); y (ii) dado que se desconocían las fases de gestación más tempranas - y por lo tanto las menos inmunógenas - de los injertos durante las cuales éstos serían capaces de generar órganos / tejidos derivados del injerto óptimamente diferenciados en ausencia de teratomas derivados del injerto.

También pueden emplearse injertos de origen no humano procedentes de numerosas especies, distintas al cerdo, en unas etapas de diferenciación óptimas correspondientes a las anteriormente mencionadas fases de gestación óptimas humanas o porcinas, para llevar a la práctica el método de la presente divulgación. Algunos animales, tales como los principales animales domesticados o de granja y los primates, que han sido ampliamente caracterizados con respecto a la correlación entre la fase de diferenciación y la fase de gestación, pueden ser adecuados para llevar a la práctica el método. Dichos animales incluyen bóvidos (por ejemplo, vaca), équidos (por ejemplo, caballo), óvidos (por ejemplo, cabra, oveja), felinos (por ejemplo, *Felis domestica*), cánidos (por ejemplo, *Canis domestica*), roedores (por ejemplo, ratón, rata, conejo, cobaya, jerbo, hámster) y primates (por ejemplo, chimpancé, mono rhesus, macaco, tití).

Pueden emplearse diversos métodos para la obtención de un injerto en una fase de diferenciación correspondiente a un periodo de gestación específico.

La obtención de dicho injerto se lleva a cabo óptimamente mediante la extracción del injerto a partir de un embrión o de un feto donante del injerto en desarrollo en dicha fase de gestación.

Alguien versado habitualmente en la materia comprenderá que la fase de gestación de un organismo es el periodo de tiempo que transcurre desde la fertilización del ovocito que genera el organismo.

Alternativamente, un injerto en una fase de diferenciación correspondiente a una fase de gestación específica puede obtenerse mediante el cultivo *in vitro* de células, órganos / tejidos que están en una fase de diferenciación más temprana que la del injerto, tal como de células precursoras específicas del órgano, de forma que se genere un injerto en una fase de diferenciación deseada. Dicha diferenciación controlada *in vitro* de células, de tejidos o de órganos se lleva a cabo de forma rutinaria, por ejemplo, mediante el uso del cultivo de líneas celulares madre embrionarias, para generar cultivos que contienen células / tejidos / órganos de las estirpes deseadas. Por ejemplo, para la generación de varias estirpes, incluyendo estirpes endodérmicas tales como el hígado; estirpes ectodérmicas tales como el cerebro, la piel y adrenal; y estirpes mesodérmicas tales como músculo, cartílago, conducto de Müller y corazón, consúltese, por ejemplo: Schuldiner M. *et al.*, 2000. Proc Natl Acad Sci USA 97: 11307 - 11312 y Itskovitz-Eldor J. *et al.*, 2000. Mol Med 6: 88; para la diferenciación pancreática de células madre embrionarias, consúltese, 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 USA 97: 11307 - 11312). Para la diferenciación de estirpes pulmonares, consúltese, por ejemplo, Otto WR, 1997. Int J Exp Pathol. 78: 291 - 310.

Con objeto de tratar óptimamente el trastorno, el trasplante del injerto se lleva a cabo preferiblemente de una forma tal que sustituya o reemplace terapéuticamente el órgano o el tejido que muestra la fisiología o la morfología patológica relacionada con el trastorno.

Por lo tanto, el injerto se selecciona preferiblemente de entre un tipo de órgano o de tejido correspondiente al del órgano o el tejido con la fisiología o la morfología patológica. Por ejemplo, para el tratamiento de un injerto renal, pancreático, hepático o cardíaco, respectivamente. Por ejemplo, para el tratamiento de un trastorno hematológico y/o genético, el injerto es preferiblemente un injerto linfoide. Alternativamente, para el tratamiento de un trastorno hematológico y/o genético, el injerto linfoide puede derivar de cualquier otro tejido linfoide adecuado, dependiendo de la aplicación y del fin, tal como de los nódulos linfáticos, de las placas de Peyer, del timo o de la médula ósea.

Según se describe en la siguiente sección de Ejemplos, el trasplante de un injerto seleccionado de un tipo de órgano o de tejido correspondiente al del órgano o el tejido que muestran una fisiología o una morfología patológica relacionada con el trastorno de acuerdo con el protocolo establecido en el presente documento, puede usarse para el tratamiento del trastorno.

Según se ha descrito anteriormente en el presente documento, el trasplante del injerto puede llevarse a cabo mediante el trasplante del mismo en diversas ubicaciones anatómicas. Preferiblemente, el injerto es trasplantado en una ubicación anatómica en la que tendrá un efecto terapéutico óptimo.

Dependiendo de la aplicación y del fin, el injerto puede ser trasplantado en una ubicación anatómica homotópica (la ubicación anatómica normal para el tipo de órgano o de tejido del injerto), o en una ubicación anatómica ectópica (una ubicación anatómica anormal para el tipo de órgano o de tejido del injerto). Opcionalmente, cuando se trasplanta el injerto, el órgano o el tejido que muestra una fisiología o una morfología patológica puede ser extraído, por ejemplo, de forma que se permita el crecimiento y la incorporación del injerto, por ejemplo, en el contexto de la sustitución de órganos mediante el trasplante del injerto en una ubicación anatómica homotópica.

Según se usa en el presente documento, una "ubicación anatómica homotópica" de un injerto cuyo tipo de órgano o de tejido existe en forma de múltiples homólogos individuales (por ejemplo, riñón derecho e izquierdo, diferentes dedos de la misma mano, etc.) incluye la ubicación anatómica de cualquiera de dichos homólogos.

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

Preferiblemente, el trasplante de un injerto renal de la presente divulgación se lleva a cabo mediante el trasplante del injerto en el espacio intraabdominal, o más preferiblemente, en la cápsula renal. Preferiblemente, el trasplante en la cápsula renal se lleva a cabo mediante un trasplante subcapsular. El trasplante subcapsular permite ventajosamente la inserción de un catéter que únicamente requiere una corta distancia hasta la piel, de donde puede extraerse la orina procedente del injerto renal. El trasplante intraabdominal permite ventajosamente que el sistema excretor del hospedador cree anastomosis con el uréter o la pelvis renal del tejido renal trasplantado en desarrollo. Según se muestra en el Ejemplo 1 de la siguiente sección de Ejemplos, el método puede llevarse a la práctica mediante el trasplante de un injerto renal de la presente divulgación bajo la cápsula renal de un receptor. Alternativamente, el trasplante del injerto renal puede llevarse a cabo mediante el trasplante del injerto en la vena portal, el hígado, el bazo, la grasa testicular, la hipodermis o el epiplón.

El trasplante de un injerto hepático de la presente divulgación puede llevarse a cabo ventajosamente mediante el trasplante del injerto en la vena portal, el hígado, la cápsula renal, la grasa testicular, la hipodermis, el epiplón, el bazo y/o el espacio intraabdominal. Preferiblemente, el trasplante de un injerto hepático de la presente divulgación

se lleva a cabo mediante el trasplante del injerto bajo la cápsula renal o en el bazo. Según se muestra en el Ejemplo 6 de la siguiente sección de Ejemplos, el método puede llevarse a la práctica mediante el trasplante de un injerto hepático de la presente divulgación bajo la cápsula renal o en el bazo.

- 5 El trasplante de un injerto pancreático de la presente divulgación puede llevarse a cabo ventajosamente mediante el trasplante del injerto en la vena portal, el hígado, el páncreas, la grasa testicular, la hipodermis, el epiplón y/o el espacio intraabdominal. Preferiblemente, el trasplante de un injerto pancreático de la presente divulgación se lleva a cabo mediante el trasplante del injerto bajo la cápsula renal. Preferiblemente, para el trasplante de un injerto pancreático en la vena portal, el injerto pancreático es un injerto de un islote pancreático. Según se muestra en el
- 10 Ejemplo 7 de la siguiente sección de Ejemplos, el método puede llevarse a la práctica mediante el trasplante de un injerto pancreático de la presente divulgación bajo la cápsula renal. Una guía para la práctica del trasplante terapéutico de injertos pancreáticos de acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación se proporciona en el Ejemplo 5 de la siguiente sección de Ejemplos.
- 15 El trasplante de un injerto cardíaco de la presente divulgación puede llevarse a cabo ventajosamente, dependiendo de la aplicación y del fin, mediante el trasplante del injerto en la cavidad cardíaca, el corazón, el miocardio y el espacio intraabdominal. Según se muestra en el Ejemplo 8 de la siguiente sección de Ejemplos, el método puede llevarse a la práctica mediante el trasplante de un injerto cardíaco de la presente divulgación bajo la cápsula renal.
- 20 Preferiblemente, para el tratamiento de un trastorno cardíaco relacionado con una isquemia miocárdica debida, por ejemplo, a un infarto de miocardio, se administra el injerto cardíaco en el área del infarto y/o en el área perimetral del infarto. Como será consciente el experto en la materia, el área infartada es fácilmente visible, permitiendo que sea posible dicha localización específica de la aplicación de los injertos terapéuticos. La determinación precisa y la cronología de una dosis eficaz en este caso en particular puede depender, por ejemplo, del tamaño del infarto y del
- 25 tiempo transcurrido tras la aparición de la isquemia miocárdica. En la materia se proporciona una amplia guía para el implante terapéutico de tejidos cardíacos, tal como de un injerto cardíaco de la presente divulgación, en el miocardio lesionado, de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención (consúltese, por ejemplo: Strauer *et al.*, 2001. Dtsch Med Wochenschr. 126: 932; Strauer *et al.*, 2002. Circulation 106: 1913; Stamm *et al.*, 2003. Lancet 361: 45; Perin *et al.*, 2003. Circulation 107: 2294; Assmus *et al.*, 2002. Circulation 106: 3009; Britten *et al.*, 2003. Circulation
- 30 108: 2212; y las Patentes de EE.UU. nº: 5.733.727, 6.395.016 y 6.592.623).

- El trasplante de un injerto linfóide de la presente divulgación, tal como de un injerto esplénico de la presente divulgación, puede llevarse a cabo ventajosamente, dependiendo de la aplicación y del fin, mediante el trasplante del injerto en la vena portal, el hígado, la cápsula renal, la hipodermis, el epiplón, el bazo y el espacio intraabdominal. Según se muestra en el Ejemplo 9 de la siguiente sección de Ejemplos, el método puede llevarse a la práctica mediante el trasplante de un injerto linfóide de la presente divulgación bajo la cápsula renal.
- 35

- Según se ha descrito anteriormente en el presente documento, dependiendo de la aplicación y del fin, el trasplante del injerto puede llevarse a cabo mediante el trasplante de un injerto que consiste en un órgano completo o parcial. El método puede llevarse a cabo ventajosamente mediante el trasplante de un injerto que consiste en un órgano parcial para injertos de órganos en una fase de diferenciación correspondiente a la de un órgano humano en una fase de gestación de 9 semanas o mayor, o a la de un órgano porcino en una fase de gestación de 5 semanas o mayor.
- 40

- Según se muestra en el Ejemplo de referencia 1 de la siguiente sección de Ejemplos, el trasplante de dichos injertos de órganos parciales en unas fases de diferenciación correspondientes a dichas fases de gestación da lugar a una incorporación y/o una diferenciación funcional y estructural significativamente mejoradas del injerto con respecto al trasplante de un injerto de un órgano completo.
- 45

- Según se ha descrito anteriormente en el presente documento, dependiendo de la aplicación y del fin, el trasplante del injerto puede llevarse a cabo mediante el trasplante de un injerto que consiste en varios órganos, tejidos individuales y/o porciones de los mismos.
- 50

- Por ejemplo, puede emplearse ventajosamente el trasplante de un número creciente de injertos de órganos o de tejidos individuales para aumentar el efecto terapéutico fisiológico o físico del injerto hasta los niveles deseados. Por ejemplo, puede usarse el aumento del número de los órganos / tejidos individuales de un injerto de tejido endocrino (por ejemplo, de un injerto de un islote pancreático) para obtener unos niveles de secreción suficientemente altos de la hormona derivada del injerto (por ejemplo, de insulina), de forma que se consiga un efecto deseado (por ejemplo, un aumento en la capacidad de secreción de insulina). En el caso de los injertos renales, puede usarse el aumento en el número de injertos derivados de órganos o de tejidos renales individuales para obtener un número suficiente de órganos renales como para conseguir, por ejemplo, una capacidad de producción de orina lo suficientemente alta como para aliviar o curar un trastorno renal en el sujeto.
- 60

- Según se ha descrito anteriormente en el presente documento, el método para el tratamiento del trastorno puede comprender ventajosamente el tratamiento del sujeto con un régimen inmunosupresor antes de, durante o después del trasplante del injerto.
- 65

Pueden usarse varios tipos de regímenes inmunosupresores para la inmunosupresión del sujeto.

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

Una amplia guía para la selección y la administración de los regímenes inmunosupresores adecuados para el trasplante se proporciona en la bibliografía de la técnica (por ejemplo, consúltese: 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).

Preferiblemente, el régimen inmunosupresor consiste en la administración de un fármaco inmunosupresor al sujeto.

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

Preferiblemente, el fármaco inmunosupresor es capaz de bloquear la unión de un correceptor de linfocitos a un ligando del correceptor de linfocitos análogo del mismo.

Algunos ejemplos de fármacos adecuados capaces de bloquear la unión de un correceptor de linfocitos a un ligando del correceptor de linfocitos análogo incluyen, pero no se limitan a, CTLA4-Ig, anticuerpos anti CD40, anticuerpos anti ligando CD40, anticuerpos anti B7-1 o -2 y anticuerpos anti CD28.

Dichos fármacos polipeptídicos son particularmente ventajosos dado que estos son, al contrario que los fármacos inmunosupresores usados habitualmente tales como la ciclosporina A, esencialmente no tóxicos y/o no carcinógenos, y en virtud de bloqueo pasivo de las interacciones con el receptor de la superficie celular, proporcionan una inmunosupresión reversible y temporal en el sujeto.

Preferiblemente, el fármaco que es capaz de bloquear la unión de un correceptor de linfocitos al ligando del correceptor de linfocitos análogo del mismo es la CTLA4-Ig. La CTLA4-Ig es una proteína de fusión diseñada genéticamente del CTLA4 humano y el dominio Fc de la IgG1. Impide la activación de los linfocitos T mediante la unión al B7 humano, que estimula conjuntamente los linfocitos T a través de CD28.

Una amplia guía para la administración de fármacos inmunosupresores tales como la CTLA4-Ig, de forma que se facilite la inmunosupresión de un receptor de un trasplante, se proporciona en la bibliografía de la técnica (por ejemplo, consúltese: Benhamou PY., 2002. Transplantation 73, S40; Najafian N, y Sayegh MH., 2000. Expert Opin Investig Drugs 9, 2147 - 57).

Preferiblemente, la administración del fármaco inmunosupresor al sujeto se lleva a cabo durante un único periodo de tiempo de entre 1 y 20 días, más preferiblemente de entre 1 y 18 días, más preferiblemente de entre 1 y 16 días y lo más preferiblemente de entre 1 y 14 días, según se describe en el Ejemplo de referencia 1 de la sección de Ejemplos que sigue.

Según se ha descrito y se muestra en el Ejemplo de referencia 1 de la siguiente sección de Ejemplos, el trasplante de un injerto no singénico, tal como de un injerto xenogénico, junto con la administración de la CTLA4-Ig a un sujeto inmunocompetente normal de acuerdo con el protocolo establecido en el presente documento, puede usarse para generar órganos / tejidos estructuralmente y funcionalmente diferenciados tolerados óptimamente por los linfocitos del sujeto.

Como tal, el método de la presente divulgación, es superior a todos los métodos de la técnica anterior para el tratamiento de trastornos mediante el trasplante de órganos / tejidos no singénicos o en desarrollo, dado que puede llevarse a cabo satisfactoriamente mediante la administración temporal de un bloqueante de la interacción del correceptor de linfocitos-ligando del correceptor de linfocitos, en lugar de la administración permanente de agentes inmunosupresores perjudiciales, tales como la ciclosporina A, el método habitual empleado en la técnica anterior.

Aunque el método puede llevarse a la práctica para el tratamiento del trastorno en un sujeto de esencialmente cualquier especie de mamífero, el método se usa preferiblemente para el tratamiento del trastorno en un sujeto humano.

El método puede usarse para tratar esencialmente cualquier trastorno relacionado con la fisiología o la morfología patológica de un órgano o de un tejido que es susceptible de tratamiento a través de un trasplante.

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

- 5 Preferiblemente, el método se usa para el tratamiento de un trastorno renal, hepático, pancreático, cardíaco, genético y/o hematológico.

El método puede usarse para el tratamiento de cualquiera de los diversos trastornos de dichos tipos.

- 10 Algunos ejemplos de trastornos renales que pueden ser tratados mediante el uso de un injerto renal de la presente divulgación incluyen insuficiencia renal aguda, síndrome nefrítico agudo, nefropatía analgésica, enfermedad renal ateroembólica, insuficiencia renal crónica, nefritis crónica, síndrome nefrítico congénito, enfermedad renal en fase terminal, síndrome de Goodpasture, glomerulonefritis proliferativa mesangial por IgM, nefritis intersticial, cáncer de riñón, daños en el riñón, infecciones renales, lesiones renales, cálculos renales, nefritis por lupus, glomerulonefritis membranoproliferativa I, glomerulonefritis membranoproliferativa II, nefropatía membranosa, glomerulonefritis necrotizante, nefroblastoma, nefrocalcinosis, diabetes insípida nefrótica, nefropatía mediada por la IgA, nefrosis, síndrome nefrítico, enfermedad del riñón poliquístico, glomerulonefritis post-estreptocócica, nefropatía por reflujo, embolia de la arteria renal, estenosis de la arteria renal, necrosis papilar renal, acidosis tubular renal de tipo I, acidosis tubular renal de tipo II, infraperfusión renal y trombosis venosa renal.

- 20 Algunos ejemplos de trastornos pancreáticos que pueden ser tratados mediante el uso de un injerto pancreático de la presente divulgación incluyen diabetes de tipo I o de tipo II.

Preferiblemente el método se usa para el tratamiento de la diabetes de tipo I ("diabetes").

- 25 Algunos ejemplos de trastornos hepáticos que pueden ser tratados mediante el uso de un injerto hepático de la presente divulgación incluyen una infección por hepatitis C (Rosen HR, 2003, cirrosis hepática, colangitis esclerosante primaria (Crippin JS, 2002. *Can J Gastroenterol*. 16: 700), carcinoma hepatocelular (Molmenti EP, Klintmalm GB., 2001. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 8: 427 - 34), enfermedad hepática alcohólica (Podevin P. *et al.*, 2001. *J Chir (Paris)*. 138: 147) y hepatitis B (Samuel D., 2000. *Acta Gastroenterol Belg*. 63: 197 - 9).

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

- 40 Se apreciará que, dado que puede usarse un injerto linfóide de la presente divulgación para generar células / tejidos linfoides mesenquimatosos / estromales derivados del injerto bien diferenciados y vascularizados, el trasplante de dichos injertos puede usarse para el tratamiento de cualquiera de las diversas enfermedades hematológicas y/o genéticas, tales como § trastornos / deficiencias en factores de la coagulación tales como la hemofilia (Liu *et al.*, 1994. *Transpl Int*. 7: 201) y enfermedades de almacenamiento lisosómico / deficiencias enzimáticas tales como la enfermedad de Gaucher (Groth CG *et al.*, *Birth Defects Orig Artic Ser*. 9: 102 - 5).

- 45 Adicionalmente se apreciará que, al permitir la generación de tejidos estromales linfoides derivados del injerto bien diferenciados y vascularizados, puede usarse el trasplante de un injerto linfóide de la presente divulgación para permitir la diferenciación del injerto linfóide derivado del hospedador, y por lo tanto puede usarse para el tratamiento de una enfermedad del hospedador relacionada con un defecto en el estroma linfóide, tal como un defecto en el estroma linfóide que da como resultado una alteración en el crecimiento y/o en la diferenciación celular hematológica.

- 50 Al permitir la generación de injertos linfoides bien diferenciados y vascularizados, puede usarse el trasplante de un injerto linfóide de la presente divulgación para el tratamiento de cualquiera de los diversos trastornos relacionados con la inmunidad.

- 55 Según se usa en el presente documento, la frase "trastorno relacionado con la inmunidad" se refiere a cualquier enfermedad relacionada con una inmunodeficiencia, una respuesta inmunitaria patógena y/o una respuesta inmunitaria potencialmente terapéutica.

- 60 El experto habitual en la materia apreciará que, en virtud de la capacidad de los injertos linfoides de dar soporte al crecimiento y la diferenciación de las células efectoras inmunitarias, tales como los linfocitos B, los linfocitos T, los linfocitos T citotóxicos (NK), los granulocitos, los macrófagos, así como las células madre hematopoyéticas (HSC), un injerto linfóide de la presente divulgación, tal como un injerto esplénico de la presente divulgación, puede proporcionar una funcionalidad efectora inmunitaria, una inmunorregulación correctora y dar soporte a la diferenciación de diversas estirpes hematopoyéticas, y por lo tanto, puede usarse el trasplante de dicho injerto para el tratamiento de esencialmente cualquier trastorno relacionado con la inmunidad.

Algunos ejemplos de enfermedades por inmunodeficiencia que pueden ser tratadas mediante el trasplante de un injerto linfóide de la presente divulgación incluyen el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) causado por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), inmunodeficiencias combinadas graves (SCID), tales como deficiencia en la desaminasa de adenosina (ADA) y las inmunodeficiencias resultantes de una mieloablación /
 5 mieloablación terapéutica, tales como en el contexto del tratamiento de cánceres, tales como neoplasias hematológicas. Un injerto linfóide de la presente divulgación permitirá una reconstitución inmunitaria terapéutica de un sujeto inmunodeficiente en dichos contextos. El artesano experto habitual poseerá la pericia necesaria para el tratamiento de una enfermedad por inmunodeficiencia mediante el trasplante de un injerto de un órgano / tejido linfóide de la presente divulgación de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención y tendrá una amplia guía
 10 disponible para llevar a la práctica este aspecto del método de la presente divulgación en la bibliografía de la técnica (consúltese, por ejemplo: Fischer A. *et al.*, 1998. Springer Semin Immunopathol. 19: 479 - 92; Kane L. *et al.*, 2001. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 85: F110; Horwitz ME., 2000. Pediatr Clin North Am. 47: 1371; Friedrich W., 1996. Ann Med. 28: 115 - 9; Parkman R., 1993. Leukemia. 7: 1100 - 2). El artesano experto habitual apreciará que este aspecto del método de la presente invención servirá para el tratamiento de cualquiera de las diversas
 15 enfermedades infecciosas en un sujeto cuyo propio sistema inmunitario no crea unas respuestas inmunitarias protectoras adecuadas. Dichas enfermedades infecciosas incluyen las provocadas por patógenos microbianos, tales como virus, bacterias, micoplasmas, protozoos, hongos, y similares.

Algunos ejemplos de enfermedades relacionadas con una respuesta inmunitaria potencialmente terapéutica también incluyen las neoplasias. El artesano experto habitual poseerá la pericia necesaria para el tratamiento de una enfermedad hematológica y/o genética mediante el trasplante de un injerto de un órgano / tejido linfóide de la presente divulgación de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención y tendrá una amplia guía disponible
 20 para llevar a la práctica este aspecto del método de la presente invención en la bibliografía de la técnica (consúltese, por ejemplo: Tounouz M, Goldman M. *et al.*, 2001. Adv Nephrol Necker Hosp. 31: 257 - 72; Parkman R., 1993. Leukemia. 7: 1100 - 2; Porter DL., 2001. J Hematother Stem Cell Res. 10: 465 - 80).

Algunos ejemplos de enfermedades relacionadas con respuestas inmunitarias patógenas incluyen enfermedades autoinmunes. Al proporcionar el trasplante de células efectoras inmunitarias inmunorreguladoras de un injerto linfóide adecuado de la presente divulgación, tales como aquellas que incluyen los linfocitos T supresores
 30 adecuados, puede usarse para la supresión de respuestas inmunitarias patógenas. El artesano experto habitual poseerá la pericia necesaria para el tratamiento de una enfermedad relacionada con una respuesta inmunitaria patológica mediante el trasplante de un injerto de un órgano / tejido linfóide de la presente divulgación de acuerdo con las enseñanzas de la presente invención y tendrá una amplia guía disponible para llevar a la práctica este aspecto del método de la presente divulgación en la bibliografía de la técnica (consúltese, por ejemplo: Tounouz M,
 35 Goldman M. *et al.*, 2001. Adv Nephrol Necker Hosp. 31: 257 - 72; Moore J, Brooks P., 2001. 23: 193 - 213).

Después del trasplante, puede controlarse ventajosamente el crecimiento y/o la diferenciación del injerto y el efecto terapéutico del injerto.

Por ejemplo, según se describe en el Ejemplo de referencia 1 de la siguiente sección de Ejemplos, la funcionalidad de un injerto renal de la presente divulgación puede controlarse ventajosamente después del trasplante mediante un análisis de la producción de fluido por parte del injerto, en particular mediante el análisis de los metabolitos
 40 específicos de la orina o del contenido en subproductos en dicho fluido. Unas concentraciones supraplasmáticas de los subproductos específicos de la orina, tales como, por ejemplo, el nitrógeno ureico y la creatinina, son indicativos de la funcionalidad del injerto.

Según se describe en el Ejemplo de referencia 5 de la siguiente sección de Ejemplos, la funcionalidad de un injerto de islotes pancreáticos puede controlarse ventajosamente mediante el análisis de los niveles séricos de glucosa. La normalización de los niveles séricos de glucosa en el suero de un sujeto diabético después del trasplante de un
 50 injerto de un islote pancreático es indicativa de la funcionalidad del injerto (es decir, de la secreción de insulina regulada fisiológicamente por parte del injerto).

La funcionalidad de un injerto esplénico de la presente divulgación puede ser fácilmente controlada después del trasplante a través de numerosos ensayos que realiza habitualmente el artesano experto, incluyendo a través del
 55 análisis de las apropiadas proteínas específicas del metabolismo hepático en el suero del sujeto.

También puede controlarse convenientemente la funcionalidad de un injerto cardíaco de la presente divulgación después del trasplante a través de numerosos métodos llevados a la práctica por el artesano experto habitual, que incluyen un ecocardiograma, un electrocardiograma y el análisis de las proteínas específicas de la función cardíaca
 60 en el suero del sujeto, dependiendo de la aplicación y del fin.

Asimismo, la funcionalidad de un injerto linfóide de la presente divulgación puede controlarse de forma similar después del trasplante, dependiendo de la aplicación y del fin, a través de numerosos métodos llevados a la práctica por el artesano experto habitual de forma rutinaria, por ejemplo, mediante la recolección de células sanguíneas periféricas del sujeto y el análisis de las mismas con respecto a los apropiados tipos celulares mediante una
 65 clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), a través de los apropiados ensayos de estimulación de linfocitos con antígenos específicos y a través del ensayo de las apropiadas citocinas, quimiocinas, anticuerpos,

factores de coagulación, enzimas de almacenamiento lisosómico, y similares, en el suero del sujeto a través de un ELISA, o a través del ensayo de dichas moléculas en las células sanguíneas del sujeto a través de una FACS.

Después del trasplante puede controlarse ventajosamente la tolerancia inmunológica del sujeto al injerto, y/o el crecimiento y la diferenciación del injerto.

Pueden emplearse diversos métodos para la evaluación de la tolerancia inmunológica del sujeto al injerto.

Por ejemplo, la tolerancia puede ser evaluada mediante el control de la infiltración de leucocitos específicos del sujeto o de linfocitos específicos del injerto, mediante el control del origen de la vasculatura del injerto, y/o mediante el control del aspecto histológico de las estructuras específicas del órgano o del tejido. Dicho control puede llevarse a cabo ventajosamente según se describe en el Ejemplo de referencia 1 de la siguiente sección de Ejemplos. La infiltración en el injerto de los leucocitos, los neutrófilos, los linfocitos T citotóxicos o los linfocitos T del sujeto, o la ausencia de la misma, son normalmente indicativas de una incorporación subóptima u óptima del injerto en el sujeto, respectivamente.

En los casos en los que la tolerancia del sujeto al injerto sea subóptima, puede llevarse a cabo ventajosamente un tratamiento inmunosupresor coadyuvante terapéutico del sujeto, según se describió anteriormente en el presente documento.

Al llevar a la práctica la presente invención, inesperadamente se encontró que los órganos / tejidos en unas fases de diferenciación definidas correspondientes a una fase de gestación específica que no expresaban ni presentaban una molécula capaz de estimular o de potenciar una respuesta inmunitaria antes y/o después del trasplante de los mismos en un receptor, eran capaces de generar órganos / tejidos estructuralmente y funcionalmente diferenciados tolerados óptimamente por los linfocitos no singénicos cuando son trasplantados en un sujeto.

Por lo tanto, de acuerdo con un aspecto adicional de la presente divulgación se proporciona un método para la evaluación de la idoneidad de un órgano o de un tejido de mamífero en una fase de diferenciación correspondiente a una fase de gestación específica para el trasplante de un injerto del órgano o del tejido en un sujeto mamífero.

El método se lleva a cabo preferiblemente mediante la evaluación de un trasplante de prueba tomado a partir del órgano o del tejido para comprobar la expresión o la presentación de la molécula capaz de estimular o de potenciar una respuesta inmunitaria (en lo sucesivo "la molécula") en el sujeto antes y/o después del trasplante del trasplante de prueba en un receptor mamífero de prueba.

De acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación, un trasplante de prueba que no exprese ni presente sustancialmente la molécula antes y/o después del trasplante del trasplante de prueba en el receptor de prueba será óptimo para su trasplante. En general, cuanto menor sea el nivel de expresión o de presentación de la molécula en el trasplante de prueba, más adecuado será el injerto de órgano o de tejido para su trasplante. En particular, cuanto menor sea el nivel de expresión o de presentación de la molécula en el trasplante de prueba, más óptimamente será el injerto estructuralmente diferenciado, funcionalmente diferenciado y bien tolerado por los linfocitos no singénicos después del trasplante en el sujeto.

Se apreciará que dado que los trasplantes de prueba en las fases de diferenciación correspondientes a las diversas fases de gestación pueden ser ensayados para comprobar la expresión de la molécula, el método de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación permite la identificación de una fase de diferenciación óptima del órgano o del tejido para el trasplante de un injerto del mismo en el sujeto.

De acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación, el ensayo del trasplante de prueba para comprobar la presencia de la molécula se lleva a cabo preferiblemente antes del trasplante del trasplante de prueba en el receptor de prueba, y/o después de un periodo posterior al trasplante seleccionado de entre un intervalo de 1 segundo hasta 45 días, dependiendo del tipo de molécula ensayada, según se describe a continuación con más detalle.

El método de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación puede llevarse a la práctica mediante el uso de un receptor de prueba de cualquiera de las diversas especies de mamíferos, y/o que muestre cualquiera de las diversas características, dependiendo de la aplicación y del fin.

De acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación, el receptor de prueba es preferiblemente un roedor, y/o el sujeto.

Preferiblemente, el roedor es un ratón.

El uso de un ratón como receptor de prueba es muy ventajoso debido a que esta especie, por numerosas razones, es con mucho el mamífero experimental más conveniente, económico y eficaz disponible.

De acuerdo con las enseñanzas adicionales de la presente divulgación, el receptor de prueba es portador de linfocitos T humanos funcionales.

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

5 Según se describe y se ilustra con énfasis en el Ejemplo 1 de la siguiente sección de Ejemplos, el método puede llevarse a la práctica eficazmente mediante el trasplante de un trasplante de prueba humano en un receptor de prueba que porta linfocitos T humanos no singénicos con el órgano o el tejido.

10 Por lo tanto, el método puede utilizarse para la determinación de la fase de diferenciación o de gestación de un órgano o de un tejido humano óptimas para el trasplante de dicho órgano o tejido en un sujeto humano alogénico.

15 Por lo tanto, el método de evaluación de la fase de diferenciación de un injerto más adecuado para el trasplante de la presente divulgación es único y óptimo con respecto a todos los métodos de la técnica anterior, y puede usarse convenientemente para la identificación de la fase de diferenciación o de gestación de esencialmente cualquier tipo de órgano o de tejido óptimamente adecuada para el trasplante terapéutico de un injerto del mismo en un ser humano.

20 Aunque el método de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación puede llevarse a la práctica mediante el uso de un injerto derivado esencialmente de cualquier especie de mamífero, el órgano o el tejido es preferiblemente un órgano o un tejido porcino, más preferiblemente un órgano o un tejido humano.

25 De acuerdo con las enseñanzas de la presente divulgación, el método de acuerdo con este aspecto de la presente divulgación puede llevarse a cabo ventajosamente mediante el uso de un órgano o de un tejido humano en una fase específica de diferenciación seleccionada para que se corresponda con entre 5 y 16 semanas de gestación, más preferiblemente con entre 6 y 15 semanas de gestación, más preferiblemente con entre 7 y 14 semanas de gestación, más preferiblemente con entre 7 y 9 semanas de gestación y lo más preferiblemente con 8 semanas de gestación.

30 Según se describe y se ilustra en el Ejemplo de referencia 1 de la siguiente sección de Ejemplos, el método puede llevarse a la práctica eficazmente mediante el uso de un órgano o de un tejido humano en una fase de diferenciación correspondiente a 8 semanas de gestación.

35 Alternativamente, el método puede llevarse a cabo ventajosamente mediante el uso de un órgano o de un tejido porcino en una fase de diferenciación específica seleccionada para que se corresponda con entre 20 y 63 días de gestación, más preferiblemente con entre 20 y 56 días de gestación, más preferiblemente con entre 20 y 42 días de gestación, más preferiblemente con entre 20 y 35 días de gestación, más preferiblemente con entre 20 y 28 días de gestación, más preferiblemente con entre 24 y 28 días de gestación y lo más preferiblemente con entre 27 y 28 días de gestación.

40 El método de evaluación de la fase de diferenciación de un injerto adecuado para su trasplante de la presente divulgación puede llevarse a cabo ensayando el injerto de prueba para comprobar los diversos tipos de moléculas capaces de estimular o de potenciar una respuesta inmunitaria en el sujeto.

45 Algunos ejemplos de dichos tipos de moléculas incluyen citocinas, quimiocinas, mediadores inflamatorios, receptores de células inmunitarias, correceptores de células inmunitarias, moléculas del MHC, moléculas presentadoras del antígeno, moléculas de adhesión, mediadores de la inmunidad innata, mediadores de la apoptosis, metaloproteinasas, inmunomoduladores, correceptores de linfocitos y ligandos de correceptores de linfocitos.

50 Preferiblemente, un injerto adecuado para su trasplante no expresa ni presenta sustancialmente un correceptor de linfocitos ni un ligando de un correceptor de linfocitos.

55 Algunos ejemplos de dichos correceptores de linfocitos y ligandos de correceptores de linfocitos incluyen CD28, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), CD40, CD40L (ligando CD40, CD154), CD2, CD58 [antígeno asociado a la función linfocítica 3 (LFA-3)], molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y antígeno asociado a la función linfocítica 1 (LFA-1).

60 Preferiblemente, un injerto adecuado para su trasplante no expresa ni presenta sustancialmente B7-1, más preferiblemente CD40 o CD40L, más preferiblemente CD40 y CD40L y lo más preferiblemente B7-1, CD40 y CD40L.

Como se ha mencionado anteriormente en el presente documento, el ensayo del trasplante de prueba para comprobar la presencia de la molécula se lleva a cabo preferiblemente antes del trasplante del trasplante de prueba en el receptor de prueba, y/o después de un periodo posterior al trasplante seleccionado de entre un intervalo de 1 segundo hasta 45 días, dependiendo del tipo de molécula ensayada.

65

Preferiblemente, el ensayo del trasplante de prueba para comprobar la presencia de CD40 o de CD40L se lleva a cabo tanto antes como después del trasplante del trasplante de prueba en el receptor de prueba.

5 Preferiblemente, el ensayo del trasplante de prueba para comprobar la presencia de CD40 después del trasplante del trasplante de prueba en el receptor de prueba se lleva a cabo después de un periodo posterior al trasplante de prueba seleccionado de un intervalo de entre 1 segundo y 45 días, más preferiblemente de entre 11 días y 45 días, más preferiblemente de entre 11 días y 42 días, más preferiblemente de entre 11 días y 31 días y lo más preferiblemente de entre 14 días y 28 días.

10 Preferiblemente, el ensayo del trasplante de prueba para comprobar la presencia de CD40L después del trasplante del trasplante de prueba en el receptor de prueba se lleva a cabo después de un periodo posterior al trasplante de prueba seleccionado de un intervalo de: entre 1 segundo y 45 días; más preferiblemente entre 11 días y 45 días; más preferiblemente entre 14 días y 45 días; más preferiblemente entre 14 días y 31 días; más preferiblemente entre 17 días y 31 días o entre 14 días y 28 días; más preferiblemente entre 25 días y 31 días; más preferiblemente entre 27 días y 29 días; más preferiblemente entre 27,5 días y 28,5 días; y lo más preferiblemente de 28 días.

Preferiblemente, el ensayo del trasplante de prueba para comprobar la presencia de B7-1 se lleva a cabo antes del trasplante del trasplante de prueba.

20 Según se describe y se muestra en el Ejemplo de referencia 1 de la siguiente sección de Ejemplos, los injertos que no expresan sustancialmente B7-1, CD40 y CD40L en los respectivos periodos de trasplante de prueba óptimos previos al trasplante / después del trasplante establecidos anteriormente en el presente documento, son adecuados para su trasplante. En particular, dichos injertos pueden generar órganos / tejidos estructuralmente y funcionalmente diferenciados tolerados óptimamente por los linfocitos humanos no singénicos / alorreactivos.

25 Sin estar ceñidos a ningún paradigma, los presentes inventores son de la opinión de que un injerto que no expresa ni presenta sustancialmente dichas moléculas, que son los principales moléculas específicas celulares presentadoras del antígeno, es tolerado óptimamente por un sujeto alogénico o xenogénico al menos parcialmente como resultado de que dichos injertos carecen sustancialmente de las células presentadoras del antígeno que se han propuesto en la materia como críticas para la activación del rechazo del injerto.

30 Pueden usarse numerosos métodos, bien conocidos por el artesano experto habitual, para analizar un órgano, un tejido o células, tales como el injerto de prueba o una porción del mismo, para comprobar la expresión o la presentación de una molécula específica.

35 En los casos en los que la molécula es una proteína o una molécula de ARN, la expresión o la presentación de la molécula se evalúa preferiblemente mediante el análisis de las células o de los tejidos para comprobar la presencia del ARNm que codifica para la molécula proteica o para comprobar la presencia de la molécula de ARN, respectivamente.

40 El análisis de una molécula de ARNm o de ARN en células o en tejidos se lleva a cabo preferiblemente a través de un análisis mediante una RT-PCR. El análisis mediante una RT-PCR puede llevarse a cabo ventajosamente según se describe y se ilustra en el Ejemplo 1 de la siguiente sección de Ejemplos. Alternativamente, el análisis de la presencia de una molécula de ARNm o de ARN en células puede llevarse a cabo mediante modificaciones del protocolo de RT-PCR descrito en el Ejemplo de referencia 1 de la siguiente sección de Ejemplos (por ejemplo, mediante el uso de una PCR con cebadores internos, de una RT-PCR competitiva, etc.), mediante una inmunotransferencia Northern o mediante un análisis en micromatriz.

45 Alternativamente, la expresión o la presentación de la molécula proteica pueden ser detectadas directamente mediante la detección directa de la molécula proteica mediante el uso de diversas técnicas bioquímicas.

50 Los diversos métodos para la detección de la expresión o de la presentación de una proteína específica en un órgano, en un tejido o en células son bien conocidos por los expertos habituales en la materia. Dichos métodos incluyen citometría de flujo de inmunofluorescencia, análisis por inmunotransferencia Western, hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH), ensayo de inmuoadsorción enzimática (ELISA), hibridación en micromatriz, microscopía confocal de inmunofluorescencia, y similares.

55 En los casos en los que la molécula es una proteína, se ensaya la expresión o la presentación tanto de la molécula como del ARNm que codifica para la molécula.

60 En los casos en los que la molécula es una proteína, un injerto óptimo es aquel que no expresa sustancialmente la molécula, más preferiblemente el ARNm que codifica para la molécula, o lo más preferiblemente ni la molécula ni el ARNm que codifica para la molécula.

65 De acuerdo con las enseñanzas de la presente invención, la evaluación de la idoneidad del injerto para su trasplante puede comprender ventajosamente el análisis de los injertos para comprobar la expresión o la presentación de unos

niveles sustancialmente menores que en los injertos de órganos / tejidos en fase adulta de las moléculas relacionadas con la inmunidad recogidas en la Tabla 3 de la siguiente sección de Ejemplos y en la World Wide Web / Internet (<http://www.weizmann.ac.il/immunology/reisner/immunogenicity.xls>).

Según se describe y se ilustra en el Ejemplo de referencia 1 de la siguiente sección de Ejemplos, los injertos que expresan sustancialmente unos niveles menores de dichas moléculas relacionadas con la inmunidad que los injertos de órganos / tejidos en fase adulta, son más adecuados para su trasplante que estos últimos. Un injerto que exprese o que muestre unos niveles sustancialmente menores que los injertos de órganos / tejidos en fase adulta de injertos de tipo órgano o tejido con el mayor número posible de dichas moléculas relacionadas con la inmunidad, puede ser óptimamente adecuado para su trasplante.

Preferiblemente, el análisis de la expresión o de la presentación de dichas moléculas relacionadas con la inmunidad en el injerto se lleva a cabo mediante un análisis por hibridación en micromatriz del ARNm derivado del injerto, preferiblemente según se describe y se ilustra en el Ejemplo 1 de la siguiente sección de Ejemplos.

Alternativamente, el análisis de la expresión o de la presentación de dichas moléculas relacionadas con la inmunidad en el injerto puede llevarse a cabo mediante el uso de cualquiera de las técnicas analíticas descritas anteriormente en el presente documento para el análisis del injerto para comprobar la expresión o la presentación de la molécula capaz de estimular o de potenciar una respuesta inmunitaria en el sujeto.

Por lo tanto, la presente divulgación puede usarse para tratar óptimamente trastornos mediante el uso del trasplante de injertos derivados de un órgano o de un tejido no singénico o en desarrollo, y para la identificación de injertos de órganos o de tejidos óptimamente adecuados para llevar a la práctica un trasplante terapéutico.

El método de trasplante terapéutico de la presente divulgación es único y drásticamente superior con respecto a todo los demás métodos de la técnica anterior, dado que permite por primera vez un tratamiento óptimo generalizado de un amplio abanico de trastornos susceptibles de trasplante terapéutico en seres humanos mediante el trasplante de un aloinjerto y/o de un xenoinjerto sin una inmunosupresión o con una in supresión mínima del receptor del injerto, mediante el uso de injertos xenogénicos o alogénicos en desarrollo que tienen, respectivamente, esencialmente un suministro ilimitado o son de esencialmente cualquier origen alogénico.

Se espera que durante la vida de este paciente se desarrollen muchas técnicas diagnósticas médicas relevantes, y que el ámbito de la frase "método de evaluación de la fase de diferenciación de un órgano de un mamífero más adecuado para el trasplante del mismo en un sujeto mamífero" pretenda *a priori* incluir todas dichas nuevas tecnologías.

Los objetos, ventajas y nuevas características adicionales de la presente invención serán evidentes para el experto habitual en la materia tras el análisis de los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes. Adicionalmente, cada una de las diversas formas de realización y aspectos de la presente invención según se han descrito anteriormente en el presente documento y se reivindican en la sección de reivindicaciones que siguen, hallan apoyo experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos de referencia

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de una forma no limitante.

Generalmente, la nomenclatura usada 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 en profundidad 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); las metodologías según se establecen en las Patentes de EE.UU. nº 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volúmenes I - III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volúmenes I - III Coligan J. E., ed. (1994); Stites *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 and Co., Nueva York (1980); los inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía patente y científica, véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. nº 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D. y Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) y "Methods in Enzymology" Vol. 1 - 317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And

Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak *et al.*, "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). A lo largo de este documento se proporcionan otras referencias generales. Se cree que los procedimientos de las mismas son bien conocidos en la materia, y se proporcionan por conveniencia para el lector.

EJEMPLO DE REFERENCIA 1

El trasplante de órganos / tejidos renales humanos o porcinos en una fase de gestación temprana genera órganos / tejidos renales estructuralmente y funcionalmente diferenciados tolerados por los linfocitos humanos alorreactivos / xenorreactivos

Las enfermedades de órganos / tejidos para las que el trasplante de un órgano / tejido de un donante alogénico sigue siendo la opción terapéutica óptima, tales como las enfermedades renales, son muy debilitantes y están relacionadas con unas significativas tasas de mortalidad. Sin embargo, el trasplante de un órgano / tejido alogénico de donante a menudo es imposible de implementar debido a la dificultad para encontrar un donante de un órgano / tejido haplocompatible. Además, incluso cuando se encuentra un donante compatible, con objeto de prevenir rechazo del injerto, dicho trasplante requiere la inmunosupresión permanente del receptor del injerto, habitualmente a través de la administración de fármacos inmunosupresores tóxicos, tales como la ciclosporina A. Dichos tratamientos inmunosupresores contribuyen a los inconvenientes del trasplante alogénico, dado que a menudo estos no tienen éxito en la prevención del rechazo del injerto a corto plazo, y habitualmente son incapaces de prevenir de forma indefinida el rechazo del injerto. Una alternativa al trasplante de un aloinjerto implica el trasplante de xenoinjertos, en particular de injertos porcinos, que se consideran la alternativa animal óptima a los injertos humanos. Sin embargo, los xenoinjertos generalmente no pueden ser usados para el trasplante debido a la muy alta subóptima tolerancia de dichos injertos por parte de los linfocitos humanos. Por lo tanto, son muy deseados los órganos / tejidos adecuados para un trasplante terapéutico no singénico en seres humanos y tolerados por los linfocitos humanos, y las fuentes adecuadas de dichos órganos / tejidos. Una estrategia propuesta para proporcionar dichos órganos / tejidos implica el uso de injertos en unas fases de desarrollo tempranas, dado que se ha demostrado que cuanto más temprana sea la fase de desarrollo de un órgano / tejido, mejor tolerado será cuando se trasplante en un hospedador no singénico. Sin embargo, hasta la fecha no se ha conseguido un crecimiento y una diferenciación satisfactorios de injertos de un órgano / tejido en desarrollo o no singénico ni una tolerancia inmunológica satisfactoria de dichos injertos por parte de los linfocitos humanos en ausencia de teratomas derivados del injerto.

En la concepción de la presente invención se formuló la hipótesis de que existe una fase de desarrollo durante la cual los órganos / tejidos están lo suficientemente diferenciados como para ser comprometidos en el desarrollo específico de un órgano / tejido en ausencia de teratomas derivados del injerto, estando todavía lo suficientemente indiferenciados como para que sean tolerados óptimamente cuando son trasplantados en un hospedador no singénico. Al llevar a la práctica la presente invención, se descubrió inesperadamente la existencia de unas fases de gestación específicas durante las cuales los órganos / tejidos humanos o porcinos pueden ser trasplantados en un hospedador de forma que generen, en ausencia de teratomas derivados del injerto, órganos / tejidos derivados del injerto estructuralmente y funcionalmente diferenciados que son tolerados óptimamente por los linfocitos humanos alorreactivos / xenorreactivos del hospedador. En particular, se descubrió inesperadamente la existencia de unas fases de gestación específicas durante las cuales los órganos / tejidos renales humanos o porcinos pueden ser trasplantados en un receptor de forma que generen, en ausencia de teratomas derivados del injerto, órganos renales óptimamente diferenciados estructuralmente y funcionalmente que son tolerados óptimamente por los linfocitos humanos alorreactivos / xenorreactivos del receptor, como se describe a continuación y/o como se ha descrito previamente (Dekel B. *et al.*, 2002. Nature Medicine).

Materiales y Métodos:

Preparación de hospedadores murinos para el trasplante: se usaron ratones Balb/c de tres meses de edad (Harlan Olac, Shaw's Farm, Blackthorn, Bicester, Oxon., Reino Unido) como hospedadores para los estudios de trasplantes. Para la generación de receptores inmunodeficientes, los ratones Balb/c fueron mortalmente irradiados mediante dosis divididas de una irradiación corporal total (TBI; 3,5 Gy seguida 3 días después por 9,5 Gy) con una fuente de rayos gama de 150-A (60)Co (producida por la Atomic Energy Commission of Canada, Kanata, Ontario) con una distancia focal de la piel de 75 centímetros y una tasa de dosis de 0,7 Gy/minuto, según se ha descrito previamente (Lubin 1. *et al.*, 1994. Blood 83, 2368; Reisner, Y. y Dagan, S., 1998. Trends Biotechnol. 16, 242 - 246; Segall, H. *et al.*, 1996. Blood 88, 721 - 730). Las células de médula ósea de los ratones NOD / SCID (Weizmann Institute Animal Breeding Center, Rehovot, Israel) fueron extraídas de la diáfisis del fémur y la tibia de ratones de 4 - 8 semanas de edad, según se ha descrito previamente (Levite M. *et al.*, 1995. Cell Immunol. 162, 138). Los ratones receptores Balb/c fueron reconstituidos inmunológicamente con 3×10^6 células de médula ósea de los ratones NOD / SCID administradas por vía intravenosa en 1 mililitro de solución salina de tampón de fosfato un día después de la segunda fracción de la irradiación corporal total (TBI), según se ha descrito previamente (Reisner, Y. y Dagan, S., 1998. Trends Biotechnol. 16, 242 - 246; Segall, H. *et al.*, 1996. Blood 88, 721 - 730). Se ha demostrado que los animales de tipo ratón SCID (inmunodeficiencia combinada grave) resultantes permiten una excelente incorporación de células hematopoyéticas o de tejidos sólidos humanos viables (Marcus H. *et al.*, 1995. Blood 86, 398; Segall H. *et*

al., 1996. Blood 88, 88; Reisner Y. y Dagan S., 1998. Trends Biotechnol. 16, 242; Bocher WO. *et al.*, 2001. Eur J Immunol. 31,2071). Los ratones donantes NOD / SCID se obtuvieron en el Weizmann Institute Animal Breeding Center, Rehovot, Israel y los experimentos con los animales se llevaron a cabo de acuerdo con el National Institutes of Health Guide for Care and Use of Experimental Animals y fueron aprobados por el Weizmann Institute of Science Animal Care Committee.

Extracción del tejido renal en desarrollo: los tejidos renales humanos en desarrollo se obtuvieron mediante un raspado con la aprobación de un comité de Helsinki y los tejidos renales en desarrollo fueron diseccionados quirúrgicamente a partir de embriones bajo un estereoscopio de disección según se ha descrito previamente (Rogers S. *et al.*, 1998. Kidney Int. 54, 27). Las muestras de riñones adultos se obtuvieron a partir de riñones normales extraídos a partir de un carcinoma de células claras en fase I. Los tejidos renales porcinos en fase de gestación y adultos se obtuvieron con la ayuda del Lahav Institute for Animal Research, Kibbutz Lahav. Los tejidos renales porcinos en fase de gestación se aislaron a partir de animales mediante el uso de las técnicas descritas previamente (Rogers S. *et al.*, 1998. Kidney Int. 54, 27). Todas las muestras destinadas a un análisis de la expresión génica fueron ultracongeladas en nitrógeno líquido. Los tejidos para el trasplante se mantuvieron en unas condiciones estériles a 4 °C (durante aproximadamente 2 horas) bien en RPMI 1640 o bien en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero bovino fetal al 10 % (Biological Industries, Beit HaEmek, Israel).

Trasplante del tejido renal en desarrollo: el trasplante del tejido renal bajo la cápsula renal de los ratones receptores se llevó a cabo según se ha descrito previamente (Dekel, B. *et al.*, 1997. Transplantation 64, 1541 - 1550). En los trasplantes se usaron precursores renales humanos completos (de hasta 8 semanas de gestación) o porcinos (de hasta 4 semanas de gestación), o tejidos renales completos o fragmentos de 1 - 2 mm de diámetro en las fases de gestación tardías. El trasplante se llevó a cabo 7 - 10 días después de la reconstitución de los hospedadores irradiados con la médula ósea de los NOD / SCID. Para los ensayos de crecimiento, los tejidos renales fueron trasplantados en ratones receptores SCID. Para el trasplante, los tejidos renales se mantuvieron en unas condiciones estériles a 4 °C durante aproximadamente dos horas bien en RPMI 1640 o bien en medio de Medio de Eagle modificado por Dulbecco complementado con suero bovino fetal al 10 % (FCS; Biological Industries, Beit Haemek, Israel). El trasplante de los tejidos renales se llevó a cabo bajo anestesia general inducida mediante la inyección intraperitoneal de un 2,5 % de Avertin en solución salina de tampón de fosfato (10 mililitros por kilogramo de peso corporal). Ambos riñones del hospedador fueron expuestos a través de una incisión bilateral, se realizó una incisión de 1,5 mm 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 renales también fueron trasplantados intraabdominalmente para controlar el favorecimiento inmunitario específico del espacio subcapsular renal. En algunos experimentos los tejidos renales fueron implantados y suturados (sutura de 5-0) en la almohadilla grasa testicular junto con una nefrectomía izquierda. Los ratones trasplantados fueron tratados postoperatoriamente con ciprofloxacino en su agua de bebida durante 7 días.

Administración a los ratones de las PBMC humanas: entre uno y tres días después del trasplante del tejido renal, como se ha descrito anteriormente, se inyectaron intraperitonealmente 10⁶ PBMC humanas en los ratones hospedadores. Los ratones de control no recibieron BMC humanas. La generación de las PBMC humanas, su infusión en los ratones receptores y el análisis de la incorporación de las células infundidas se llevaron a cabo según se ha descrito previamente (Segall, H. *et al.*, 1996. Blood 88, 721 - 730). Los PBMC humanas fueron generados a partir de las capas linfocitarias obtenidas de voluntarios normales, como sigue. Las muestras sanguíneas se colocaron en un cojín de solución de Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Noruega) y se centrifugaron a 2.000 rpm durante 20 minutos. La capa interfacial se recogió y se lavó dos veces y las células se contaron y se resuspendieron en solución salina con tampón de fosfato (a pH 7,4) a la concentración deseada. Para el análisis de la incorporación de los linfocitos humanos, se recuperaron las células a partir del peritoneo entre 10 y 14 días después de la infusión de las PBMC. Se incubaron suspensiones de células individuales durante 30 minutos en hielo con anticuerpos anti-CD3-PE y CD45-PerCP humanos marcados (antígeno leucocitario panhumano) (Becton-Dickinson, Mountain View, CA). Después de lavar se llevaron a cabo análisis fluorescentes de dos o tres colores de estos antígenos humanos mediante el uso de un analizador FACScan (Becton-Dickinson). Se recogieron los datos de los linfocitos clasificados selectivamente por sus características de dispersión hacia delante y lateral estándar.

En algunos experimentos se administraron infusiones dobles de PBMC de diferentes donantes humanos en los ratones receptores del injerto.

Análisis de la infiltración, el crecimiento y la diferenciación del injerto: la infiltración de las células inmunitarias humanas, así como el crecimiento y el desarrollo de los injertos derivados de tejido renal en los glomérulos y los túbulos maduros, fueron controlados después del trasplante como sigue. Los receptores del injerto fueron sacrificados 4 - 10 semanas después del trasplante, según se indica. Los riñones del receptor y sus cápsulas se extrajeron después y se fijaron en parafina al 10 %. Los trasplantes se seccionaron y se montaron en portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina y las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E). Para la determinación del crecimiento de los injertos desde el momento del trasplante hasta el momento de la extracción, se midió el tamaño del injerto antes del trasplante y en el momento de la extracción (después del trasplante) y se calcularon las proporciones de tamaño del injerto entre antes del trasplante y después del trasplante. El tamaño del injerto fue determinado de acuerdo con la fórmula *tamaño del injerto* = $L \times W$, en la que L y W representan los ejes mayor y

menor del injerto, respectivamente. La evaluación del desarrollo del injerto se llevó a cabo mediante el recuento del número de glomérulos y de túbulos maduros en 10 campos microscópicos consecutivos (ampliación x 40) por trasplante en 3 trasplantes por grupo. La determinación de la infiltración de los linfocitos T humanos en las secciones del injerto se determinó según se ha descrito previamente (Naveh MT. *et al.*, 1992. J Clin Invest. 90, 2434). En resumen, las secciones de los injertos se inmunotifieron con anticuerpo de conejo anti CD3 humano (Zymed, San Francisco, CA; pan T-cell), según se ha descrito previamente (Dekel, B. *et al.*, 1999. Int. Immunol. 11, 1673 - 1683) y se contó el número de células CD3 positivas humanas en 10 campos microscópicos consecutivos (ampliación de x 100) por trasplante en 3 trasplantes por grupo. Los bloques del tejido en parafina de los trasplantes se cortaron a 4 - 6 µm de grosor, se desparafinizaron con xileno, se rehidrataron y se colocaron durante 15 min en etanol que contenía un 3 % de H₂O₂ para bloquear la peroxidasa endógena. Los portaobjetos se lavaron minuciosamente con agua del grifo y se transfirieron a PBS. Después, las secciones se trataron con albúmina sérica bovina al 1 % para impedir la tinción de fondo y se incubaron durante 1 hora con anticuerpo anti CD3 a la temperatura ambiente en una cámara humidificadora. Los portaobjetos se aclararon con solución salina de tampón de fosfato durante 3 minutos y se incubaron con un anticuerpo anti ratón biotinilado durante 30 minutos, y después se incubaron con estreptavidina conjugada con peroxidasa (StrAvidin; Biogenex, San Ramon, CA) durante 30 minutos. Después de aclarar, se visualizó el marcador de peroxidasa mediante una incubación durante 15 minutos y se contratiñó con hematoxilina de Mayer mediante el uso de un kit de tinción inmunohistoquímica (Biomeda, Foster City, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El reactivo 3-amino-9-etilcarbazol produjo un producto de color rojo que es soluble en alcohol y que puede usarse con un medio de montaje acuoso (gelatina en glicerol de Kaiser). Se realizó un control negativo para la tinción de los linfocitos T siguiendo todas las etapas mencionadas anteriormente pero omitiendo la adición del anticuerpo primario. Se encontró que la tinción era uniformemente negativa en los trasplantes de los ratones de control no infundidos con PBMC humanas.

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

Recolección y análisis de la orina: el fluido producido por los quistes derivados del injerto de tejido renal en fase de gestación temprana se recogió y se analizó para comprobar el contenido en marcadores urinarios, como sigue. Los trasplantes en desarrollo humanos y porcinos fueron escindidos quirúrgicamente de los ratones anestesiados a través de una incisión media o en el flanco izquierdo y se insertó un microcatéter de plástico en un área identificable de concentración del fluido. En el sitio de la inserción, las paredes del injerto se suturaron alrededor del catéter mediante el uso de una sutura de nailon de 5-0 y el fluido del injerto se recogió a través del microcatéter en tubos de PCR de pequeño volumen suturados en la piel de los ratones. El fluido drenado fue posteriormente analizado para comprobar las concentraciones de nitrógeno ureico y de creatinina.

Análisis mediante una RT-PCR de la expresión de la molécula coestimulante en los injertos: de entre las múltiples rutas coestimulantes identificadas, cada vez más pruebas sugieren que la interacción de los ligandos de los receptores coestimulantes de los linfocitos T CD28 y CD40 (CD40L, CD154) con sus respectivos ligandos B7-1/-2 y CD40 expresados en las células presentadoras del antígeno son críticos para las respuestas de los linfocitos T a los aloantígenos (Sayegh MH. y Turka LA., 1998. N Engl J Med. 338, 1813). Por lo tanto, se llevaron a cabo experimentos para ensayar si las células inmunitarias humanas alorreactivas no rechazaban los injertos derivados de tejido renal humano alogénico en una fase de gestación de entre 7 y 8 semanas como resultado de la expresión regulada por disminución por parte de dichos tejidos de las moléculas coestimulantes B7-1, B7-2, CD40, CD40L y HLA-DR, como sigue. Se analizó el ARN mensajero de injertos derivados de tejido renal en una fase de gestación de 8, 14 y 22 semanas a través de una RT-PCR en los siguientes puntos temporales: (i) antes del trasplante; (ii) inmediatamente después del trasplante pero antes de la infusión de las PBMC humanas alorreactivas; y (iii) 2, 4 y 6 semanas después de la reconstitución de los ratones con las PBMC humanas, como sigue. Los injertos se diseccionaron cuidadosamente del sitio de implantación subcapsular y se aisló el ARN total a partir de los injertos diseccionados, según se ha descrito previamente (Dekel, B. *et al.*, 1999. Int. Immunol. 11, 1673 - 1683). En resumen, los tejidos del injerto renal fueron homogeneizados con un homogeneizadora tisular de vidrio-Teflon en Tri-reactivo (Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH) para el aislamiento del ARN total, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN aislado se secó al aire, se resuspendió en agua exenta de nucleasa y se cuantificó mediante una espectrofotometría. Se retrotranscribieron alícuotas de 1 microgramo de la preparación de ARN total en ADNc con transcriptasa inversa AMV mediante el uso de un kit Access RT-PCR (Promega Corp., Madison, Wisconsin), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las secuencias específicas de las moléculas coestimulantes y del gen constitutivo de la β-actina de control (Pratt, J.R. *et al.*, 2002. Nature Med. 8, 582-587) fueron amplificadas posteriormente mediante una PCR a partir del ADNc sintetizado, como sigue. En resumen, el producto de ADNc de la transcripción inversa se diluyó a 1:50, a 1:100 y a 1:500 en agua estéril y se llevó a cabo una amplificación mediante una PCR mediante el uso de polimerasa de ADN Tfl termoestable en una mezcla de reacción de 50 microlitros que contenía 40 micromolar de cada dNTP, 0,4 micromolar de cada cebador (Tabla 1), 10 milimolar de Tris HCl (a pH 8,3) y 1,5 milimolar de MgCl₂. Cada muestra se ensayó al menos tres veces, y las muestras de tejido comparadas se amplificaron mediante una PCR en paralelo mediante el uso de una única mezcla maestra de reactivos. Con objeto de minimizar la amplificación no específica de secuencias no objetivo, se

estableció una elevada temperatura de hibridación de la PCR (64 °C), y, con objeto de detectar las señales de la PCR en la fase lineal de amplificación del producto, la reacción de la PCR se llevó a cabo con 20 - 35 ciclos térmicos. En todos los experimentos se descartó la posibilidad de amplificación de ADN contaminante a través de reacciones de control mediante el uso de reacciones de transcripción inversa en las que se omitía la transcriptasa inversa o el ADNc de molde. Los productos de la reacción de PCR se separaron electroforéticamente en geles de agarosa al 1,5 %, los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron mediante el uso de un diafanoscopio UV, según se ha descrito previamente (Sharma VK. *et al.*, 1996. Transplantation 62, 1860).

Trasplante de injertos de tejido renal xenogénico en fase de gestación temprana en ratones inmunocompetentes normales junto con un leve bloqueo de la coestimulación de corta duración: para ensayar la inmunogenicidad de los injertos de tejido renal xenogénico en una fase de gestación temprana en un mamífero normal inmunocompetente, se trasplantaron ratones Balb/c inmunocompetentes con injertos de tejido renal porcino en una fase de gestación de entre 27 y 28 días, como se ha descrito anteriormente para el trasplante de injertos en ratones reconstituidos inunitariamente, y se sometieron a un leve bloqueo de la coestimulación mediante una inyección intraperitoneal de 250 microgramos de CTLA4-Ig (proporcionada amablemente por Steffen Jung, Hadassa Medical School, Jerusalén, Israel) cada 48 horas durante 2 semanas. La CTLA4-Ig es una proteína de fusión que comprende la porción extracelular del CTLA-4 de ratón fusionada con la región constante de la IgG humana, que bloquea la interacción coestimulante del receptor coestimulante CD28 de los linfocitos T con sus ligandos coestimulantes de las células presentadoras del antígeno B7-1 y -2. A los ratones de control se les inyectó solución salina tamponada con fosfato o una inmunoglobulina de control.

Tabla 1. Cebadores oligonucleotídicos usados para la amplificación mediante una PCR del ADNc preparado a partir de tejidos renales humanos en desarrollo.

Secuencias amplificadas	Cebadores oligonucleotídicos * (sentido / antisentido)	Longitud del producto de la PCR (pb)
B7-1	5'-GACCAAGGAAGTGAAGTGGC-3' (ID. SEC. Nº: 1) / 5'-AGGAGAGGTGAGGCTCTGGAAAAC-3' (ID. SEC. Nº: 2)	410
B7-2	5'-CACTATGGGACTGAGTAACATTC-3' (ID. SEC. Nº: 3) / 5'-GCACTGACAGTTCAGAATTCATC-3' (ID. SEC. Nº: 4)	383
CD40	5'-CTCTGCAGTGCCTCTGGGG-3' (ID. SEC. Nº: 5) / 5'-GATGGTATCAGAAACCCCTGTAGC-3' (ID. SEC. Nº: 6)	410
CD40L	5'-TATCACCCAGATGATTGGGTCAGC-3' (ID. SEC. Nº: 7) / 5'-CCAGGGTTACCAAGTTGTTGCTCA-3' (ID. SEC. Nº: 8)	349
HLA-DR	5'-ATGAAGGTCTCCGCGGCAGCCC-3' (ID. SEC. Nº: 9) / 5'-CTAGCTCATCTCCAAAGAGTTG-3' (ID. SEC. Nº: 10)	215
β -actina	5'-ACCATCAAGCTCTGCGTGAAGT-3' (ID. SEC. Nº: 11) / 5'-GCAGGTCAGTTCAGTCCAGGTC-3' (ID. SEC. Nº: 12)	310

Las búsquedas de homología para todas las secuencias de cebadores se llevaron a cabo mediante el uso de la base de datos del GenBank del NCBI para asegurar la no especificidad de los cebadores para los genes de ratón.

Análisis estadístico: las comparaciones entre los grupos fueron evaluadas mediante la prueba de la *t* de Student. Los datos se expresaron como la media $\pm$ e.t.m. y fueron considerados estadísticamente significativos si los valores de *P* eran de 0,05 o menos.

Análisis en micromatriz: se llevó a cabo la preparación del ARNc marcado y la hibridación en una matriz Genechip Human Genome HU95A (Affymetrix) según recomienda el fabricante de la micromatriz. El análisis de los datos del Genechip se llevó a cabo según se ha descrito previamente (Zuo, F. *et al.*, 2002. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 99, 6292 - 6297; Kaminski, N. *et al.*, 2000. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 97, 1778 - 1783). Para el análisis agrupado se usaron los programas CLUSTER, GENE CLUSTER y TREEVIEW (Eisen, M.B. *et al.*, 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 95, 14863 - 14868) y el paquete informático SCOREGENE (<http://FGUSheba.cs.huji.ac.il/>). Se calcularon los factores de incremento para cada muestra frente a la media geométrica de todas las muestras. Se ha publicado una descripción detallada de los métodos de puntuación y de la metodología usada para el análisis de los datos de la micromatriz (Kaminski N. y Friedman N., 2002. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 27, 125 - 132).

Resultados experimentales:

La edad gestacional determina el crecimiento y la diferenciación: se llevó a cabo un experimento inicial para determinar la viabilidad de los trasplantes de tejido renal humano adulto en ratones inmunodeficientes. A las 8 semanas después del trasplante se encontró que todos los trasplantes adultos (5/5) estaban escleróticos y no eran viables. Para evaluar la influencia de la fase de desarrollo sobre el potencial de crecimiento y de diferenciación, se trasplantaron tejidos renales humanos en una fase de gestación de entre 7 y 14 semanas en ratones inmunodeficientes (Tabla 2). Globalmente, sobrevivió más del 80 % de los injertos renales humanos de donantes de

todas las edades, y todos los injertos recuperados habían aumentado su tamaño, sin ningún signo de neoplasia en ninguno de los injertos recuperados.

Tabla 2. Trasplante de órganos / tejidos renales humanos o porcinos en fase de gestación en receptores portadores de leucocitos humanos no singénicos

Origen del injerto	Fase de gestación del injerto	Nº de injertos	Tipo de injerto	Crecimiento del injerto *	Diferenciación renal del injerto **	Diferenciación no renal del injerto	Necrosis
Humano	14 semanas	3	completo	3 / 3	ninguna	ninguna	3 / 3
	14 semanas	8	fragmentos	7 / 8	7 / 7	ninguna	ninguna
	10 semanas	2	completo	2 / 2	ninguna	ninguna	2 / 2
	10 semanas	6	fragmentos	6 / 6	6 / 6	ninguna	ninguna
	8 semanas	5	completo	5 / 5	5 / 5	ninguna	ninguna
	7 semanas	3	completo	3 / 3	3 / 3	ninguna	ninguna
Porcino	8 semanas	7	completo	5 / 7	ninguna	ninguna	5 / 5
	8 semanas	6	fragmentos	6 / 6	6 / 6	ninguna	ninguna
	6 semanas	5	completo	4 / 5	ninguna	ninguna	4 / 4
	6 semanas	6	fragmentos	6 / 6	6 / 6	ninguna	ninguna
	entre 27 y 28 días	12	completo	12 / 12	12 / 12	ninguna	ninguna
	entre 24 y 25 días	9	completo	8 / 9	5 / 8	3/8	ninguna
	entre 20 y 21 días	9	completo	6 / 9	3 / 6	3/6	ninguna
* El crecimiento y la diferenciación del trasplante fueron evaluados a las 8 semanas después del trasplante.							
** La diferenciación se clasificó como renal (sólo nefronas), no renal (derivados diferenciados distintos a los renales) y necrosis (además de las nefronas, aparición de áreas necróticas fundamentalmente en el centro del trasplante).							

Los resultados fueron notablemente diferentes cuando se compararon los injertos renales humanos en una fase de gestación de entre 7 y 8 semanas con injertos renales humanos en una fase de gestación tardía. A las 8 semanas después del trasplante, los injertos derivados de tejido renal en una fase de gestación de entre 7 y 8 semanas (n = 8) habían experimentado un notable crecimiento (la proporción de tamaño del trasplante era de $20,1 \pm 2,7$). Se observó una nefrogénesis completa [$5,5 \pm 0,8$ glomérulos y $19,3 \pm 2,7$ túbulos por campo (ampliación de $\times 40$)] en los trasplantes derivados de estos injertos, que originalmente contenían principalmente células madre mesenquimatosas metarrenales y primordios uretrales, pero ningún glomérulo. La morfología macroscópica y el aspecto histológico de dicho injerto derivado de tejido renal humano en una fase de gestación de 8 semanas, 8 semanas después del trasplante, se muestran en las Figuras 1 a - b, respectivamente. Más allá de este punto temporal de gestación, el trasplante de riñones fetales completos en desarrollo dio como resultado una necrosis central del injerto y se redujo la viabilidad. Por lo tanto, se injertaron pequeños fragmentos de tejido renal fetal humano en hospedadores inmunodeficientes, según se ha descrito previamente (Dekel, B. *et al.*, 1997. Transplantation 64, 1550 - 1558; Dekel, B. *et al.*, 2000. Transplantation 69, 1470 - 1478). En unas condiciones idénticas, las secciones de los trasplantes derivados de los tejidos en una fase de gestación de entre 10 y 14 semanas (n = 14) tenían unas proporciones de tamaño del trasplante significativamente menores (de $14,8 \pm 2,2$ y de $12,3 \pm 1,8$, respectivamente, $P < 0,01$) así como unos recuentos glomerulares y tubulares (de $4,2 \pm 0,8$ y de $15,3 \pm 2,7$; de $3,5 \pm 0,8$ y de $11,2 \pm 2,2$ por HPF, respectivamente; $P < 0,05$). Por lo tanto, en contraste con el trasplante de fragmentos renales fetales humanos más maduros, el injerto de tejidos renales en una fase de gestación más temprana dio lugar a un crecimiento y una nefrogénesis óptimos.

La misma metodología descrita anteriormente se usó para la evaluación del crecimiento y del potencial de diferenciación de tejidos renales porcinos en fase de gestación (Tabla 2). En este caso, los trasplantes renales de tejido porcino en una fase de gestación de entre 6 y 8 semanas mostraron una fibrosis y necrosis central y un deterioro del injerto, mientras que los injertos seccionados tenían una proporción del tamaño del trasplante de $10,5 \pm 2,2$ y de $8,2 \pm 1,2$, respectivamente, a las 8 semanas después del trasplante. Para la caracterización de los tejidos renales porcinos en una fase de gestación temprana se analizaron trasplantes en una fase de gestación de entre 20 - 21, de entre 24 - 25 y de entre 27 - 28 días (datos combinados de 30 trasplantes). Todos los trasplantes porcinos en una fase de gestación de 27 - 28 días mostraban un crecimiento significativo, con una proporción del tamaño del trasplante a las 8 semanas después del trasplante de $28,3 \pm 4,1$ y una diferenciación completa en glomérulos y túbulos maduros ($7,0 \pm 1,0$ glomérulos y $35,5 \pm 5,1$ túbulos por campo microscópico de alta resolución). La morfología macroscópica y los aspectos histológicos de dicho injerto derivado de tejido renal porcino en una fase de gestación de 4 semanas se muestran en las Figuras 1 c - d, respectivamente. Por el contrario, seis de los nueve trasplantes porcinos en una fase de gestación de entre 20 - 21 días no consiguieron desarrollarse o habían evolucionado en crecimientos que contienen pocos glomérulos y túbulos, pero que contienen otros derivados

diferenciados, tales como vasos sanguíneos (Figura 1 e) y cartílago y hueso (Figuras 1 e - f). Adicionalmente, los tejidos renales porcinos en una fase de gestación de entre 24 - 25 días eran inferiores a los trasplantes en una fase de gestación de entre 27 - 28 días para la nefrogénesis, ya que se encontraron tipos celulares no renales y agrupamientos celulares desorganizados en tres de los nueve trasplantes (Figuras 1 h - j). Estos hallazgos complementan los recientes datos *in vitro* (Oliver, J.A. *et al.*, 2002. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 283, F799 - 809), indicando, ambos, que tempranamente en la gestación, el riñón en desarrollo contiene células progenitoras pluripotentes, o células madre embrionarias renales, con la capacidad de generar muchos tipos celulares.

La vascularización derivada del hospedador específica de los injertos derivados de tejido renal en una fase de gestación temprana está asociada con una tolerancia inmunitaria al injerto: la capacidad de los trasplantes de crecer como tejidos en hospedadores no singénicos depende fundamentalmente de su capacidad para sostener la angiogénesis en dichos hospedadores (Gritsch, H.A. *et al.*, 1994. *Transplantation* 57, 906 - 917). En el caso de un xenotrasplante, la barrera inmunológica está condicionada en gran medida por la forma en la que el trasplante deriva su suministro sanguíneo (Cascalho, M. y Platt, J. L., 2001. *Immunity* 14, 437 - 446). Para determinar la capacidad de los ratones receptores de favorecer la angiogénesis de injertos avasculares derivados de tejido renal humano o porcino en una fase de gestación temprana mediante el crecimiento intersticial de los vasos del receptor, se analizó inmunohistoquímicamente la expresión del PECAM (CD31) de ratón, un marcador de las células endoteliales en proliferación, de los trasplantes en desarrollo. Se llevaron a cabo recuentos de los vasos inmunorreactivos que reflejan el número total combinado de capilares y de vasos grandes originarios del hospedador por campo microscópico de alta resolución (Vermeulen, P. B. *et al.*, 1996. *Eur. J. Cancer* 32A, 2474 - 2484). A las 4 semanas después del trasplante, se encontraron $23,5 \pm 4,0$ y $21,3 \pm 3,2$ vasos originarios del hospedador por campo microscópico de alta resolución suministrando a los trasplantes humanos y porcinos en desarrollo, respectivamente. De entre estos injertos de tejido humano y porcino, todos los vasos externos se tiñeron positivamente para el CD31 de ratón (Figuras 2 a y b, respectivamente). Además, se detectaron capilares de tamaño medio y pequeño originarios del hospedador en ambos glomérulos (Figuras 2 c y 2 d) y en el parénquima (Figuras 2 e y f) de los trasplantes humanos y porcinos en la fase de gestación. En los trasplantes procedentes de tejidos renales porcinos maduros y vascularizados en una fase de gestación de 16 semanas y de tejidos renales porcinos de 8 semanas, se produjo una reducción significativa en el recuento de vasos positivos para el CD31 de ratón (de $10,2 \pm 1,8$ y de $11,5 \pm 2,2$, respectivamente, $P < 0,001$) formados principalmente por vasos externos más grandes, pero no por células endoteliales en los glomérulos y en los capilares pequeños (Figuras 2 g y h). Las secciones de control de tejidos renales humanos y porcinos vascularizados no mostraron vasos derivados del hospedador positivos para el CD31 (Figuras 2 i - j, respectivamente). Por lo tanto, los ratones receptores tienen una contribución significativamente mayor a la vasculogénesis de los derivados de tejido renal humano y porcino en una fase de gestación temprana, incluyendo la formación de la microcirculación de los mismos.

Los injertos renales humanos y porcinos en una fase de gestación temprana se diferencian en órganos renales funcionales productores de orina diluida: se encontró que los injertos derivados de tejido renal en una fase de gestación temprana forman grandes quistes llenos de fluido. Las Figuras 3 a y b, representan respectivamente el aspecto de dichos quistes en injertos derivados de tejido renal humano en una fase de gestación de 8 semanas, y porcino en una fase de gestación de 4 semanas, respectivamente. Se observa que dichos quistes se forman en particular en injertos abdominales, donde su crecimiento no estaba limitado por el espacio subcapsular renal. Para evaluar si el fluido de estos quistes representaba los subproductos de la función renal, se recogió el fluido de quistes de injertos derivados de tejido renal humano en una fase de gestación de 8 semanas ($n = 2$) y porcino en una fase de gestación de 4 semanas ($n = 4$) y se analizó para comprobar el contenido en nitrógeno ureico y en creatinina, 6 - 8 semanas después del trasplante. Dado que los trasplantes no pueden usar el sistema excretor del hospedador para el drenaje de la orina, el fluido se drenó mediante la inserción de un microcatéter permanente en los injertos renales en desarrollo. Se encontró que los niveles medios (mg/dl) de nitrógeno ureico y de creatinina eran mayores en el fluido de los quistes en comparación con los encontrados en el suero de los ratones trasplantados (de 518 ± 169 frente a 45 ± 8 y de $7,2 \pm 1,9$ frente a $0,46 \pm 0,048$, respectivamente; $P < 0,001$), lo que indica que los trasplantes humanos y porcinos habían producido orina. Estos resultados están de acuerdo con la demostración de que los precursores renales murinos pueden desarrollarse en nefronas funcionales (Rogers, S. A. *et al.*, 1998. *Kidney Int.* 54, 27 - 37; Rogers, S. A. *et al.*, 2001. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280, R132 - 136; Rogers, S. A. y Hammerman, M. R., 2001. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280, R1865 - 1869; Rogers, S. A. y Hammerman, M. R., 2001. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 281, R661 - 665). Los niveles de nitrógeno ureico y de creatinina en el fluido de los quistes eran significativamente menores en comparación con la orina natural de la vejiga (de 518 ± 169 frente a $4,279 \pm 402$ y de $7,2 \pm 1,9$ frente a 54 ± 6 , respectivamente; $P < 0,001$). La orina diluida del fluido del quiste es compatible con la reducida capacidad para concentrar la orina de los riñones en una fase de gestación temprana.

Los injertos derivados de tejido renal humano o porcino en una fase de gestación temprana son menos susceptibles a los linfocitos humanos alorreactivos / xenorreactivos que los injertos en una fase de desarrollo tardía: la cuestión de si los injertos derivados de tejido renal en una fase de gestación temprana tienen una ventaja inmunológica sobre los injertos derivados de tejido en una fase de gestación tardía se abordó como sigue. Los experimentos preliminares para establecer las condiciones experimentales del momento inicial demostraron que el número mínimo de PBMCs infundidos capaces de inducir un rechazo completo de injertos derivados de tejido renal humano adulto injertados en ratones receptores era de 10^8 células (datos no mostrados). Cuatro semanas después del trasplante de

fragmentos de riñón humano adulto en receptores inmunodeficientes junto con 100×10^6 PBMC humanas alorreactivas, se observó una infiltración linfocitaria masiva, destrucción del tejido y rechazo, según se ha descrito previamente (Dekel, B. *et al.*, 1997. Transplantation 64, 1541 - 1550; Dekel, B. *et al.*, 1999. Int. Immunol. 11, 1673 - 1683). A las 4 semanas después del trasplante, los injertos procedentes de injertos renales de tejido en una fase de gestación de 14 semanas mostraron una media de $39,8 \pm 7,8$ linfocitos T humanos de donante por campo microscópico de alta resolución. A pesar de la presencia de linfocitos T en estos injertos, no se produjo un rechazo temprano similar al de los trasplantes adultos y se produjo el crecimiento de los trasplantes en una fase de gestación de 14, 10, 8 y 7 semanas durante el primer mes (Dekel, B. *et al.*, 1997. Transplantation 64, 1550 - 1558; Dekel, B. *et al.*, 2000. Transplantation 69, 1470 - 1478), según se muestra en las Figuras 4 a - d, respectivamente. No obstante, el análisis de la infiltración de los linfocitos T en los injertos derivados de tejido renal en una fase de gestación de 14 semanas en unos puntos temporales posteriores (6 - 8 semanas después del trasplante) reveló los efectos perjudiciales de las células infiltrantes según se hizo apreciable un deterioro del injerto, en forma de la destrucción de túbulos y de glomérulos (Figuras 4 e - f, respectivamente). y el crecimiento del trasplante se detuvo significativamente en comparación con los trasplantes de animales que no habían sido sometidos a una infusión de PBMC humanas (Figura 4 a). Se obtuvieron unos resultados similares para los injertos renales humanos en una fase de gestación de 10 semanas (Figura 4 b). Por el contrario, tras la infusión de 100×10^6 células humanas en el peritoneo del hospedador, los injertos derivados de tejido renal en una fase de gestación de 8 o 7 semanas mostraron unos glomérulos y unos túbulos conservados sin ninguna infiltración de linfocitos T humanos del donante, (Figuras 4 g - h, respectivamente) y crecieron de una forma similar a los trasplantes de los ratones de control (Figuras 4 c - d, respectivamente), y por lo tanto no mostraron ningún signo evidente de destrucción ni de rechazo. Además, cuando se alteró el protocolo experimental de forma que se infundieron dos inóculos de 100×10^6 PBMC humanas alorreactivas procedentes de diferentes donantes con 6 semanas de diferencia, las células inmunitarias no rechazaron el injerto renal humano en una fase de gestación de 8 semanas, pero los injertos renales humanos en una fase de gestación de 14 semanas trasplantados junto con las PBMC del segundo donante fueron rechazados (Figuras 5 a - b, respectivamente). Por lo tanto, la inmunogenicidad del tejido diferenciado, que se desarrolló durante 6 semanas después del implante de los tejidos renales en una fase de gestación de 8 semanas fase, todavía estaba muy reducida en comparación con los tejidos renales en una fase de gestación de 14 semanas.

También se llevó a cabo un análisis de la infiltración de los linfocitos T en los trasplantes de tejido renal porcino en los hospedadores sometidos a una infusión intraperitoneal de 100×10^6 PBMC humanas. Los experimentos preliminares para el establecimiento de las condiciones experimentales del momento inicial demostraron que el número mínimo de PBMCs infundidos capaces de inducir un rechazo completo de los injertos derivados de tejido renal adulto porcino injertados en los ratones receptores que era de 10^8 (datos no mostrados). En 3 semanas, cinco de los seis injertos derivados de tejido renal porcino adulto estaban infiltrados y era apreciable un daño histológico y una destrucción (datos no mostrados). La infiltración de linfocitos, analizada mediante una tinción con H&E, y la destrucción del tejido del parénquima renal en presencia de infiltrados de linfocitos T humanos en el injerto derivado de tejido renal en fase adulta a las 4 semanas después del trasplante, se muestran en las Figuras 6 a - b y en la Figura 6 c, respectivamente.

En injertos derivados de tejido renal porcino en una fase de gestación de 8 semanas, era fácilmente detectable la infiltración de linfocitos T humanos en los seis injertos, con un promedio de $40,5 \pm 6,75$ linfocitos por campo microscópico de alta resolución, 4 semanas después del trasplante. Los trasplantes de tejidos renales en una fase de gestación de entre 8 y 6 semanas mostraron signos de rechazo, evidenciados por su bajo tamaño después del trasplante con respecto a antes del trasplante (Figuras 7 a - b, respectivamente) en comparación con los injertos derivados de tejido renal en una fase de gestación de entre 3 y 4 semanas a las 6 u 8 semanas después del trasplante (Figuras 7 c - d, respectivamente). El análisis en unos puntos temporales posteriores indicó que cinco de los seis injertos derivados de tejido renal en una fase de gestación de 8 semanas mostraban signos de rechazo en forma de daños tisulares concomitantes con la infiltración de linfocitos T, según se demostró mediante una tinción inmunohistoquímica con anticuerpo anti CD3 humano y mediante una tinción histoquímica con H&E (Figuras 8 a - b y 8 c, respectivamente) de secciones del injerto. Estos resultados, y unos hallazgos similares de otros experimentos con injertos derivados de tejido renal porcino en una fase de gestación de 6 semanas, demostraron que las PBMC humanas xenogénicas inducen el rechazo de los trasplantes renales porcinos en desarrollo en estas etapas de la organogénesis. En agudo contraste, los injertos derivados de tejido renal porcino en una fase de gestación de entre 28 y 21 días no fueron rechazados (Figuras 7 c - d, respectivamente), ni tampoco dichos injertos muestran infiltración de linfocitos T, según se demostró para el injerto derivado de tejido renal porcino en una fase de gestación de 28 días de las Figuras 9 a - b. Adicionalmente, los trasplantes de injertos de tejido renal en una fase de gestación de 28 días en hospedadores sometidos a una segunda infusión de 100×10^6 PBMCs xenogénicas humanas, 4 semanas después del trasplante, no fueron rechazados, mientras que los injertos de tejido renal en una fase de gestación de 8 semanas trasplantados simultáneamente con estas células fueron finalmente rechazados (Figuras 10 a - b, respectivamente).

Las moléculas coestimulantes de las células presentadoras del antígeno del donante son cruciales en la respuesta aloinmunitaria (Boussiotis, V. A. *et al.*, 1996. J. Exp. Med. 184, 365 - 376; Schwartz, R. H., 1996. J. Exp. Med. 184, 1 - 8; Sayegh, M. H. y Turka, L. A., 1998. N. Engl. J. Med. 338, 1813 - 1821; Li, Y. *et al.*, 1999. Nature Med. 5, 1298 - 1302). Por lo tanto se analizó la expresión del ARNm de las moléculas coestimulantes B7-1, B7-2, CD40, CD40L y HLA-DR antes y después del trasplante de tejido renal humano en desarrollo en ausencia y en presencia de

linfocitos humanos alorreactivos. Los resultados obtenidos muestran la expresión diferencial de las moléculas coestimulantes en ambos tejidos renales humanos tanto adultos normales como trasplantados en diferentes fases de gestación, con una clara deficiencia (especialmente de CD40 y de B7-1) en los trasplantes derivados de tejido renal en una fase de gestación de 8 semanas con respecto a los de 14 y los de 22 semanas (Figuras 11 a - c, respectivamente). No se detectó la expresión del ARNm de CD40 ni de CD40L en los injertos derivados de tejido renal en una fase de gestación de 8 semanas mediante un análisis mediante una PCR durante hasta 6 semanas después del trasplante (Figura 11 a). Por el contrario, dicha expresión se detectó en injertos derivados de tejido renal en una fase de gestación de entre 14 y 22 semanas a las 4 semanas después del trasplante (Figuras 11 a - c, respectivamente). Además, se encontró que la expresión de B7-1 después del trasplante y de la infusión de las PBMC era significativamente menor en los injertos derivados de tejido renal en una fase de gestación de 8 semanas (Figura 11 a) en comparación con los injertos derivados de tejido renal en una fase de gestación de entre 14 y 22 semanas (Figuras 11 a - c, respectivamente). Este patrón de expresión del gen de la molécula coestimulante es coherente con los datos *in vivo* que muestran la total ausencia de respuestas inmunitarias por parte de los receptores allogénicos humanos frente a los trasplantes de tejido renal humano de fetos humanos de 7 u 8 semanas, y proporciona por lo tanto un mecanismo subyacente a la tolerancia inmunológica allogénica conseguida frente a dichos tejidos.

Ventajas de los injertos derivados de tejido renal en una fase de gestación temprana en ratones inmunocompetentes: la óptimamente baja inmunogenicidad de los tejidos renales porcinos en una fase de gestación temprana fue adicionalmente demostrada mediante el trasplante de tejidos renales porcinos adultos o en una fase de gestación de 27 a 28 días en ratones Balb/c inmunocompetentes. La evaluación de los injertos de tejido renal adulto (n = 10) y en una fase de gestación de 27 a 28 días (n = 10) después de 2 semanas mostró el rechazo de ambos tejidos. Después de un corto tratamiento con CTLA4-Ig, una proteína de fusión de inmunoglobulina que afecta directamente al reconocimiento por parte de los linfocitos T de B7 en las células presentadoras del antígeno (Linsley, P. S. *et al.*, 1991. J. Exp. Med. 174, 561 - 569), entre 2 y 4 semanas después del trasplante, todos los injertos adultos (8 / 8) tenían una morfología alterada, tejido necrótico y un alto grado de infiltración de linfocitos. Por el contrario, en el mismo punto temporal, la infusión de CTLA4-Ig dio como resultado al crecimiento y la diferenciación de 6 de los 10 trasplantes en fase de gestación temprana, lo que no se observó en los animales sin tratar, indicando la ventaja inmunitaria de los trasplantes derivados de tejido renal en una fase de gestación temprana sobre los trasplantes derivados de tejido renal adulto desarrollado en hospedadores totalmente inmunocompetentes.

Disminución en la expresión de múltiples genes relacionados con la inmunidad en tejido renal en una fase de gestación temprana: para investigar las propiedades inmunogénicas inherentes del tejido renal en una fase de gestación temprana que podrían justificar su reducida inmunogenicidad con respecto al tejido más maduro, se analizó la expresión génica global en tejidos renales humanos en una fase de gestación temprana y en adultos mediante un análisis en micromatriz. Adicionalmente se analizaron 231 genes que tienen unos papeles relacionados directamente con la inmunidad (la lista completa de los genes puede encontrarse en la World Wide Web / Internet en <http://www.weizmann.ac.il/immunology/reisner/immunogenicity.xls>. Estos incluirían los genes que codifican para las moléculas de HLA, citocinas, quimiocinas, receptores de quimiocinas, mediadores de apoptosis, moléculas de adhesión, metaloproteinasas, moléculas de inmunidad innata y otros inmunomoduladores. El agrupamiento jerárquico (Eisen, M. B. *et al.*, 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 95, 14863 - 14868) de todos los genes sobre la base de la similitud en la expresión génica entre los grupos experimentales reveló dos agrupamientos principales, que separaban los tejidos adultos de los fetales. Además, los genes relacionados con la inmunidad se agruparon de acuerdo con la fase de gestación con un grupo de genes de tejido renal en la fase de gestación más temprana y un grupo de genes de tejido renal adulto en lados opuestos de un dendrograma de agrupamiento jerárquico (Figura 12 a). Los patrones de la expresión génica "inmunitaria" se presentan mediante el uso del programa PLOTTOPTGENE (Zuo, F. *et al.*, 2002. Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 99, 6292 - 6297) (Figura 12 b). Dicho análisis descubrió inesperadamente que 68 genes estaban significativamente modificados entre los tejidos adultos y los fetales ($P < 0,05$, número total de clasificaciones erróneas (TNoM) = 0). Los perfiles de expresión de estos genes mostraron los aumentados en los tejidos adultos (n = 57 genes; Figura 12 c, parte superior) y los disminuidos (n = 11 genes; Figura 12 c, parte inferior). Algunos ejemplos de los genes relacionados con la inmunidad con un cambio más significativo incluyen los que codifican para las moléculas que participan en la respuesta inmunitaria tanto adquirida como innata (Tabla 3).

Análisis: los resultados actualmente descritos demuestran que los injertos derivados de tejido renal humano en una fase de gestación de entre 7 y 8 semanas, y los injertos derivados de tejido renal porcino en una fase de gestación de entre 20 y 28 días, trasplantados en ratones inmunodeficientes, sobreviven, crecen y experimentan una nefrogénesis completa, formando un órgano funcional capaz de producir orina. Las células en una fase de gestación temprana no consiguen madurar exclusivamente en estructuras renales diferenciadas, y forman derivados diferenciados no renales y agrupamientos celulares desorganizados. Adicionalmente, se consiguió una organogénesis renal óptima mediante el trasplante de injertos en una fase de gestación temprana de órganos completos. En estas fases de gestación tempranas, los tejidos renales tanto humanos como porcinos contienen células madre mesenquimatosas renales y ramificaciones de primordios uretrales, pero ningún glomérulo, enfatizando su notable potencial para diferenciarse después del trasplante. Una observación clave de los resultados

descritos anteriormente es que el crecimiento y el desarrollo de dichos tejidos renales en una fase de gestación temprana son facilitados por la vasculatura derivada del hospedador.

Tabla 3. Genes relacionados con la inmunidad, expresados de forma diferencial en tejido renal humano en una fase de gestación temprana frente a una fase adulta.

Categoría del gen	Gen expresado de forma diferencial
HLA	MHC de clase I, C
	MHC de clase I, A
	MHC de clase I, E
	MHC de clase II, DPβ1
Quimiocinas / adhesión	RANTES
	proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1)
	proteína quimiotáctica de monocitos 2 (MCP-2)
	E-selectina
Citocinas	osteopontina
	interleucina-15 (IL-15)
	prointerleucina-1 β
	receptor de la interleucina 1 (IL-1)
Inmunidad innata	componente del complemento C1r
	componente del complemento 2
	factor proteico de control del complemento
	receptor de manosa 1
Apoptosis	proteína asociada al receptor del TNF 1 (TRADD)
	ligando inductor de la apoptosis relacionado con el TNF (TRAIL)
	proteína reguladora de la apoptosis de tipo caspasa 2
	cisteína apoptótica Mch 4

Durante más de cuatro décadas se ha sabido que los tejidos embrionarios son menos inmunógenos en comparación con sus homólogos adultos (Medawar, P.B., 1953. Symp. Soc. Exp. Biol. 7, 320-323). Por lo tanto, la actualmente descrita definición del punto temporal más temprano en la gestación renal humana o porcina durante el cual es posible una diferenciación normal y la subsiguiente función renal también puede indicar el momento ideal para la extracción del tejido con menos tendencia a un rechazo inmunitario por respuestas aloinmunitarias / xenoinmunitarias. Consecuentemente, la aceptación del injerto puede reflejar el desarrollo progresivo de una matriz compleja de moléculas de la superficie celular y de factores solubles que determinan el reconocimiento inmunitario del órgano en fase de gestación. En los resultados actualmente descritos, un análisis en micromatriz estableció que el desarrollo de una madurez inmunológica en el riñón humano es más bien un episodio tardío en la gestación, dado que los tejidos renales en una fase de gestación temprana tienen la expresión restringida de muchos de los genes relacionados con la inmunidad. Por lo tanto, inesperadamente se encontró que 13 de los 57 genes estaban significativamente regulados por aumento en los tejidos renales adultos con respecto a los de una fase de gestación pertenecientes a los sistemas de HLA de la clase I y de la clase II. Además, también se encontró inesperadamente que las moléculas que median en el tráfico de los leucocitos, tales como las quimiocinas RANTES y MCP-1 (Nelson, P. J. y Krensky, A. M., 2001. Immunity 14, 377 - 386), la molécula de adhesión E-selectina (Tedder, T. F. *et al.*, 1995. FASEB J. 9, 866 - 873), las citocinas proinflamatorias tales como la osteopontina (O'Regan, A. W. *et al.*, 2000. Immunol. Today 21, 475 - 478; Ashkar, S. *et al.*, 2000. Science 287, 860 - 863; Xie, Y. *et al.*, 2001. Kidney Int. 60, 1645 - 1657) los genes del complemento, que se sabe que están asociados con la inmunidad innata (Pratt, J. R. *et al.*, 2002. Nature Med. 8, 582 - 587), estaban asociados con la reducida inmunogenicidad de los tejidos renales en una fase de gestación temprana con respecto a los tejidos más maduros.

La inmunogenicidad de los tejidos renales en desarrollo fue evaluada mediante el uso de dos modelos inmunológicos diferentes. En el primer modelo, los injertos se implantaron en inmunodeficientes reconstituidos con PBMC humanas. El significativo nivel de inmunidad específica humana generada en este modelo después de la infusión de las PBMC humanas ha sido bien documentado (Segall, H. *et al.*, 1996. Blood 88, 721 - 730; Reisner, Y. y Dagan, S., 1998. Trends Biotechnol. 16, 242 - 246). En este modelo, tanto la infusión primaria como la secundaria de PBMC humanas, obtenidos de donantes diferentes, y que por lo tanto representan dos repertorios de linfocitos T independientes, no fueron capaces de rechazar los injertos derivados de tejidos renales humanos o porcinos en una fase de gestación temprana. Mientras que un análisis génico global indicó que la tolerancia a la inmunidad de dichos injertos derivados de tejido en una fase de gestación temprana está asociada probablemente con una regulación por

disminución de múltiples rutas inmunitarias, la reducción en la expresión de CD40 y de B7-1 observada en dichos injertos implica una posible ausencia o una inmadurez de las células presentadoras del antígeno hematopoyéticas del donante. Además, la reducida inmunogenicidad también podría estar relacionada con la observada merma en las células endoteliales del donante, que recientemente se ha demostrado que funcionan como células presentadoras del antígeno y/o como objetivos para la citotoxicidad mediada por los linfocitos T en el alorreconocimiento directo (Kreisel, D. *et al.*, 2002. *Nature Med.* 8, 233 - 239). Se ha demostrado que la piel humana con tejido alogénico modificado genéticamente, desprovisto de células endoteliales del donante, y por lo tanto limitado en su capacidad para presentar el antígeno, funciona de forma similar a los tejidos renales en una fase de gestación temprana en un modelo humanizado de rechazo de piel (Briscoe, D. M. *et al.*, 1999. *Transplantation* 67, 1590 - 1599).

En el segundo modelo se trasplantaron tejidos renales en hospedadores inmunocompetentes normales. El rechazo en dichos hospedadores puede ser desencadenado por las células presentadoras del antígeno del donante transferidas con el implante, o alternatively, por una sensibilización cruzada frente a las células presentadoras del antígeno del hospedador cargadas con antígenos del donante, de una forma similar al proceso de presentación normal de antígenos bacterianos o víricos (Sayegh, M. H. y Turka, L. A., 1998. *N. Engl. J. Med.* 338, 1813 - 1821; Benichou, G., 1999. *J. Immunol.* 162, 352 - 358). Debido a que los tejidos renales en una fase de gestación temprana posiblemente carecen de células presentadoras del antígeno maduras, además de una relativa reducción en los receptores de migración dirigida y en citocinas o quimiocinas específicas, se ensayó la hipótesis de que el bloqueo de la sensibilización cruzada puede ser suficiente para aliviar el rechazo observado en estos implantes. Los resultados indicaron que el rechazo inmunitario de los injertos de tejido renal en una fase de gestación temprana podría evitarse mediante un bloqueo coestimulante corto con CTLA4-Ig, un protocolo que no consiguió impedir el rechazo de los injertos derivados de tejido renal adulto desarrollados. Dichos resultados destacaron la reducida inmunogenicidad de los tejidos en una fase de gestación temprana con respecto a los tejidos en una fase de gestación tardía. Estos resultados pueden ser extrapolados y usados para el diseño de regímenes inmunosupresores para el trasplante de órganos / tejidos renales en desarrollo tanto alogénicos como xenogénicos en sujetos humanos.

Finalmente, dado que los tejidos renales en una fase de gestación temprana generan órganos renales funcionales productores de orina independientemente del hospedador, dichos injertos pueden usarse junto con una anastomosis urinaria con el sistema urinario del hospedador para el tratamiento de enfermedades renales, por ejemplo, para corregir aberraciones bioquímicas en un individuo urémico. Puede usarse un aumento en el número de trasplantes y/o la administración de factores de crecimiento humanos específicos para favorecer la sustitución funcional.

Conclusión: los resultados descritos anteriormente demostraron inesperadamente y convincentemente que los injertos derivados de órganos / tejidos humanos en una fase de gestación de entre 7 y 8 semanas, o los injertos derivados de órganos / tejidos porcinos en una fase de gestación de entre 20 y 28 días, son capaces de generar, en ausencia de teratomas derivados del injerto, órganos / tejidos estructuralmente y funcionalmente diferenciados, vascularizados por el hospedador que son tolerados óptimamente por los linfocitos humanos alorreactivos / xenorreactivos. En particular, estos resultados demostraron inesperadamente y convincentemente que los injertos derivados de tejido renal humano o porcino en las anteriormente mencionadas respectivas fases de gestación tienen todas estas capacidades, incluyendo la de generar órganos renales productores de orina.

Como tal, el anteriormente descrito método de trasplante general de órganos / tejidos es abrumadoramente superior a todos dichos métodos de la técnica anterior, dado que supera las limitaciones críticas de los últimos; a saber: (i) uso de injertos de órganos / tejidos tolerados insatisfactoriamente por los linfocitos humanos alogénicos / xenogénicos; (ii) incapacidad de los injertos de órganos / tejidos para generar órganos / tejidos estructuralmente y funcionalmente diferenciados, en particular la incapacidad de los injertos renales para diferenciarse en órganos renales productores de orina; y/o (iii) uso de los injertos de órganos / tejidos no disponible en unas cantidades suficientes.

EJEMPLO DE REFERENCIA 2

Tratamiento de enfermedades renales humanas mediante el trasplante de órganos / tejidos renales humanos o porcinos en una fase de gestación temprana sin una inmunosupresión de los receptores del injerto o con una inmunosupresión mínima

Según se muestra en el Ejemplo 1 de la anterior sección de Ejemplos, los injertos derivados de órganos / tejidos humanos en una fase de gestación de entre 7 y 8 semanas, o los injertos derivados de órganos / tejidos porcinos en una fase de gestación de entre 20 y 28 días, trasplantados en un hospedador, son capaces de generar órganos / tejidos estructuralmente y funcionalmente diferenciados tolerados óptimamente por los linfocitos humanos alorreactivos / xenorreactivos. En particular, según se muestra en el mismo, que los trasplantes renales humanos o porcinos en las anteriormente mencionadas respectivas fases de gestación, muestran todas esas capacidades, incluyendo la de generar órganos renales productores de orina. Por lo tanto, en la concepción de la presente invención, se elaboró la hipótesis de que podría usarse el trasplante de injertos derivados de órganos / tejidos humanos o porcinos en las anteriormente mencionadas respectivas fases de gestación, para el tratamiento de enfermedades de dichos órganos / tejidos en seres humanos. En particular, se elaboró la hipótesis de que podría

usarse el trasplante de los anteriormente mencionados injertos renales para el tratamiento de enfermedades renales en seres humanos, como se describe a continuación.

Materiales y Métodos:

Se extrae una cantidad adecuada de tejido renal humano en una fase de gestación de entre 7 y 8 semanas, o de tejido renal porcino en una fase de gestación de entre 20 y 28 días, según se ha descrito en el anterior Ejemplo 1, y se implanta un número terapéuticamente eficaz de injertos en una ubicación anatómica adecuada para el trasplante de un riñón en un sujeto humano con una enfermedad renal tratable mediante un trasplante de riñón. Opcionalmente, al sujeto se le administra un tratamiento de bloqueo de la coestimulación de corta duración en forma de la administración de CTLA4-Ig, según se ha descrito en el anterior Ejemplo 1. El crecimiento y la diferenciación del (los) injerto(s) en el (los) órgano(s) renal(es) funcional(es) son controlados hasta que se detecta la producción de orina, momento en el cual se realiza una anastomosis entre el injerto y el sistema urinario del sujeto, de forma que se permita el drenaje de la orina producida por el injerto a través del sistema urinario del sujeto. Alternativamente, o junto con la anastomosis urinaria, el drenaje de la orina producida por el injerto se efectúa a través de un catéter, como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1 de la anterior sección de Ejemplos.

EJEMPLO DE REFERENCIA 3

El trasplante de injertos pancreáticos humanos y animales en una fase de gestación temprana en un hospedador genera órganos / tejidos pancreáticos que muestran un crecimiento de 10 veces

Según se ha descrito en el Ejemplo 1 de la anterior sección de Ejemplos, los órganos / tejidos humanos o porcinos en una fase de gestación temprana trasplantados en un hospedador son capaces de generar órganos / tejidos estructuralmente y funcionalmente diferenciados, integrados en el hospedador tolerados óptimamente por los linfocitos humanos alorreactivos / xenorreactivos. Por lo tanto, en la concepción de la presente invención se elaboró la hipótesis de que el trasplante de órganos / tejidos pancreáticos humanos o animales en una fase de gestación temprana en un hospedador generará órganos / tejidos pancreáticos que muestren un desarrollo significativo, como sigue.

Materiales y Métodos:

Tejidos pancreáticos del donante: se obtuvieron tejidos pancreáticos humanos en una fase de gestación de entre 12 y 16 semanas después de un raspado, con un tiempo de isquemia caliente de menos de 30 minutos. Después de la disección, los tejidos pancreáticos se conservaron a 4 °C en una solución de UW durante menos de 45 minutos en unas condiciones estériles. El protocolo del estudio fue aprobado por el comité del hospital (Kaplan Medical Center, Rehovot, Israel) de Helsinki.

Los tejidos pancreáticos animales en una fase de gestación de entre 12 y 14 días se microdisecionaron a partir de embriones de ratón bajo el microscopio óptico. Los tejidos se conservaron a 4 °C en una solución de medio PMRI 1640 antes del trasplante.

Procedimiento del trasplante: el trasplante de los órganos / tejidos pancreáticos humanos y animales en unas etapas de desarrollo gestacional tempranas se llevó a cabo según se ha descrito en el Ejemplo 1 de la anterior sección de Ejemplos, con modificaciones. Para el trasplante bajo la cápsula renal, se expone el riñón del hospedador a través de una incisión lateral izquierda, se realiza una incisión de 1,5 milímetros en el extremo caudal de la cápsula renal y los tejidos pancreáticos del donante son injertados bajo la cápsula renal en fragmentos de [1 - 2] x [1 - 2] milímetros.

Análisis de desarrollo del trasplante: el crecimiento y el desarrollo de los órganos / tejidos pancreáticos trasplantados fue analizado según se ha descrito en el Ejemplo 1 de la anterior sección de Ejemplos.

Resultados experimentales:

Se trasplantaron cuatro injertos derivados de órganos / tejidos pancreáticos humanos en una fase de gestación de entre 12 y 16 semanas bajo la cápsula renal de 4 ratones SCID y 4 normales. El tamaño de cada fragmento en el trasplante era de 1 - 2 milímetros de diámetro. En todos los ratones inmunocompetentes se detectó un rechazo que comenzó 5 días después del trasplante, según se determinó a través de un análisis histológico, que indicaba una necrosis del injerto y la destrucción del tejido. En todos los ratones inmunodeficientes se observó la aceptación del injerto, según se determinó mediante el crecimiento del injerto y la ausencia de signos de rechazo tras un análisis histológico y macroscópico. En un injerto derivado de tejido pancreático humano en una fase de gestación de 12 semanas extraído 8 semanas después del trasplante, el tamaño del injerto había aumentado 10 veces (2 x 2 milímetros antes del trasplante frente a 8 x 5 milímetros en la extracción; Figura 13).

Se trasplantaron órganos / tejidos pancreáticos de ratón en una fase de gestación de 14, 13 y 12 días bajo la cápsula renal en ratones singénicos inmunodeficientes (Balb/c). En un injerto derivado del tejido en la fase de

gestación de 12 días extraído 2 semanas después del trasplante, el tamaño del injerto había aumentado 10 veces (1 x 1 milímetro antes del trasplante frente a 5 x 3 milímetros después del trasplante).

Conclusión: los órganos / tejidos pancreáticos humanos o animales en una fase de gestación temprana trasplantados en hospedadores generan órganos / tejidos pancreáticos que muestran un desarrollo significativo.

EJEMPLO DE REFERENCIA 4

Generación de ratones diabéticos

Métodos y Materiales: se induce una diabetes en ratones hospedadores mediante un tratamiento con estreptozotocina, según se ha descrito previamente (Soria *et al.*, 2000. Diabetes 49, 1 - 6). En resumen, se induce una diabetes en ratones hospedadores a través de una única inyección intraperitoneal de 200 mg de estreptozotocina (Sigma) recién disuelta en tampón de citrato (pH = 4,5) por kilogramo de peso corporal. Después se confirma la aparición de la diabetes y se controla mediante la presencia de pérdida de peso, poliuria y unos niveles de glucosa sanguínea de menos de 500 mg/dl. Se obtiene sangre para las pruebas de glucosa mediante un corte en la cola y se mide entre las 9 y las 11 a.m. en unas condiciones sin ayuno, y se analiza con un glucosímetro portátil. Dos semanas después de la inyección de estreptozotocina, a los receptores diabéticos se les implantan los tejidos pancreáticos de donante y se controlan los niveles de glucosa como se ha descrito anteriormente, con objeto de comprobar la restauración del control glucémico.

EJEMPLO DE REFERENCIA 5

Tratamiento de la diabetes mediante el trasplante de tejido pancreático humano o porcino en una fase de gestación temprana en receptores humanos diabéticos sin una inmunosupresión de los receptores o con una inmunosupresión mínima

La diabetes es una enfermedad con un tremendo impacto médico y económico, sin embargo el tratamiento de esta enfermedad mediante una inyección diaria de insulina, la terapia habitual en la técnica anterior, no impide ni alivia satisfactoriamente sus debilitantes o mortales consecuencias. Una metodología que se ha intentado para superar esta limitación ha sido el tratamiento de la diabetes mediante el trasplante de islotes pancreáticos adultos de un donante cadáver. Sin embargo, esta estrategia no puede ser llevada a la práctica de forma rutinaria debido al insuficiente número de páncreas de donantes allogénicos inmunológicamente compatibles a partir de los cuales aislar el número suficiente de islotes necesarios. Según se muestra en el Ejemplo 1 de la anterior sección de Ejemplos, los injertos derivados de órganos / tejidos humanos en una fase de gestación de entre 7 y 8 semanas, o los injertos derivados de órganos / tejidos porcinos en una fase de gestación de entre 20 y 28 días, trasplantados en los hospedadores, generan órganos / tejidos del tipo del injerto estructuralmente y funcionalmente diferenciados tolerados óptimamente por los linfocitos humanos alorreactivos / xenorreactivos. Según se muestra en el Ejemplo 3 de la anterior sección de Ejemplos, el trasplante de órganos / tejidos pancreáticos humanos o animales en una fase de gestación temprana en un hospedador genera órganos / tejidos pancreáticos que muestran un desarrollo significativo. Por lo tanto, en la concepción de la presente invención, se elaboró la hipótesis de que podría usarse el trasplante de órganos / tejidos pancreáticos humanos o porcinos en las anteriormente mencionadas respectivas fases de gestación para el tratamiento de la diabetes en seres humanos, como se describe a continuación.

Materiales y Métodos:

Se aísla una cantidad adecuada de islotes pancreáticos a partir de tejido pancreático humano en una fase de gestación de entre 7 y 8 semanas, o de tejido pancreático porcino en una fase de gestación de entre 20 y 28 días, y se trasplanta en un receptor humano diabético de acuerdo con las técnicas del estado de la técnica, según se ha descrito previamente [National Institutes of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK; <http://www.niddk.nih.gov>)]. En resumen, se usan ultrasonidos para guiar la colocación de un pequeño catéter a través del abdomen superior y el hígado del sujeto. Después se inyectan los islotes pancreáticos a través del catéter en el hígado. El receptor recibe un anestésico local, sin embargo si el receptor no puede tolerar la anestesia local, se usa anestesia general y el trasplante se lleva a cabo a través de una pequeña incisión. Normalmente, para un receptor de 70 kilogramos, se administran aproximadamente un millón de islotes pancreáticos. Se tarda algún tiempo en que las células administradas se adhieran a los nuevos vasos sanguíneos y comiencen a liberar insulina, y por lo tanto después del trasplante, los niveles de glucosa sanguínea del receptor son estrechamente controlados y se administra insulina endógena según sea necesario hasta que se consigue el control glucémico. Opcionalmente, para impedir el rechazo del injerto, el receptor es temporalmente inmunosuprimido mediante un bloqueo de la coestimulación de corta duración en forma de la administración de CTLA4-Ig, según se ha descrito en el anterior Ejemplo 1.

EJEMPLO DE REFERENCIA 6

El trasplante de injertos de hígado humano en una fase de gestación de 7 semanas, o porcino en una fase de gestación de 28 días, genera, en ausencia de teratomas derivados del injerto, órganos / tejidos hepáticos

estructuralmente y funcionalmente diferenciados que serán óptimamente tolerados por los linfocitos humanos alorreactivos / xenorreactivos: base para el tratamiento óptimo de enfermedades hepáticas

El trasplante de órganos / tejidos hepáticos de un donante alogénico sigue siendo la opción terapéutica óptima en el caso de una insuficiencia hepática. Sin embargo, el trasplante terapéutico de injertos de órganos / tejidos hepáticos derivados de un donante alogénico a menudo es imposible de implementar debido a barreras de haplocompatibilidad. Además, incluso cuando se encuentra un donante compatible, con objeto de impedir el rechazo del injerto, dicho trasplante requiere una inmunosupresión permanente del receptor del injerto, habitualmente a través de la administración de fármacos inmunosupresores tóxicos, tales como la ciclosporina A. Dichos tratamientos inmunosupresores contribuyen a los inconvenientes del trasplante alogénico, dado que éstos a menudo no tienen éxito para impedir el rechazo del injerto a corto plazo y habitualmente son incapaces de impedir indefinidamente el rechazo del injerto. Una alternativa al trasplante de un aloinjerto implica el trasplante de xenoinjertos, en particular de injertos porcinos, que se consideran la alternativa animal óptima a los injertos humanos. Sin embargo, los xenoinjertos generalmente no pueden usarse para el trasplante debido a una elevada tolerancia subóptima de dichos injertos por parte de los linfocitos humanos. Por lo tanto, son muy deseados los órganos / tejidos hepáticos adecuados para un trasplante terapéutico en seres humanos y tolerados por los linfocitos humanos no singénicos, y las adecuadas fuentes de dichos órganos / tejidos. Una potencial estrategia para proporcionar órganos / tejidos hepáticos para su trasplante implica el uso de injertos de dichos órganos / tejidos en unas fases de desarrollo tempranas, dado que se ha demostrado que cuanto más temprana sea la fase de desarrollo de un órgano / tejido, mejor tolerado será cuando se trasplante en un hospedador no singénico. Sin embargo, hasta la fecha no se ha conseguido un crecimiento y una diferenciación satisfactorios de los injertos de órganos / tejidos hepáticos no singénicos en desarrollo ni una tolerancia inmunológica satisfactoria de dichos injertos por parte de los linfocitos humanos en ausencia de teratomas derivados del injerto.

En la concepción de la presente invención, se elaboró la hipótesis de que existe una fase de desarrollo durante la cual los órganos / tejidos hepáticos están lo suficientemente diferenciados como para que se comprometan en un desarrollo específico hepático en ausencia de teratomas derivados del injerto, mientras que están lo suficientemente indiferenciados como para que sean óptimamente tolerados cuando son trasplantados en un hospedador no singénico. Al llevar a la práctica la presente invención, se descubrió inesperadamente la existencia de unas fases de gestación específicas durante las cuales los órganos / tejidos hepáticos humanos y porcinos pueden ser trasplantados en un hospedador de forma que generen, en ausencia de teratomas derivados del injerto, órganos / tejidos hepáticos estructuralmente y funcionalmente diferenciados que serán óptimamente tolerados por los linfocitos humanos alorreactivos / xenorreactivos, como se describe a continuación.

Materiales y Métodos:

Extracción de los órganos / tejidos hepáticos humanos en fase de gestación: los órganos / tejidos hepáticos humanos en fase de gestación para el trasplante se obtuvieron mediante la extracción de fragmentos del órgano / tejido después de abortos voluntarios llevados a cabo mecánicamente mediante aspiración en una fase de gestación de 7 semanas, tras la obtención del consentimiento informado. El tiempo de isquemia caliente de las muestras recogidas se mantuvo por debajo de los 30 minutos y después de la disección, los precursores de los órganos se conservaron a 40 grados centígrados en una solución de UW o de PBS durante menos de 45 minutos en unas condiciones estériles. El protocolo del estudio fue aprobado por el comité del hospital (Kaplan Medical Center, Rehovot, Israel) de Helsinki.

Extracción de los órganos / tejidos hepáticos porcinos en fase de gestación: los órganos / tejidos hepáticos porcinos en fase de gestación para el trasplante se obtuvieron con la ayuda del Lahav Institute for animal research, Kibbutz Lahav. Los tejidos en desarrollo se recogieron en una fase de gestación de 28 días a partir de cerdas preñadas operadas bajo anestesia general. El protocolo del estudio fue aprobado por el institute's Ethics Committee local. Los tejidos para el trasplante se extrajeron bajo un microscopio óptico y se conservaron en unas condiciones estériles a 40 grados centígrados durante aproximadamente dos horas en RPMI 1640 (Biological Industries, Bet HaEmek, Israel) antes del trasplante.

Procedimientos del trasplante: los trasplantes se llevaron a cabo en receptores NOD / SCID bajo una anestesia general inducida mediante una inyección intraperitoneal de Avertina al 2,5 % en PBS (10 ml/kg). Para el trasplante bajo la cápsula renal, 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 implantaron fragmentos de 1 - 2 mm de diámetro de injertos de tejido hepático en fase de gestación bajo la cápsula renal. Para el trasplante intraesplénico, el tejido hepático en fase de gestación se cortó en fragmentos de 1 mm en PBS estéril. Se expuso el bazo del hospedador a través de una incisión lateral izquierda y se inyectó una suspensión de fragmentos de 1 mm de diámetro de hígado en fase de gestación en el polo inferior del bazo. La hemostasia se consiguió mediante una ligación con sutura por debajo del sitio de la inyección.

Análisis histológico: los tejidos se fijaron mediante una incubación de una noche en paraformaldehído al 4 por ciento en PBS, los tejidos fijados fueron procesados a través de alcoholes graduados, a través de xilenos y se incluyeron en parafina. Se cortaron secciones de cuatro micrómetros de espesor de los tejidos incluidos y se montaron en portaobjetos de vidrio cargados positivamente. Las secciones tisulares montadas en los portaobjetos fueron

desparafinizadas con xileno después de la rehidratación con los alcoholes graduados. La peroxidasa endógena se inactivó con peróxido de hidrógeno al 0,6 por ciento en metanol al 70 por ciento durante 20 minutos. Cuando fue necesario se aplicó la recuperación del antígeno mediante una ebullición en microondas o un pretratamiento con proteasa. 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 picante (HRP). Como cromógenos se usaron los reactivos diaminobenzidina (DAB) o aminoetilcarbasol (AEC). Los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina y se montaron.

El anticuerpo anti albúmina porcina se obtuvo en Betil Laboratories; se usó el anticuerpo anti Ki67 como marcador de la proliferación celular, y se usó colorante de ácido peryódico-Schiff (PAS) como marcador de la síntesis de glucógeno.

Los detalles adicionales relativos a los protocolos experimentales descritos en este Ejemplo pueden ser proporcionados en Materiales y Métodos, en el Ejemplo 1 de esta sección, más arriba.

Resultados experimentales:

Los xenoinjertos hepáticos porcinos en una fase de gestación de 28 días, pero no de 21 días, se incorporan y muestran una diferenciación hepática funcional y estructural: los injertos derivados de hígado porcino en una fase de gestación de 21 días trasplantados en ratones receptores NOD / SCID portadores de PBMC humanas xenorreactivos mostraron un claro desarrollo de teratomas (Figura 14 a) con una amplia diferenciación del cartílago (Figura 14 b) cuando se examinaron 7 semanas después del trasplante, indicando claramente por primera vez que la fase de gestación óptima para el trasplante de dichos tejidos para obtener una diferenciación hepática adecuada en ausencia de teratomas es mayor del día 21 de gestación. Por el contrario, los injertos derivados de hígado porcino en una fase de gestación de 28 días trasplantados en los bazos de dichos ratones que fueron examinados 6 semanas después del trasplante mostraron una diferenciación estructural y funcional específica hepática, 6 semanas después del trasplante. Todas las secciones tisulares del injerto teñidas con H&E, con ácido peryódico-Schiff o con anticuerpo anti albúmina porcina (Figuras 15 a, 15 b y 15 c, respectivamente) mostraban una notable diferenciación de las estructuras lobulares hepáticas. La funcionalidad hepática fue demostrada por la síntesis / almacenamiento de glucógeno y por la síntesis de albúmina (Figuras 15 b y 15 c, respectivamente). Adicionalmente, la tinción de las secciones con un anticuerpo específico para el marcador de proliferación Ki67 demostró la clara capacidad proliferativa de los hepatocitos derivados del injerto. De forma análoga, dichos injertos trasplantados bajo la cápsula renal de dichos receptores, analizados 6 semanas después del trasplante también mostraron una función hepática, evidenciada por la síntesis / almacenamiento de glucógeno y la síntesis de albúmina, según se determinó mediante la tinción de las secciones tisulares del injerto mediante el uso de ácido peryódico-Schiff y de anticuerpo anti albúmina porcina (Figuras 16 a y 16 b, respectivamente).

Los aloinjertos hepáticos humanos en una fase de gestación de 7 semanas se incorporan y muestran una diferenciación hepática funcional y estructural: los injertos derivados de hígado humano en una fase de gestación de 7 semanas trasplantados bajo la cápsula renal de ratones NOD / SCID mostraron una diferenciación estructural y funcional específica hepática, 6 semanas después del trasplante. Las secciones tisulares del injerto teñidas con H&E o con ácido peryódico-Schiff mostraron una notable diferenciación de los conductos biliares y una síntesis / almacenamiento de glucógeno (Figuras 17 a y 17 b, respectivamente).

Conclusión: los resultados descritos anteriormente demuestran convincentemente que los injertos derivados de hígado humano en una fase de gestación de 7 semanas, o los injertos derivados de hígado porcino en una fase de gestación de 28 días, pero no de 21 días, son capaces de generar, en ausencia de teratomas derivados del injerto, órganos / tejidos hepáticos estructuralmente y funcionalmente diferenciados que serán óptimamente tolerados por los linfocitos humanos alogénicos / xenogénicos. Como tales, los resultados descritos anteriormente demuestran que pueden usarse los injertos derivados de hígado humano en una fase de gestación de 7 semanas, o los injertos derivados de hígado porcino de 28 días, para llevar a cabo óptimamente el trasplante terapéutico de tejidos / órganos hepáticos alogénicos y xenogénicos, respectivamente, con respecto a todos los métodos de la técnica anterior.

EJEMPLO DE REFERENCIA 7

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

El trasplante de órganos / tejidos pancreáticos alogénicos de donante sigue siendo la opción terapéutica óptima en el caso de insuficiencia pancreática. Sin embargo, el trasplante terapéutico de injertos de órganos / tejidos pancreáticos derivados de un donante alogénico a menudo es imposible de implementar debido a barreras de haplocompatibilidad. Además, incluso cuando se encuentra un donante compatible, con objeto de impedir el rechazo del injerto, dicho trasplante requiere una inmunosupresión permanente del receptor del injerto, habitualmente a

través de la administración de fármacos inmunosupresores tóxicos, tales como la ciclosporina A. Dichos tratamientos inmunosupresores contribuyen a los inconvenientes del trasplante alogénico, dado que éstos a menudo no tienen éxito para impedir el rechazo del injerto a corto plazo y habitualmente son incapaces de impedir indefinidamente el rechazo del injerto. Una alternativa al trasplante de un aloinjerto implica el trasplante de xenoinjertos, en particular de injertos porcinos, que se consideran la alternativa animal óptima a los injertos humanos. Sin embargo, los xenoinjertos generalmente no pueden usarse para el trasplante debido a una elevada tolerancia subóptima de dichos injertos por parte de los linfocitos humanos. Por lo tanto, son muy deseados los órganos / tejidos pancreáticos adecuados para un trasplante terapéutico en seres humanos y tolerados por los linfocitos humanos no singénicos, y las adecuadas fuentes de dichos órganos / tejidos. Una potente estrategia para proporcionar órganos / tejidos pancreáticos para su trasplante implica el uso de injertos de dichos órganos / tejidos en unas fases de desarrollo tempranas, dado que se ha demostrado que cuanto más temprana sea la fase de desarrollo de un órgano / tejido, mejor tolerado será cuando se trasplante en un hospedador no singénico. Sin embargo, hasta la fecha no se ha conseguido la generación de tejidos / órganos derivados de injertos pancreáticos que muestren un crecimiento y una diferenciación satisfactorios en ausencia de teratomas derivados del injerto ni una tolerancia inmunológica satisfactoria por parte de los linfocitos humanos alorreactivos / xenorreactivos, sin una inmunosupresión o con una inmunosupresión mínima.

En la concepción de la presente invención, se elaboró la hipótesis de que existe una fase de desarrollo durante la cual los órganos / tejidos pancreáticos están lo suficientemente diferenciados como para que se comprometan en un desarrollo específico pancreático en ausencia de teratomas derivados del injerto, mientras que están lo suficientemente indiferenciados como para que sean óptimamente tolerados cuando son trasplantados en un hospedador no singénico. Al llevar a la práctica la presente invención, se descubrió inesperadamente la existencia de unas fases de gestación específicas durante las cuales los órganos / tejidos pancreáticos humanos o porcinos pueden ser trasplantados en un hospedador de forma que generen, en ausencia de teratomas derivados del injerto, órganos / tejidos productores de insulina estructuralmente y funcionalmente diferenciados que serán óptimamente tolerados por los linfocitos humanos alorreactivos / xenorreactivos, como se describe a continuación.

Materiales y Métodos:

Extracción de los órganos / tejidos pancreáticos humanos en fase de gestación: los órganos / tejidos pancreáticos humanos en fase de gestación para el trasplante se obtuvieron mediante la extracción de fragmentos del órgano / tejido después de abortos voluntarios llevados a cabo mecánicamente mediante aspiración en una fase de gestación de 8 semanas, tras la obtención del consentimiento informado. El tiempo de isquemia caliente de las muestras recogidas se mantuvo por debajo de los 30 minutos y después de la disección, los precursores de los órganos se conservaron a 40 grados centígrados en una solución de UW o de PBS durante menos de 45 minutos en unas condiciones estériles. El protocolo del estudio fue aprobado por el comité del hospital (Kaplan Medical Center, Rehovot, Israel) de Helsinki.

Extracción de los órganos / tejidos pancreáticos porcinos en fase de gestación: los órganos / tejidos pancreáticos porcinos en fase de gestación para el trasplante se obtuvieron con la ayuda del Lahav Institute for animal research, Kibbutz Lahav. Los tejidos en desarrollo se recogieron en una fase de gestación de 27 - 28 días a partir de cerdas preñadas operadas bajo anestesia general. El protocolo del estudio fue aprobado por el institute's Ethics Committee local. Los tejidos para el trasplante se extrajeron bajo un microscopio óptico y se conservaron en unas condiciones estériles a 40 grados centígrados durante aproximadamente dos horas en RPMI 1640 (Biological Industries, Bet HaEmek, Israel) antes del trasplante.

Procedimientos del trasplante: los trasplantes se llevaron a cabo en quimeras Balb/c x NOD / SCID o en ratones NOD / SCID bajo una anestesia general inducida mediante una inyección intraperitoneal de Avertina al 2,5 % en PBS (10 ml/kg). Para el trasplante bajo la cápsula renal, 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 implantaron fragmentos de 1 - 2 mm de diámetro de tejido pancreático en fase de gestación bajo la cápsula renal.

Análisis histológico: se usó el clon del anticuerpo anti citoqueratina MNF 116 (sin reactividad cruzada con los tejidos del ratón) para la inmunotinción del epitelio porcino; y el anticuerpo anti insulina y el clon del anticuerpo anti vimentina humano V9 (sin reactividad cruzada con los tejidos del ratón; usados para la tinción de las células mesenquimatosas humanas) se obtuvieron en DAKO. Los tejidos se fijaron mediante una incubación de una noche en paraformaldehído al 4 por ciento en PBS, los tejidos fijados fueron procesados a través de alcoholes graduados, a través de xilenos y se incluyeron en parafina. Se cortaron secciones de cuatro micrómetros de espesor de los tejidos incluidos y se montaron en portaobjetos de vidrio cargados positivamente. Las secciones tisulares montadas en los portaobjetos fueron desparafinizadas con xileno después de la rehidratación con los alcoholes graduados. La peroxidasa endógena se inactivó con peróxido de hidrógeno al 0,6 por ciento en metanol al 70 por ciento durante 20 minutos. Cuando fue necesario se aplicó la recuperación del antígeno mediante una ebullición en microondas o un pretratamiento con proteasa. 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 picante (HRP). Como cromógenos se usaron los reactivos diaminobenzidina (DAB) o aminoetilcarbasol (AEC). Los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina y se montaron.

Resultados experimentales:

Los trasplantes de xenoinjertos pancreáticos porcinos de entre 27 y 28 días fase de gestación se incorporan y muestran una diferenciación pancreática funcional y estructural: los injertos derivados de páncreas porcinos en una fase de gestación de entre 27 y 28 días trasplantados bajo la cápsula renal de ratones NOD / SCID mostraron claramente una diferenciación estructural y funcional pancreática específica, 6 semanas después del trasplante. Los injertos derivados de hígado porcino en una fase de gestación de 28 días trasplantados en los bazos de dichos ratones que fueron examinados 5 semanas después del trasplante mostraron un significativo crecimiento pancreático, como puede observarse a partir de la fotografía del injerto completo (Figura 18 a). La diferenciación estructural pancreática era claramente evidente 6 semanas después del trasplante en un injerto derivado de tejido pancreático porcino en una fase de gestación de 27 días, según se determina a través de secciones tisulares del injerto teñidas con H&E, que mostraban la diferenciación de las estructuras lobulares pancreáticas con estructuras ductales y acinares pancreáticas (Figuras 18 b - c). La diferenciación funcional pancreática también fue evidente 6 semanas después del trasplante en secciones tisulares de un injerto derivado de tejido en una fase de gestación de 27 días en forma de síntesis de insulina y de péptido pancreático (Figuras 19 a y 19 b, respectivamente). Como puede observarse adicionalmente en la Figura 19 c, la inmunotinción de un injerto derivado de tejido pancreático porcino en una fase de gestación de 28 días con anticuerpo anti citoqueratina mostró una clara diferenciación del epitelio ductal pancreático derivado del injerto.

Los aloinjertos pancreáticos humanos en una fase de gestación de 8 semanas se incorporan y muestran una diferenciación pancreática funcional y estructural: los injertos derivados de tejido pancreático humano en una fase de gestación de 8 semanas trasplantados bajo la cápsula renal de ratones NOD / SCID portadores de linfocitos humanos alorreactivos mostraron claramente una diferenciación estructural y funcional específica del páncreas, 6 semanas después del trasplante. La funcionalidad pancreática del injerto fue demostrada convincentemente por la diferenciación de células beta positivas para insulina en los islotes pancreáticos (Figuras 20 a - b). Adicionalmente, los injertos derivados de tejido pancreático humano en una fase de gestación de 8 semanas trasplantados bajo la cápsula renal de quimeras Balb/c x NOD / SCID portadoras de PBMC humanas alorreactivos también mostraron claramente una diferenciación estructural y funcional específica del páncreas, según se muestra a través de la diferenciación de células mesenquimatosas humanas positivas para vimentina (Figuras 20 c - d).

Conclusión: los resultados descritos anteriormente demuestran convincentemente que los injertos derivados de tejido pancreático humano en una fase de gestación de 8 semanas, o porcino en una fase de gestación de entre 27 y 28 días, son capaces de generar, en ausencia de teratomas derivados del injerto, órganos / tejidos pancreáticos productores de insulina estructuralmente y funcionalmente diferenciados que serán óptimamente tolerados por los linfocitos humanos alorreactivos / xenorreactivos. Como tales, los resultados descritos anteriormente demuestran que pueden usarse los injertos derivados de tejido pancreático humano en una fase de gestación de 8 semanas, o de tejido pancreático porcino en una fase de gestación de entre 27 y 28 días, para llevar a cabo óptimamente el trasplante terapéutico de tejidos / órganos pancreáticos alogénicos / xenogénicos, respectivamente, con respecto a todos los métodos de la técnica anterior.

EJEMPLO DE REFERENCIA 8

El trasplante de injertos derivados de tejido cardíaco humano en una fase de gestación de 9 semanas genera, en ausencia de teratomas derivados del injerto, células / tejidos que muestran un fenotipo cardíaco proliferativo que serán óptimamente tolerados por los linfocitos humanos alorreactivos: base para el tratamiento óptimo de enfermedades cardíacas

El trasplante de órganos / tejidos cardíacos alogénicos de donante sigue siendo la opción terapéutica óptima en el caso de insuficiencia cardíaca. Sin embargo, el trasplante terapéutico de injertos de órganos / tejidos cardíacos derivados de un donante alogénico a menudo es imposible de implementar debido a barreras de haplocompatibilidad. Además, incluso cuando se encuentra un donante compatible, con objeto de impedir el rechazo del injerto, dicho trasplante requiere una inmunosupresión permanente del receptor del injerto, habitualmente a través de la administración de fármacos inmunosupresores tóxicos, tales como la ciclosporina A. Dichos tratamientos inmunosupresores contribuyen a los inconvenientes del trasplante alogénico, dado que éstos a menudo no tienen éxito para impedir el rechazo del injerto a corto plazo y habitualmente son incapaces de impedir indefinidamente el rechazo del injerto. Por lo tanto, son muy deseados los órganos / tejidos cardíacos adecuados para un trasplante terapéutico en seres humanos y tolerados por los linfocitos humanos no singénicos, y las adecuadas fuentes de dichos órganos / tejidos. Una potente estrategia para proporcionar órganos / tejidos cardíacos para su trasplante implica el uso de injertos de dichos órganos / tejidos en unas fases de desarrollo tempranas, dado que se ha demostrado que cuanto más temprana sea la fase de desarrollo de un órgano / tejido, mejor tolerado será cuando se trasplante en un hospedador no singénico. Sin embargo, hasta la fecha no se ha conseguido un crecimiento y una diferenciación satisfactorios de injertos de tejidos / órganos cardíacos no singénicos en desarrollo ni una tolerancia inmunológica satisfactoria de dichos injertos por parte de los linfocitos en ausencia de teratomas derivados del injerto.

En la concepción de la presente invención, se elaboró la hipótesis de que existe una fase de desarrollo durante la cual los órganos / tejidos cardiacos están lo suficientemente diferenciados como para que se comprometan en un desarrollo específico cardiaco en ausencia de teratomas derivados del injerto, mientras que están lo suficientemente indiferenciados como para que sean óptimamente tolerados cuando son trasplantados en un hospedador no

Materiales y Métodos:

Extracción de los órganos / tejidos cardiacos humanos en fase de gestación: los órganos / tejidos cardiacos humanos en fase de gestación para el trasplante se obtuvieron mediante la extracción de fragmentos de órganos / tejidos después de abortos voluntarios llevados a cabo mecánicamente mediante aspiración en una fase de gestación de 9 semanas, tras la obtención del consentimiento informado. El tiempo de isquemia caliente de las muestras recogidas se mantuvo por debajo de los 30 minutos y después de la disección, los precursores de los órganos se conservaron a 40 grados centígrados en una solución de UW o de PBS durante menos de 45 minutos en unas condiciones estériles. El protocolo del estudio fue aprobado por el comité del hospital (Kaplan Medical Center, Rehovot, Israel) de Helsinki.

Procedimientos del trasplante: los trasplantes se llevaron a cabo en receptores NOD / SCID bajo una anestesia general inducida mediante una inyección intraperitoneal de Avertina al 2,5 % en PBS (10 ml/kg). Para el trasplante bajo la cápsula renal, 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 implantaron fragmentos de 1 - 2 mm de diámetro de tejido cardiaco en fase de gestación bajo la cápsula renal.

Análisis histológico: se usó anticuerpo anti actina sarcomérica alfa y anticuerpo anti proteína neurofilamentosa, respectivamente, para teñir las células cardiomiocíticas y las células ganglionares basales. Los tejidos se fijaron mediante una incubación de una noche en paraformaldehído al 4 por ciento en PBS, los tejidos fijados fueron procesados a través de alcoholes graduados, a través de xilenos y se incluyeron en parafina. Se cortaron secciones de cuatro micrómetros de espesor de los tejidos incluidos y se montaron en portaobjetos de vidrio cargados positivamente. Las secciones tisulares montadas en los portaobjetos fueron desparafinizadas con xileno después de la rehidratación con los alcoholes graduados. La peroxidasa endógena se inactivó con peróxido de hidrógeno al 0,6 por ciento en metanol al 70 por ciento durante 20 minutos. Cuando fue necesario se aplicó la recuperación del antígeno mediante una ebullición en microondas o un pretratamiento con proteasa. 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 picante (HRP). Como cromógenos se usaron los reactivos diaminobenzidina (DAB) o aminoetilcarbasol (AEC). Los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina y se montaron.

Resultados experimentales:

Los aloinjertos de tejido cardiaco humano en una fase de gestación de 9 semanas se incorporan y muestran un fenotipo cardiaco proliferativo: los injertos derivados de tejido cardiaco humano en una fase de gestación de 9 semanas trasplantados bajo la cápsula renal de ratones portadores de PBMC humanas alorreactivos mostraron claramente un fenotipo cardiaco proliferativo 6 semanas después del trasplante. La diferenciación cardiaca de los injertos en forma de una diferenciación de las células cardiomiocíticas y de las células ganglionares basales se apreció claramente en secciones tisulares del injerto teñidas con anticuerpo anti actina sarcomérica alfa o con anticuerpo anti proteína neurofilamentosa (Figuras 21 a y 21 b, respectivamente).

Conclusión: los resultados descritos anteriormente demuestran convincentemente que los injertos derivados de tejido cardiaco humano en una fase de gestación de 9 semanas son capaces de generar, en ausencia de teratomas derivados del injerto, células / tejidos derivados del injerto que muestran un fenotipo cardiaco proliferativo que serán óptimamente tolerados por los linfocitos humanos alogénicos. Como tales, los resultados descritos anteriormente demuestran que pueden usarse los injertos derivados de tejido cardiaco humano en una fase de gestación de 9 semanas, para llevar a cabo óptimamente el trasplante terapéutico de tejidos / órganos cardiacos alogénicos, respectivamente, con respecto a todos los métodos de la técnica anterior.

EJEMPLO 9

El trasplante de injertos derivados de órganos / tejidos linfoides porcinos en una fase de gestación de 28 días genera, en ausencia de teratomas derivados del injerto, tejidos linfoides mesenquimatosos / estromales bien diferenciados y vascularizados que serán óptimamente tolerados por los linfocitos humanos xenorreactivos: base para el tratamiento óptimo de enfermedades genéticas y/o hematológicas

El trasplante de órganos / tejidos linfoides capaces de generar un estroma linfoide de origen xenogénico, en particular de origen porcino, que son considerados la alternativa animal óptima a los injertos humanos, es una opción terapéutica potencialmente óptima para las enfermedades hematológicas y/o genéticas, incluyendo las relacionadas con un trastorno en la coagulación / una deficiencia / defecto en un factor de coagulación, tales como la hemofilia, aquellas relacionadas con una deficiencia / defecto en una enzima, tales como la enfermedad de Gaucher, y/o aquellas relacionadas con un defecto en el estroma linfoide. Sin embargo, generalmente no pueden usarse xenoinjertos para el trasplante debido a una elevada tolerancia subóptima de dichos injertos por parte de los linfocitos humanos. Por lo tanto, son muy deseados los órganos / tejidos linfoides adecuados para un trasplante terapéutico en seres humanos y tolerados por los linfocitos humanos xenogénicos, y las adecuadas fuentes de dichos órganos / tejidos. Una potente estrategia para proporcionar dichos órganos / tejidos linfoides para su trasplante implica el uso de injertos de dichos órganos / tejidos en unas fases de desarrollo tempranas, dado que se ha demostrado que cuanto más temprana sea la fase de desarrollo de un órgano / tejido, mejor tolerado será cuando se trasplante en un hospedador no singénico. Sin embargo, hasta la fecha no se ha conseguido un crecimiento y una diferenciación satisfactorios de injertos de tejidos / órganos linfoides xenogénicos en desarrollo ni una tolerancia inmunológica satisfactoria de dichos injertos por parte de los linfocitos humanos xenorreactivos en ausencia de teratomas derivados del injerto.

En la concepción de la presente invención, se elaboró la hipótesis de que existe una fase de desarrollo durante la cual los órganos / tejidos linfoides están lo suficientemente diferenciados como para que se comprometan en un desarrollo específico linfoide en ausencia de teratomas derivados del injerto, mientras que están lo suficientemente indiferenciados como para que sean óptimamente tolerados cuando son trasplantados en un hospedador no singénico. Al llevar a la práctica la presente invención, se descubrió inesperadamente la existencia de unas fases de gestación específicas durante las cuales los órganos / tejidos linfoides porcinos pueden ser trasplantados en un hospedador de forma que se generen, en ausencia de teratomas derivados del injerto, órganos / tejidos mesenquimatosos / estromales linfoides bien diferenciados y vascularizados que serán óptimamente tolerados por los linfocitos humanos xenorreactivos, como se describe a continuación.

Materiales y Métodos:

Extracción de los órganos / tejidos esplénicos porcinos en fase de gestación: los órganos / tejidos esplénicos porcinos en fase de gestación para el trasplante se obtuvieron con la ayuda del Lahav Institute for animal research, Kibbutz Lahav. Los tejidos en desarrollo se recogieron en una fase de gestación de 28 días a partir de cerdas preñadas operadas bajo anestesia general. El protocolo del estudio fue aprobado por el institute's Ethics Committee local. Los tejidos para el trasplante se extrajeron bajo un microscopio óptico y se conservaron en unas condiciones estériles a 40 grados centígrados durante aproximadamente dos horas en RPMI 1640 (Biological Industries, Bet HaEmek, Israel) antes del trasplante.

Procedimientos del trasplante: los trasplantes de los injertos de tejido esplénico se llevaron a cabo en ratones NOD / SCID bajo una anestesia general inducida mediante una inyección intraperitoneal de Avertina al 2,5 % en PBS (10 ml/kg). Se realizó una incisión de 1,5 mm en el extremo caudal de la cápsula renal y se implantaron fragmentos de 1 - 2 mm de diámetro de injertos de tejido esplénico en fase de gestación bajo la cápsula renal.

Análisis histológico: se usó una tinción de H&E para la identificación de la diferenciación esplénica. Los tejidos se fijaron mediante una incubación de una noche en paraformaldehído al 4 por ciento en PBS, los tejidos fijados fueron procesados a través de alcoholes graduados, a través de xilenos y se incluyeron en parafina. Se cortaron secciones de cuatro micrómetros de espesor de los tejidos incluidos y se montaron en portaobjetos de vidrio cargados positivamente. Las secciones tisulares montadas en los portaobjetos fueron desparafinizadas con xileno después de la rehidratación con los alcoholes graduados. La peroxidasa endógena se inactivó con peróxido de hidrógeno al 0,6 por ciento en metanol al 70 por ciento durante 20 minutos.

Resultados experimentales:

Los xenoinjertos esplénicos porcinos en una fase de gestación de 28 días se incorporan y muestran una diferenciación esplénica: el análisis, 6 semanas después del trasplante, de las secciones teñidas con H&E de los injertos derivados de tejido esplénico porcino en una fase de gestación de 28 días trasplantado bajo la cápsula renal de ratones, mostró claramente la generación de tejidos linfoides mesenquimatosos / estromales bien diferenciados y vascularizados que serán óptimamente tolerados por los linfocitos humanos xenogénicos (Figura 22).

Conclusión: los resultados descritos anteriormente demuestran convincentemente que los injertos de órganos / tejidos linfoides porcinos en una fase de gestación de 28 días son capaces de generar, en ausencia de teratomas derivados del injerto, tejidos linfoides mesenquimatosos / estromales bien diferenciados y vascularizados derivados del injerto que serán óptimamente tolerados por los linfocitos humanos xenorreactivos. Como tales, los resultados descritos anteriormente demuestran que pueden usarse los injertos de órganos / tejidos linfoides porcinos en una fase de gestación de 28 días para llevar a cabo óptimamente el trasplante terapéutico de injertos linfoides xenogénicos con respecto a todos los métodos de la técnica anterior, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades hematológicas y/o genéticas, incluyendo las relacionadas con un trastorno en la coagulación / una

deficiencia / defecto en un factor de coagulación, tales como la hemofilia, aquellas relacionadas con una deficiencia / defecto en una enzima, tales como la enfermedad de Gaucher, y/o aquellas relacionadas con un defecto en el estroma linfoide.

- 5 Se apreciará que ciertas características de la invención, que por claridad se han descrito en el contexto de formas de realización individuales, también pueden proporcionarse combinadas en una única forma de realización. Por el contrario, varias características de la invención, que por brevedad se describen en el contexto de una única forma de realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un injerto de un órgano esplénico o de tejido esplénico porcino en fase de gestación para su uso en el tratamiento de una enfermedad o de un trastorno seleccionado de entre el grupo que consiste en un trastorno de la coagulación, una deficiencia en un factor de la coagulación, un defecto en el estroma linfoide, un trastorno relacionado con la inmunidad y una enfermedad de almacenamiento lisosómico / deficiencia enzimática, seleccionándose dicho injerto de un órgano esplénico o de tejido esplénico porcino para que no exprese o presente al menos una molécula capaz de estimular o de potenciar una respuesta inmunitaria en un sujeto xenogénico, en el que dicha al menos una molécula es un correceptor de linfocitos o un ligando de un correceptor de linfocitos, y en el que dicha fase de diferenciación de dicho injerto de un órgano esplénico o de un tejido esplénico porcino se corresponde con un porcino de entre 20 y 63 días de gestación.
- 15 2. El injerto de un órgano esplénico o de tejido esplénico para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho sujeto es un ser humano.
3. El injerto de un órgano esplénico o de tejido esplénico para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha fase de diferenciación se corresponde con entre 20 y 56 días de gestación.
- 20 4. El injerto de un órgano esplénico o de tejido esplénico para el uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicha fase de diferenciación se corresponde con entre 20 y 42 días de gestación.
5. El injerto de un órgano esplénico o de tejido esplénico para el uso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicha fase de diferenciación se corresponde con 42 días de gestación.
- 25 6. El injerto de un órgano esplénico o de tejido esplénico para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende adicionalmente el uso de un fármaco inmunosupresor, favoreciendo así el establecimiento de dicho injerto de un órgano esplénico o de tejido esplénico en dicho sujeto.
- 30 7. El injerto de un órgano esplénico o de tejido esplénico para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho fármaco inmunosupresor es capaz de bloquear la unión de un correceptor de linfocitos con un ligando de dicho correceptor de linfocitos.
- 35 8. El injerto de un órgano esplénico o de tejido esplénico para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho fármaco inmunosupresor es la CTLA4-Ig.
9. El injerto de un órgano esplénico o de tejido esplénico para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho correceptor de linfocitos o dicho ligando del correceptor de linfocitos se elige de entre el grupo que consiste en B7-1, CD40 y CD40L.
- 40 10. El injerto de un órgano esplénico o de tejido esplénico para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha selección de dicho injerto de un órgano esplénico o de tejido esplénico se lleva a cabo a través de un análisis mediante una RT-PCR de dicho injerto de un órgano esplénico o de tejido esplénico.
- 45 11. El injerto de un órgano esplénico o de tejido esplénico para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha deficiencia en un factor de la coagulación comprende la hemofilia.
12. El injerto de un órgano esplénico o de tejido esplénico para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad de almacenamiento lisosómico / deficiencia enzimática comprende la enfermedad de Gaucher.
- 50 13. El injerto de un órgano esplénico o de tejido esplénico para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho defecto en el estroma linfoide comprende un defecto en el estroma linfoide que da como resultado un deterioro en el crecimiento y/o la diferenciación celular hematológica.

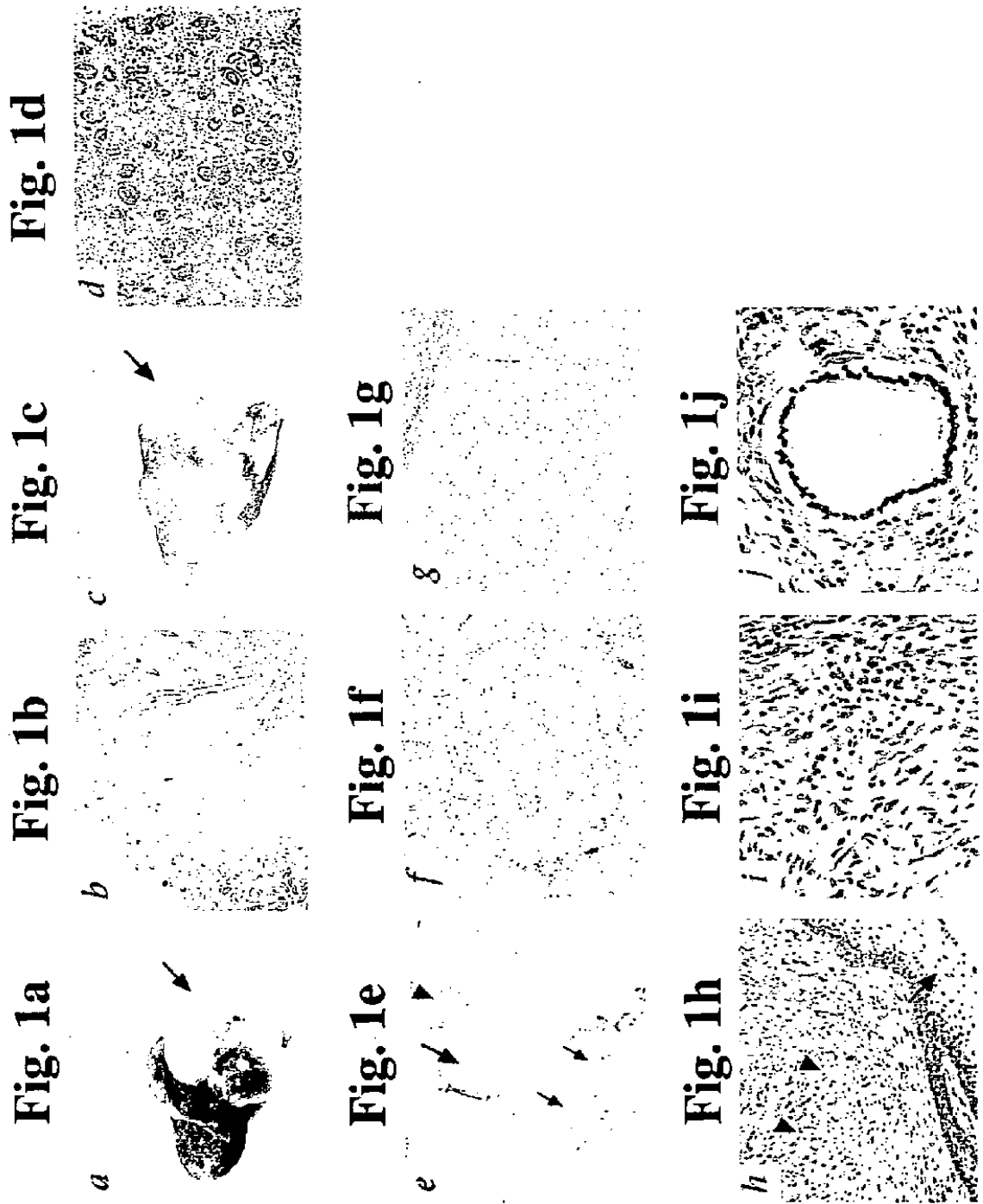


Fig. 2a

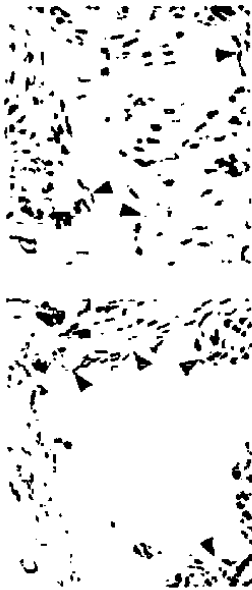


Fig. 2b



Fig. 2c



Fig. 2d

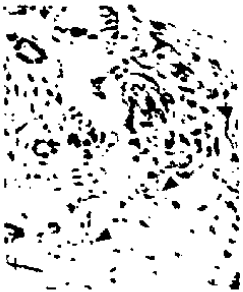


Fig. 2e



Fig. 2f

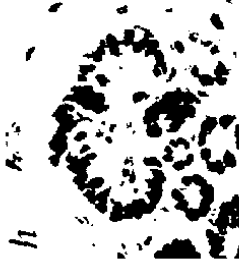


Fig. 2g

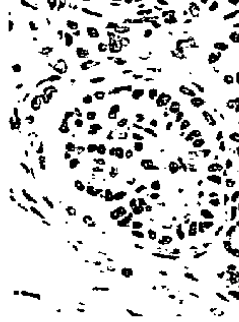


Fig. 2h



Fig. 2i



Fig. 2j



Fig. 3a

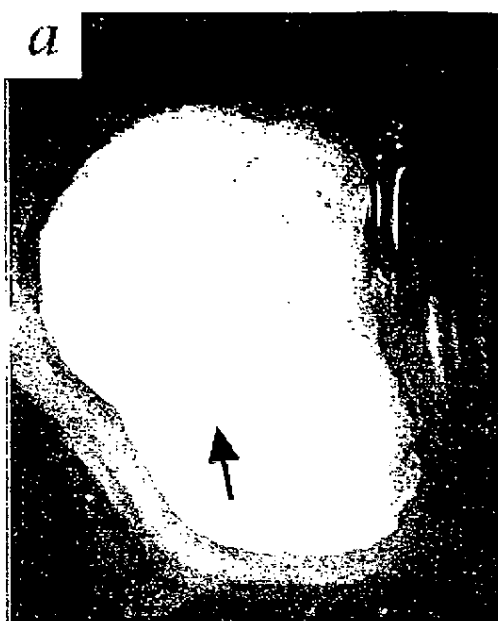


Fig. 3b

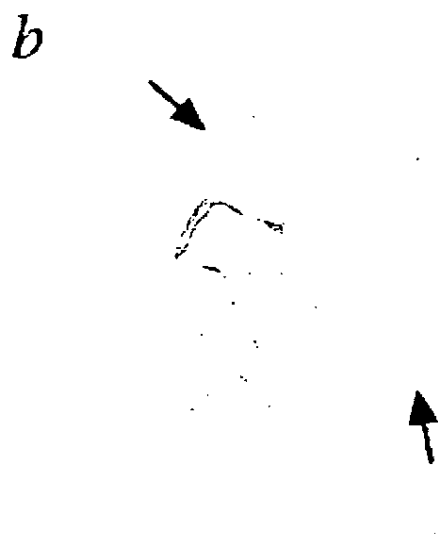


Fig. 4a

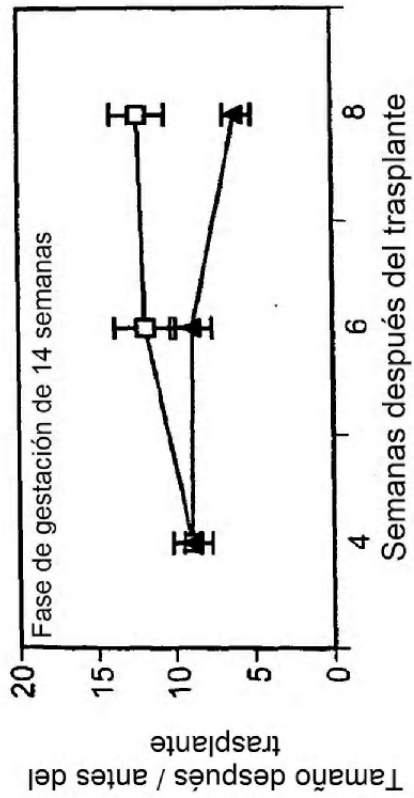


Fig. 4b

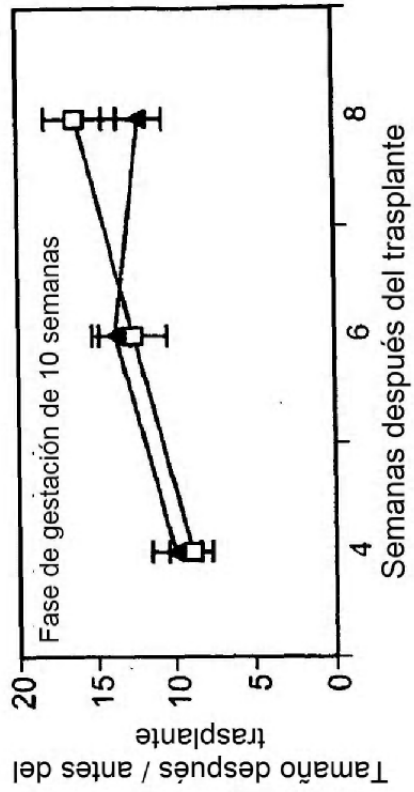


Fig. 4c

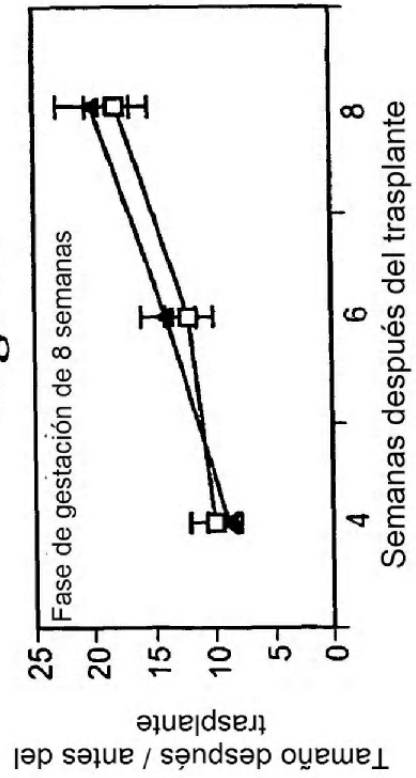


Fig. 4d

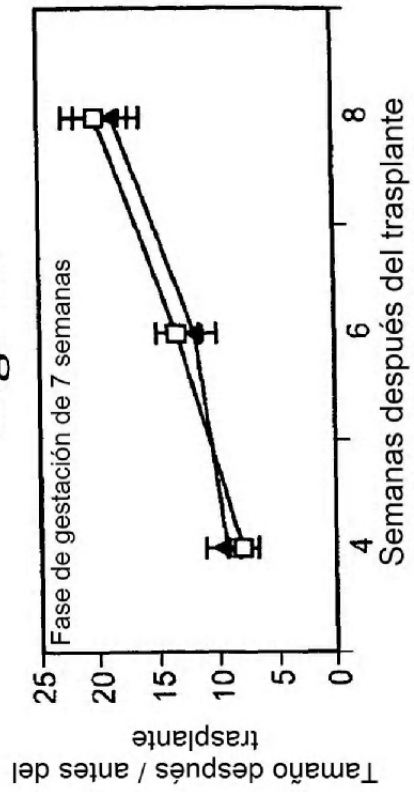


Fig. 4e



Fig. 4f



Fig. 4g



Fig. 4h



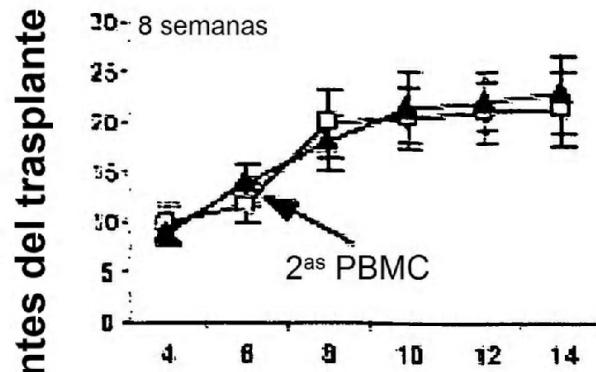


Fig. 5a

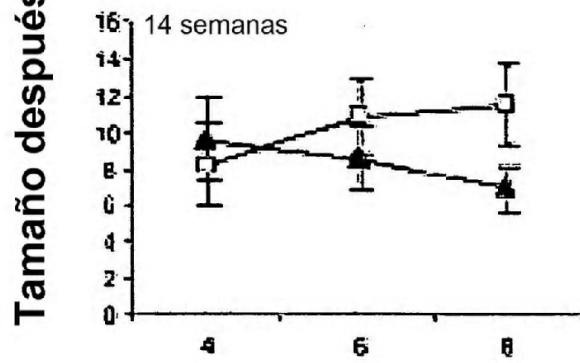


Fig. 5b

Semanas después del trasplante

Fig. 6a

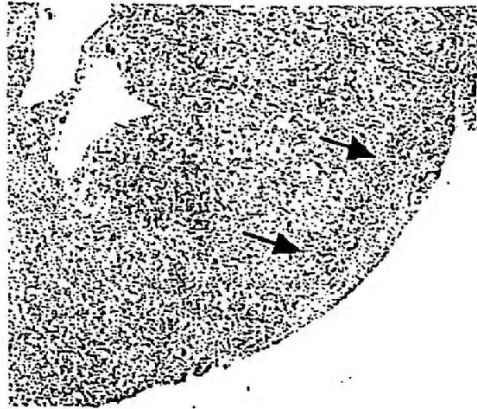


Fig. 6b

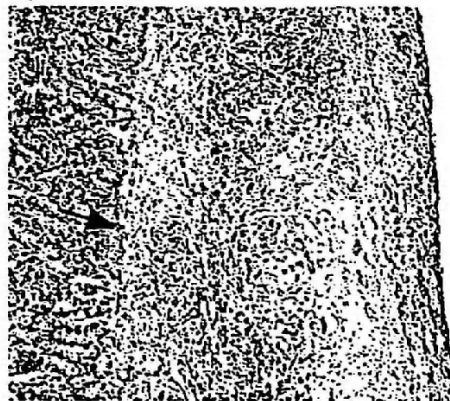


Fig. 6c

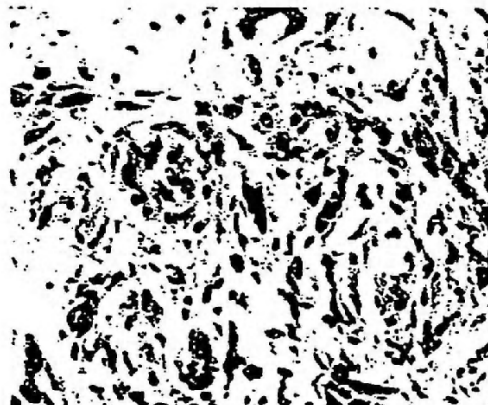


Fig. 7a

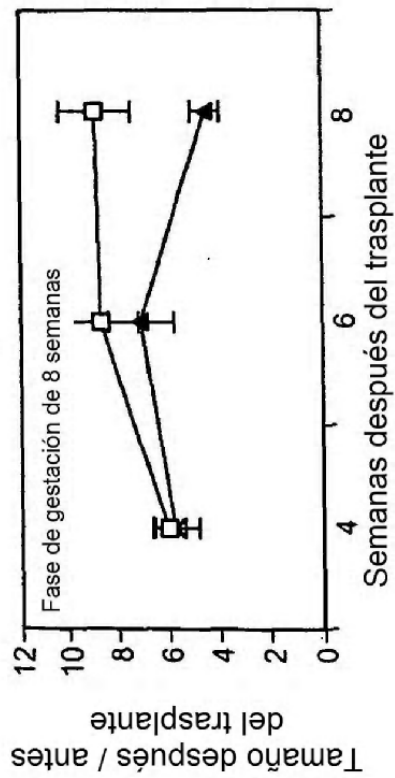


Fig. 7b

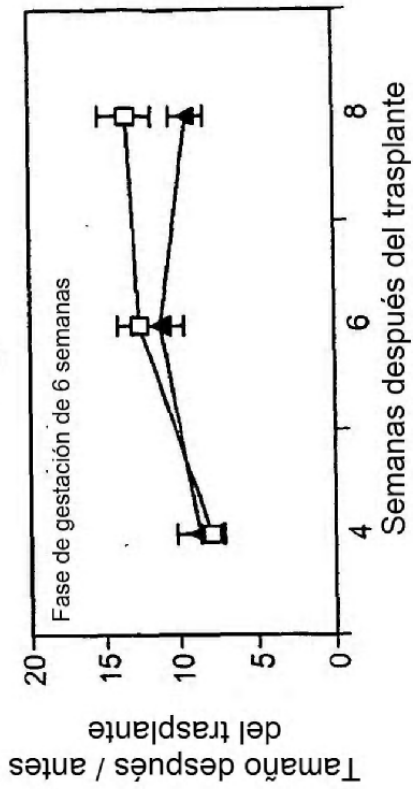


Fig. 7c

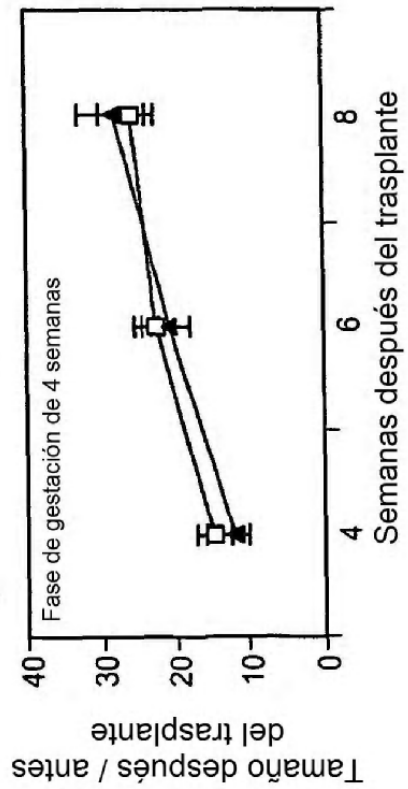


Fig. 7d

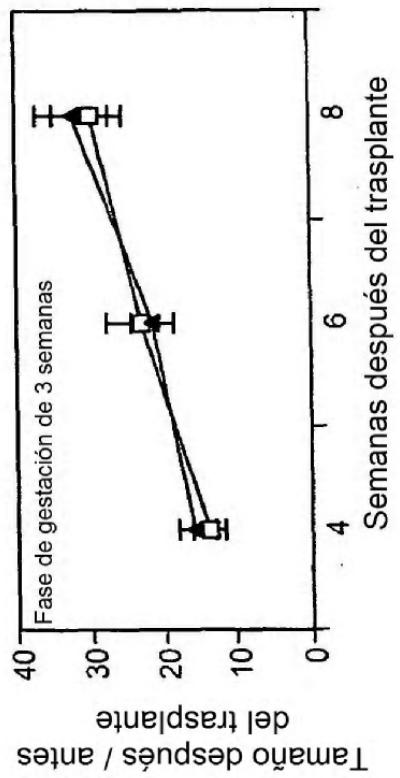


Fig. 8a

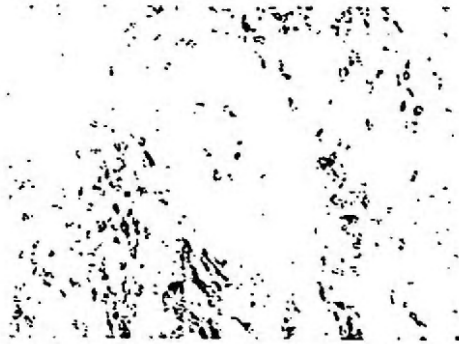


Fig. 8b

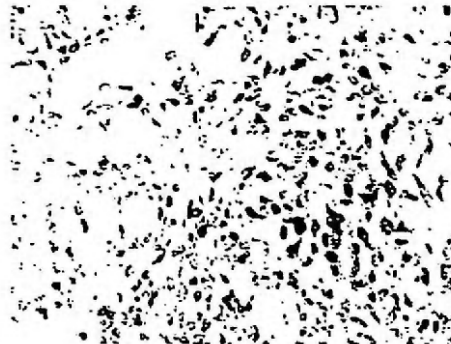


Fig. 8c

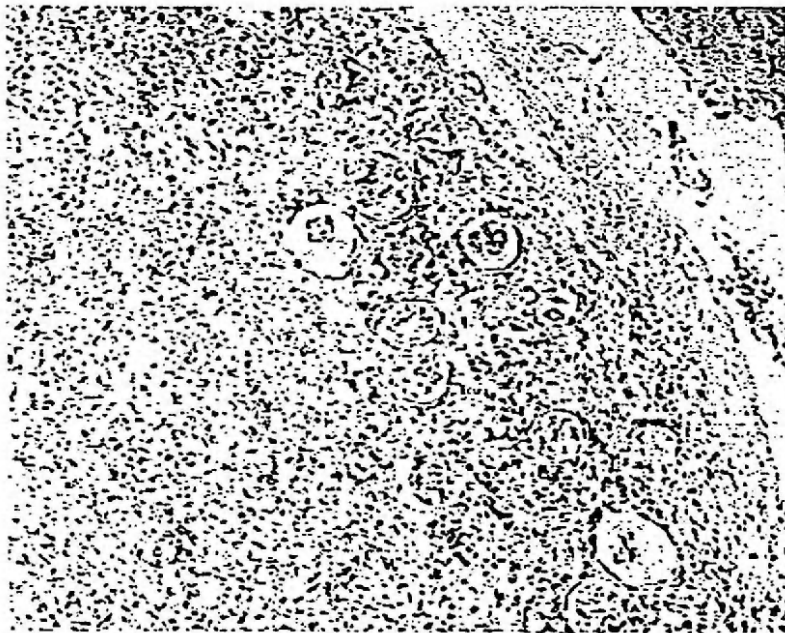
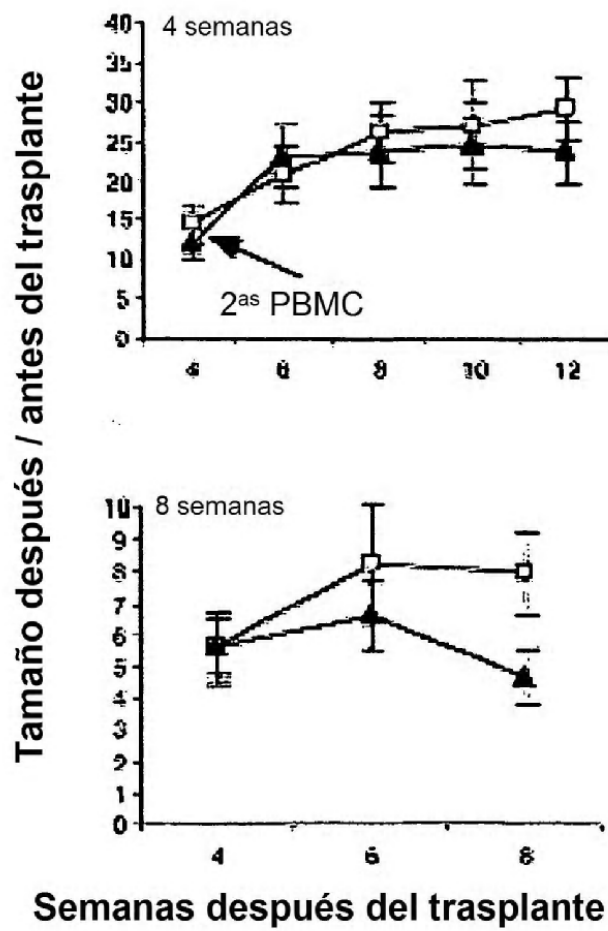


Fig. 9a



Fig. 9b



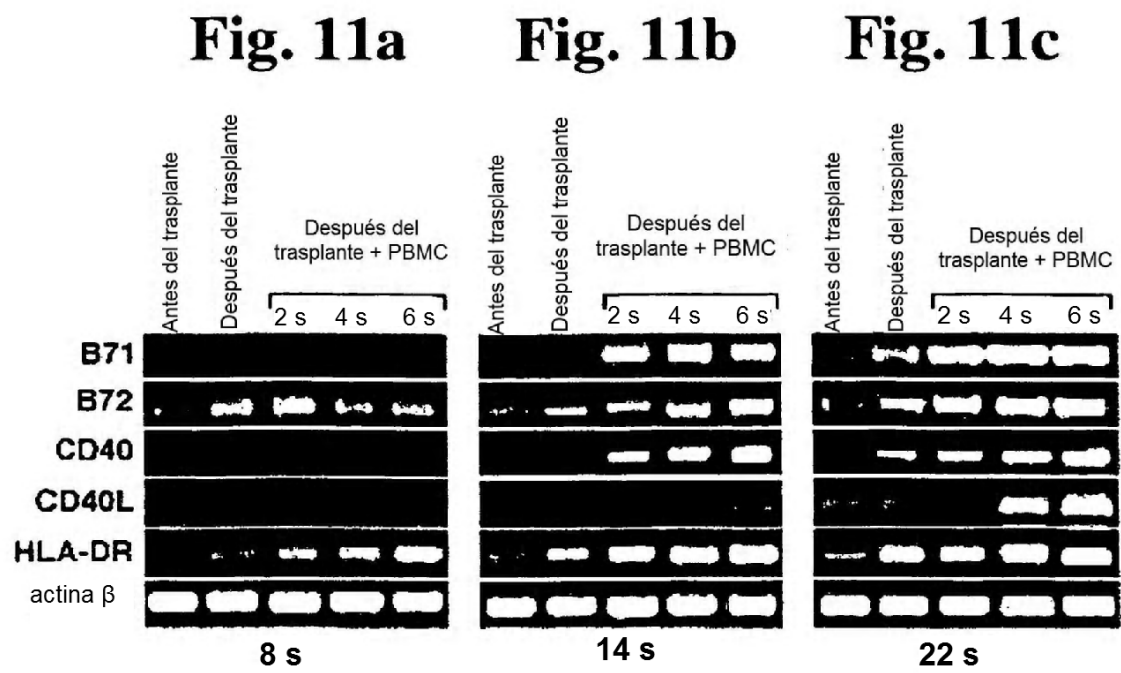


Fig. 12a

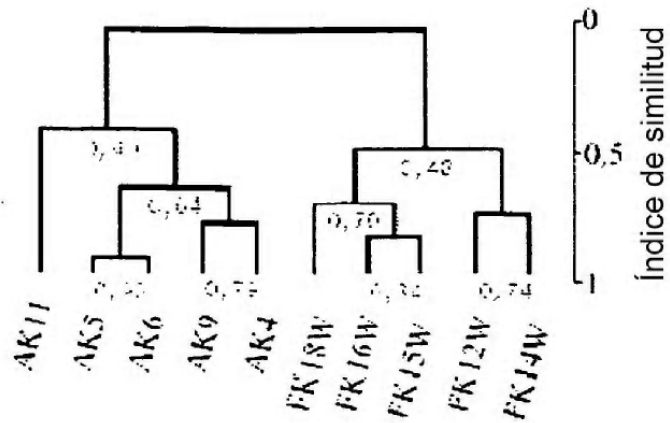


Fig. 12b



Fig. 12c

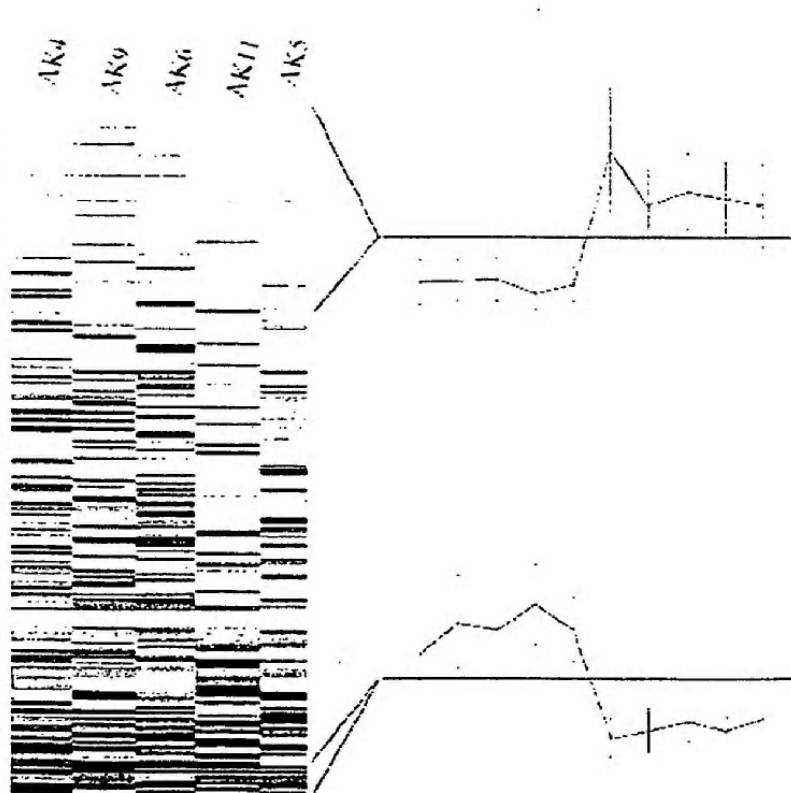


Fig. 13

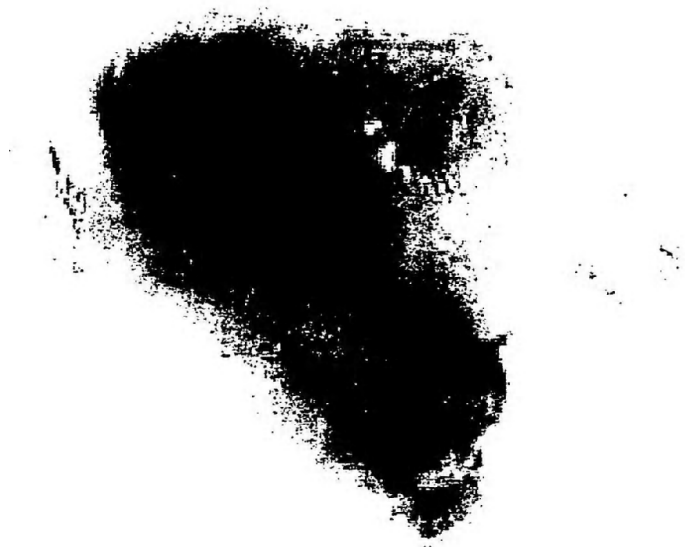


Fig. 14a

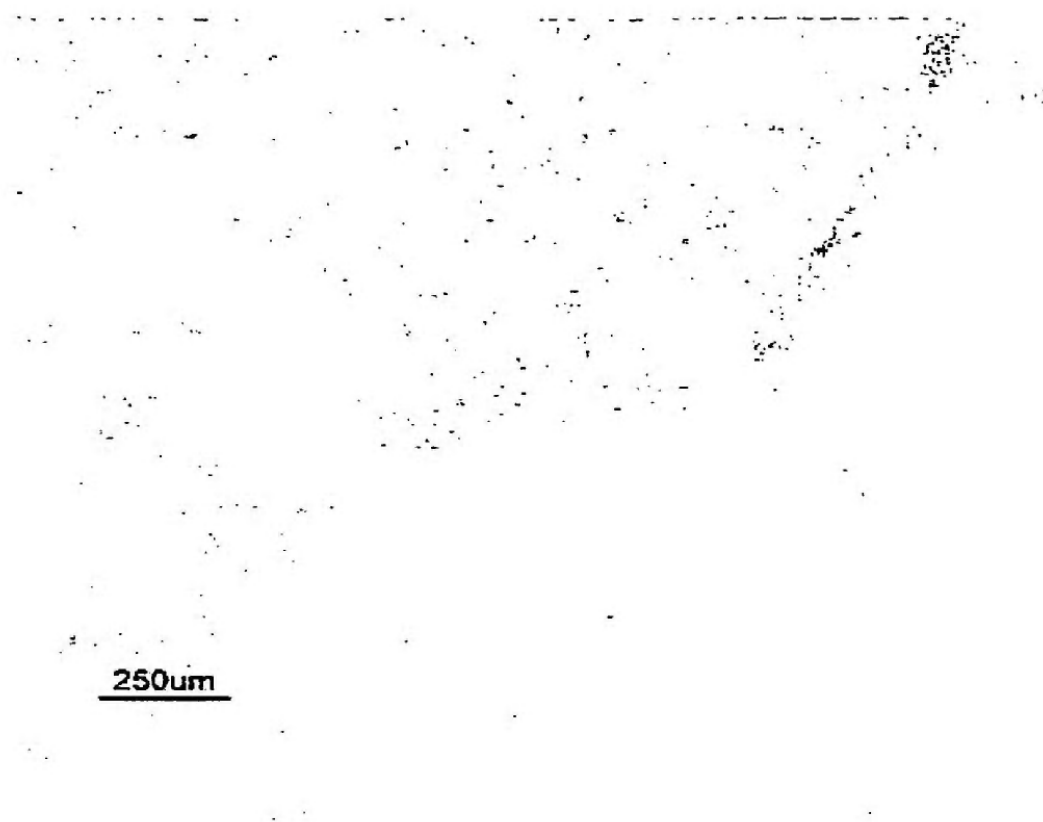


Fig. 14b

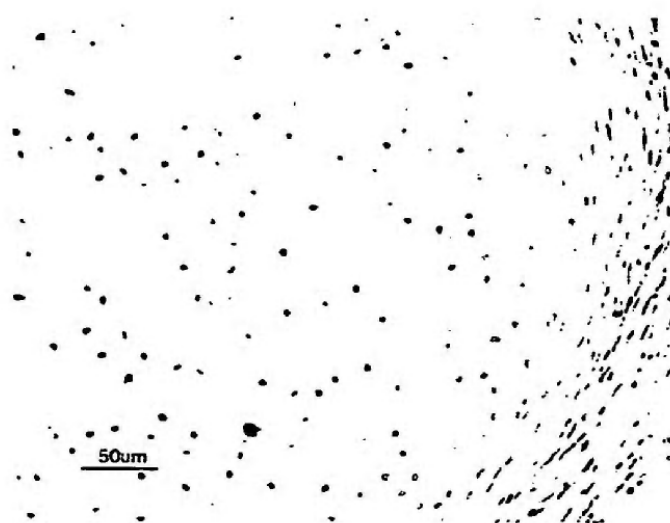


Fig. 15b



Fig. 15d



Fig. 15a



Fig. 15c



Fig. 16a

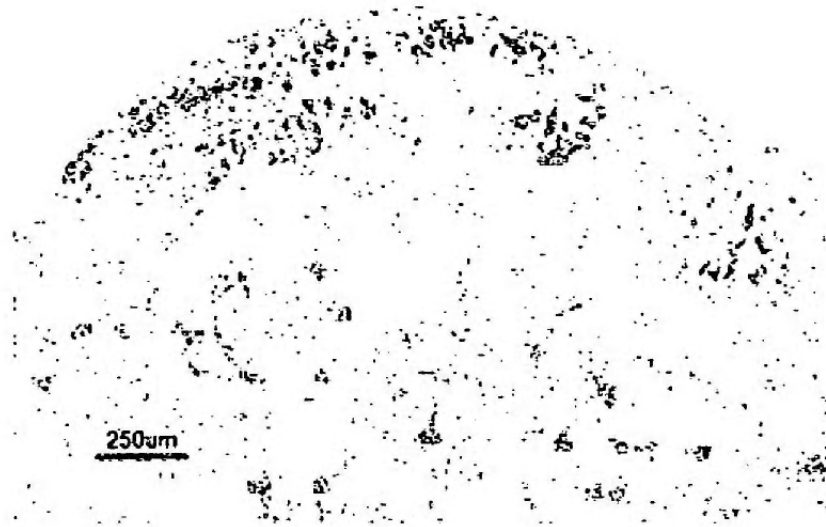


Fig. 16b



Fig. 17a

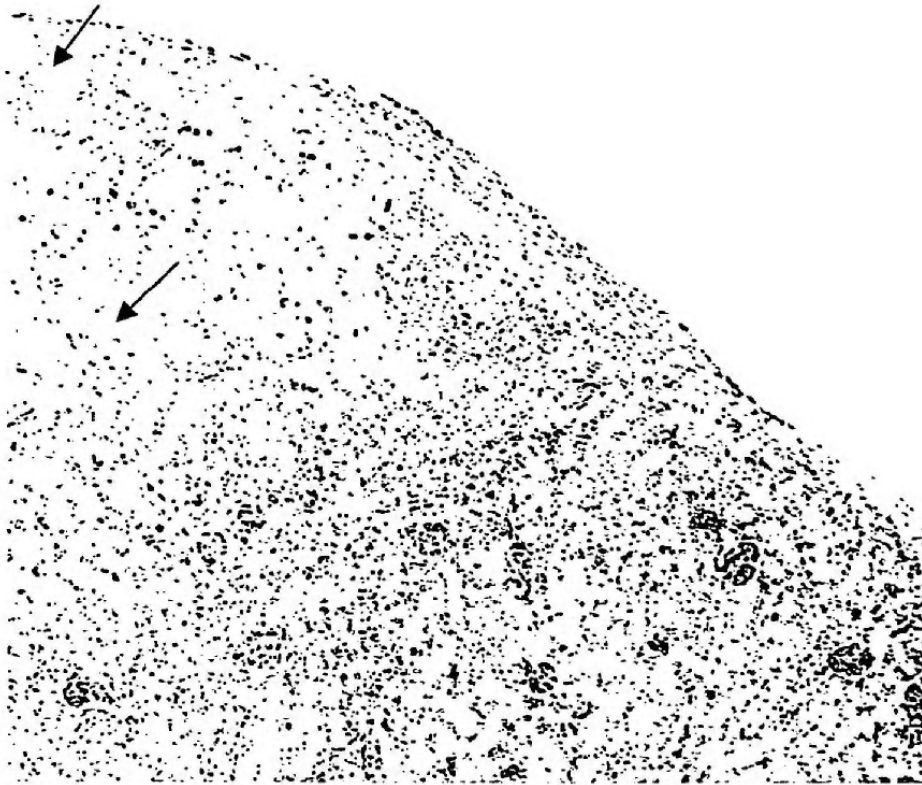


Fig. 17b

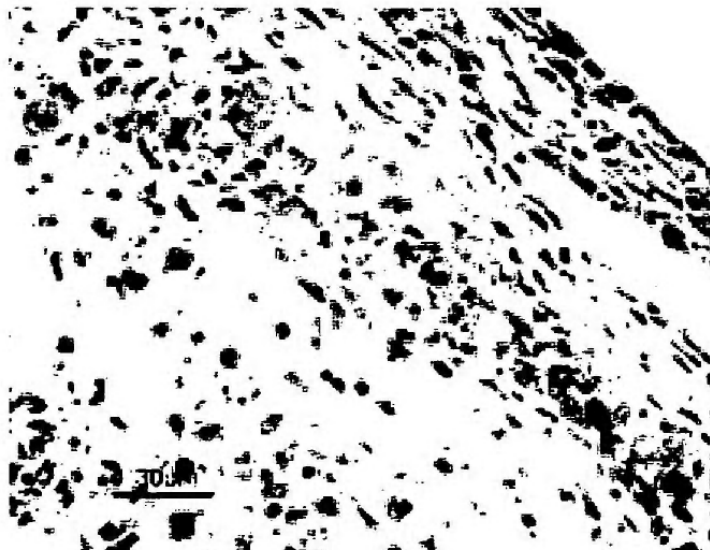


Fig. 18a



Fig. 18b

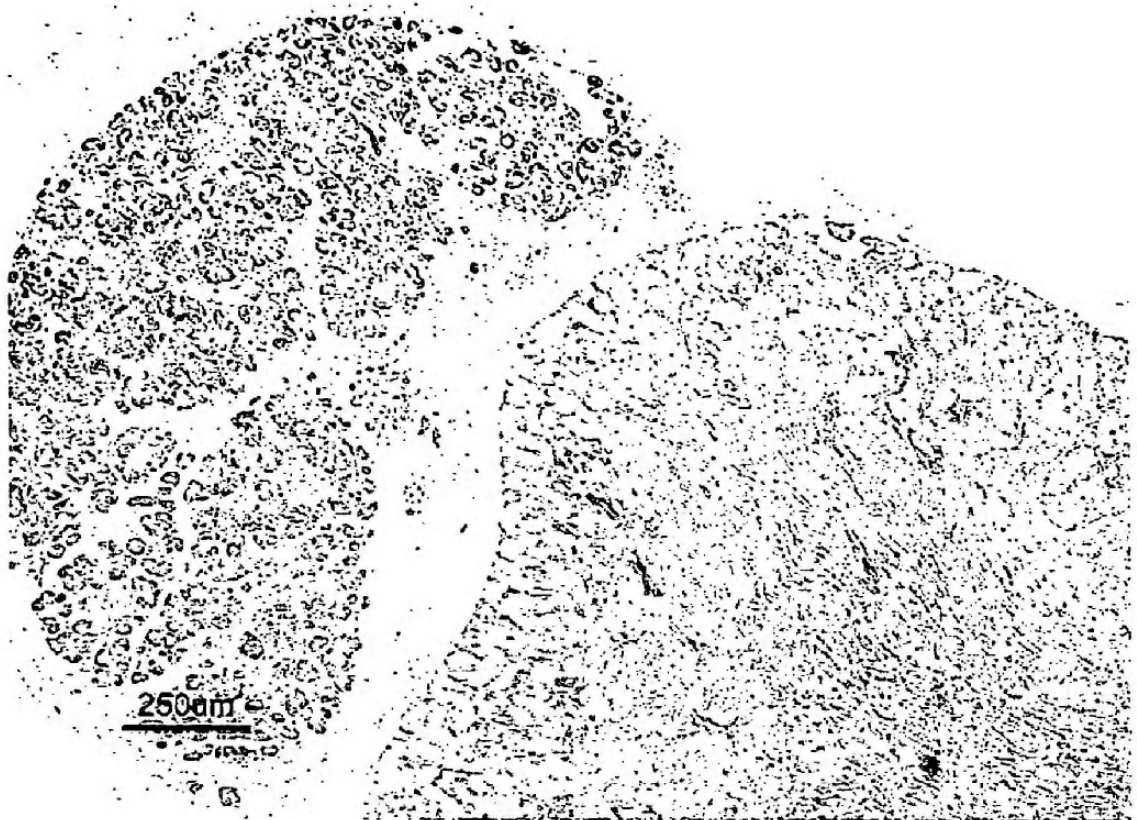


Fig. 18c

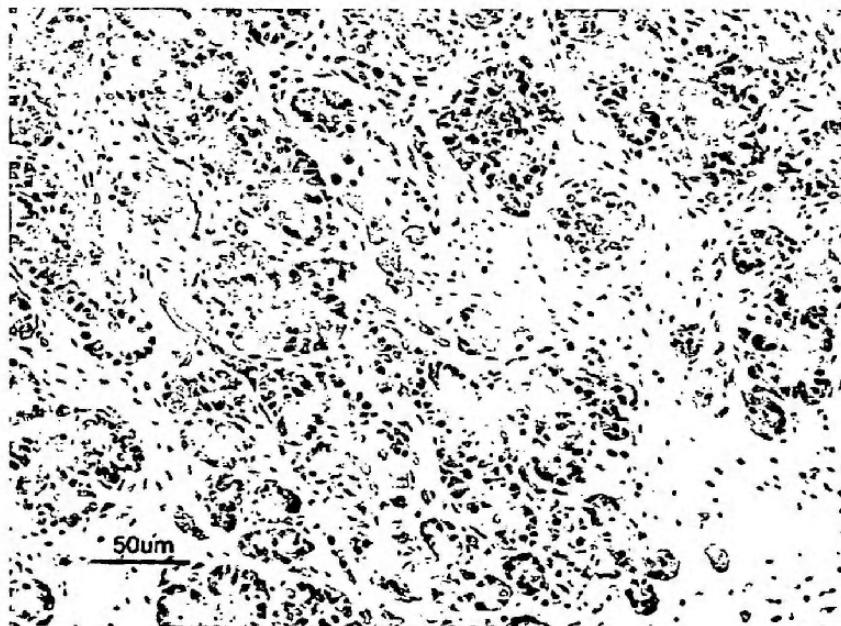


Fig. 19a



Fig. 19b



Fig. 19c



Fig. 20a

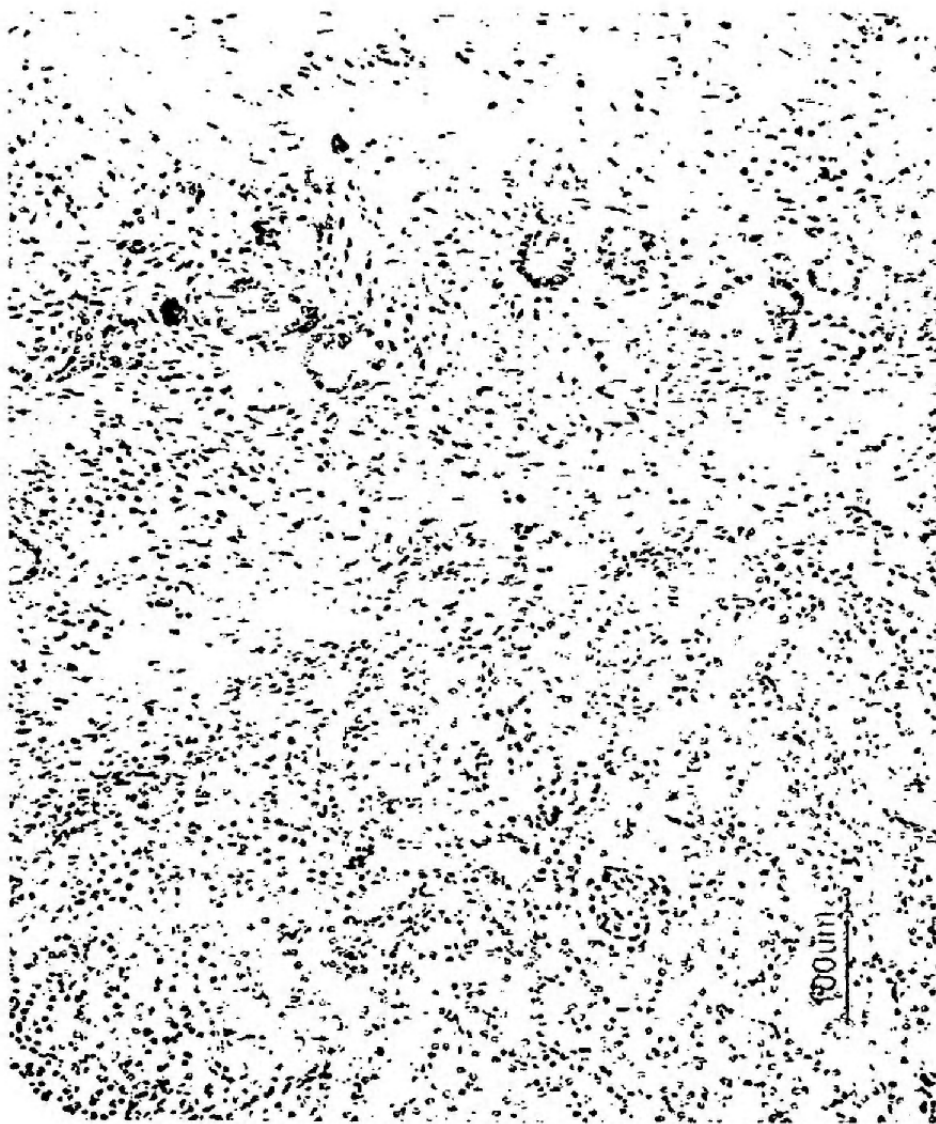


Fig. 20b

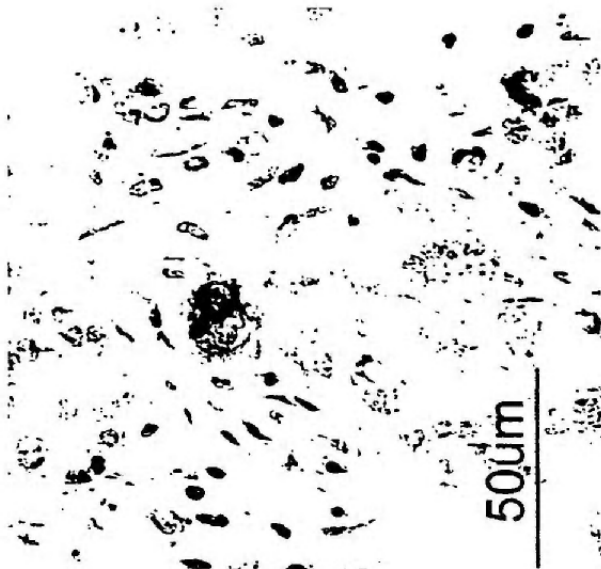


Fig. 20c

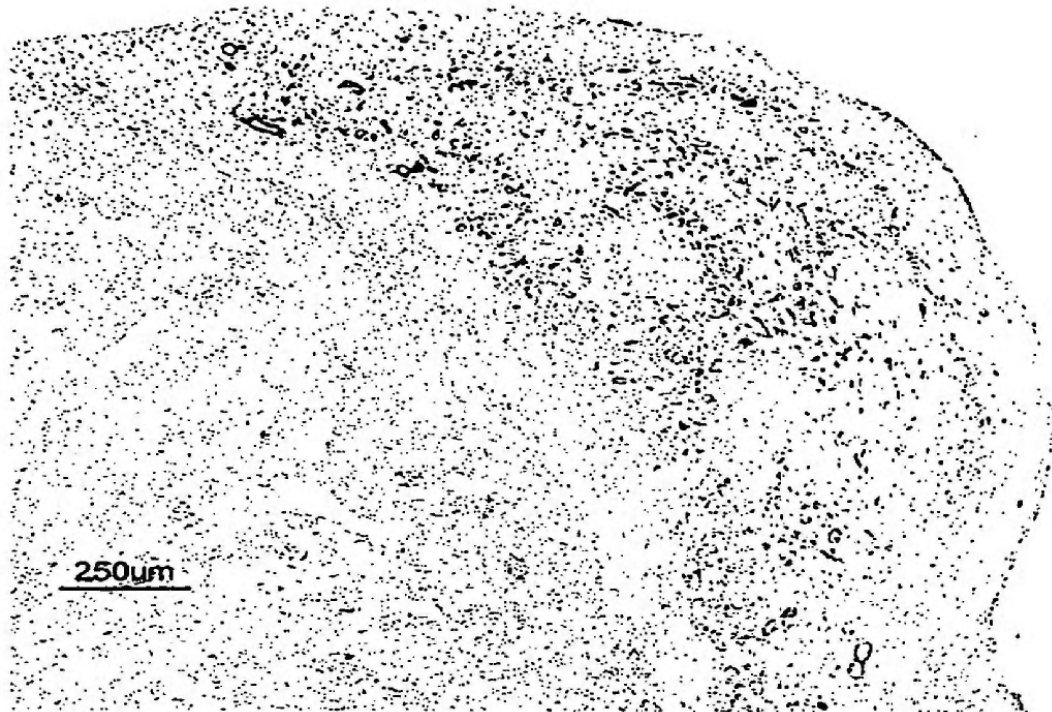


Fig. 20d



Fig. 21a

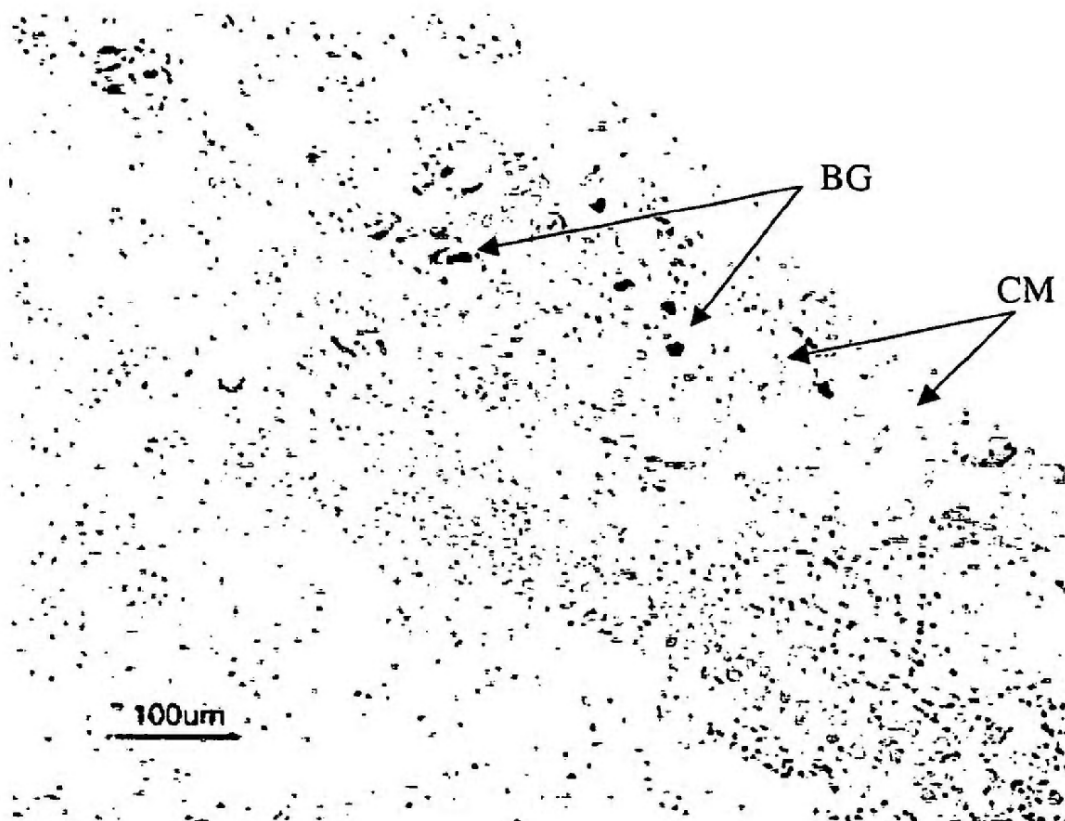


Fig. 21b



Fig. 21c

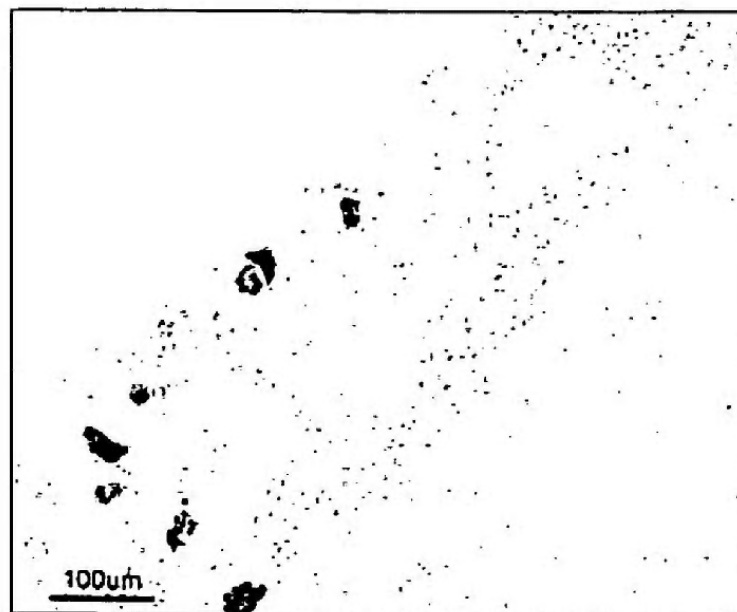


Fig. 22

