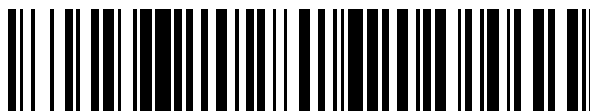


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 292**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 9/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.08.2003** **E 09015192 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.10.2016** **EP 2163614**

54 Título: **Animales porcinos que carecen de cualquier expresión de alfa 1,3 galactosiltransferasa funcional**

30 Prioridad:

21.08.2002 US 404775 P

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

19.04.2017

73 Titular/es:

**REVIVICOR, INC. (100.0%)
1700 KRAFT DRIVE, SUITE 2400
BLACKSBURG, VA 24060, US**

72 Inventor/es:

PHELPS, CAROL, J.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 609 292 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).

Animales porcinos que carecen de cualquier expresión de alfa 1,3 galactosiltransferasa funcional**DESCRIPCIÓN****5 CAMPO DE LA INVENCION**

La presente invención son animales, tejidos y órganos porcinos así como células y líneas celulares obtenidas de dichos animales, tejidos y órganos, que carecen de cualquier expresión de alfa 1,3 galactosiltransferasa (alfa1,3GT) funcional. Dichos animales, tejidos, órganos y células pueden usarse en investigación y en terapia médica, incluyendo en xenotransplante.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los pacientes con fallo orgánico en fase final requieren el transplante de órganos para su supervivencia. El factor limitante principal en el transplante clínico es la escasez de donantes humanos adecuados. A lo largo de los últimos diez años ha aumentado drásticamente la lista de espera de pacientes para órganos, desde aproximadamente 30.000 en 1991 hasta aproximadamente 80.000 en 2001 (fuente: La Red de Donantes de Órganos de Nueva York (New York Organ Donor Network); Estudio de Revisión del Registro de Muertes de la Asociación de Organizaciones para la Recuperación de Órganos (Association of Organ Procurement Organizations' Death Record Review Study) de 1997 a 1999, proporcionado por 30 organizaciones para la recuperación de órganos). A pesar de esta creciente necesidad a los largo de los últimos diez años, la cantidad de donaciones de órganos se ha mantenido fija (aproximadamente 20.000 por año).

De acuerdo con la Red Internacional de Distribución de Órganos (United Network for Organ Sharing) (UNOS) con fecha de 17 de julio de 2003, había 82.249 pacientes esperando transplantes de órganos en los Estados Unidos. La necesidad de órganos específicos es la siguiente:

Riñón	55.133
Hígado	17.304
Páncreas	1.413
Riñón y Páncreas	2.378
Intestino	173
Corazón	3.717
Corazón-Pulmón	184
Pulmón	3.912

En todo Estados Unidos, un promedio de 17 hombres, mujeres y niños de todas las razas y trasfondos étnicos mueren cada día por la ausencia de órganos donados, por tanto, cada año, mueren más de 6.200 americanos esperando un transplante de órgano. La necesidad de una fuente más fiable e ilimitada de órganos ha conducido a la investigación del potencial para transplante de órganos de otros animales, llamado xenotransplante.

Los cerdos se consideran la fuente más probable de órganos para xenoinjerto. El suministro de cerdos es abundante, los programas de reproducción están bien establecidos, y su tamaño y fisiología son compatibles con seres humanos. El xenotransplante, sin embargo, presenta su propia serie de problemas. El más significativo es el rechazo inmune. El primer obstáculo inmunológico es el "rechazo hiperagudo"(HAR). El HAR puede definirse por la presencia ubicua de elevados títulos de anticuerpos naturales preformados que se unen al tejido foráneo. Se cree que la unión de estos anticuerpos naturales a epítomos diana en el endotelio del órgano donante es el acontecimiento inicial en el HAR. Esta unión, en minutos desde la perfusión del órgano donante con la sangre del receptor, está seguido de activación del complemento, deposición de plaquetas y fibrina, y finalmente por edema intersticial y hemorragia en el órgano donante, todo lo cual causa fallo del órgano en el receptor (Strahan et al. (1996) Frontiers in Bioscience 1, e34-41).

Excepto para los monos del viejo mundo, los simios y los seres humanos, la mayoría de los mamíferos portan glucoproteínas en sus superficies celulares que contienen galactosa alfa 1,3-galactosa (Galili et al., J.Biol.Chem. 263: 17755-17762, 1988). Los seres humanos, los simios y los monos del viejo mundo tienen un anticuerpo anti-alfa gal de origen natural que se produce en elevada cantidad (Cooper et al., Lancet 342:682-683, 1993). Se une específicamente a glucoproteínas y glucolípidos que albergan galactosa alfa-1,3 galactosa.

En contraste, se encuentran glucoproteínas que contienen galactosa alfa 1,3-galactosa en grandes cantidades en células de otros mamíferos, tales como cerdos. Esta distribución diferencial del "epítipo alfa-1,3 GT" y anticuerpos anti-Gal (es decir, anticuerpos que se unen a glucoproteínas y glucolípidos que albergan galactosa alfa-1,3 galactosa) en mamíferos es el resultado de un proceso evolutivo que seleccionaba especies con alfa-1,3-galactosiltransferasa inactivada (es decir, mutada) en primates ancestrales del viejo mundo y seres humanos. Por

tanto, los seres humanos son "knockout naturales" de alfa1,3GT. Una consecuencia directa de este acontecimiento es el rechazo de xenoinjertos, tal como el rechazo de órganos de cerdo transplantados en seres humanos inicialmente mediante HAR.

Se han llevado a cabo una diversidad de estrategias para eliminar o modular la respuesta humoral anti-Gal causada por xenotransplante porcino, incluyendo la eliminación enzimática del epítipo con alfa-galactosidasas (Stone et al., Transplantation 63: 640-645, 1997), eliminación del anticuerpo anti-gal específico (Ye et al., Transplantation 58: 330-337, 1994), recubriendo el epítipo con otros restos de carbohidrato, que no lograron eliminar la expresión de alfa-1,3-GT (Tanemura et al., J.Biol.Chem. 27321: 16421-16425, 1998 y Koike et al., Xenotransplantation 4: 147-153, 1997) y la introducción de proteínas inhibidoras del complemento (Dalmasso et al., Clin.Exp.Immunol. 86: 31-35, 1991, Dalmasso et al. Transplantation 52:530-533 (1991)). C. Costa et al. (FASEB J 13, 1762 (1999)) informaron de que la inhibición competitiva de alfa-1,3-GT en cerdos transgénicos para la H-transferasa provocaba una reducción solamente parcial en las cantidades de epítipos. Asimismo, S. Miyagawa et al. (J Biol. Chem 276, 39310 (2001)) informaron de que intentos de bloquear la expresión de epítipos gal en cerdos transgénicos para la N-acetilglucosaminiltransferasa III también provocaron una reducción solamente parcial de las cantidades de epítipos gal y no lograron prolongar significativamente la supervivencia del transplante en receptores primates.

Se ha informado de knockouts de un único alelo del locus alfa-1,3-GT en células porcinas y animales vivos. Denning et al. (Nature Biotechnology 19: 559-562, 2001) informaron de la delección génica dirigida de un alelo del gen de la alfa-1,3-GT en ovejas. Harrison et al. (Transgenics Research 11:143-150, 2002) informaron de la producción de células fibroblásticas fetales porcinas somáticas knockout heterocigóticas para alfa-1,3-GT. En 2002, Lai et al. (Science 295: 1089-1092, 2002) y Dai et al. (Nature Biotechnology 20: 251-255, 2002) informaron de la producción de cerdos, en los que un alelo del gen de la alfa-1,3-GT se volvió satisfactoriamente inactivo. Ramsoondar et al. (Biol of Reproduc 69, 437-445 (2003)) informaron de la generación de cerdos knockout heterocigóticos para alfa-1,3-GT que también expresan la alfa-1,2-fucosiltransferasa humana (HT), que expresaban los epítipos tanto HT como alfa-1,3-GT.

La publicación PCT N° WO 94/21799 y la patente de Estados Unidos N° 5.821.117 del Austin Research Institute; la publicación PCT N° WO 95/20661 de Bresatec; y la publicación PCT N° WO 95/28412, la patente de Estados Unidos N° 6.153.428, la patente de Estados Unidos N° 6.413.769 y la publicación de Estados Unidos N° 2003/0014770 de BioTransplant, Inc. y The General Hospital Corporation proporcionan un análisis de la producción de células porcinas alfa-1,3-GT negativas en base al conocimiento del ADNc del gen de la alfa-1,3-GT (y sin el conocimiento de la organización o secuencia genómica). Sin embargo, no había evidencias de que dichas células realmente se produjeran antes de la fecha de presentación de estas solicitudes y los ejemplos son todos proféticos.

La primera descripción pública de la producción satisfactoria de una célula porcina alfa-1,3-GT negativa heterocigótica sucedió en julio de 1999 en la Lake Tahoe Transgenic Animal Conference (David Ayares, et al., PPL Therapeutics, Inc.). Antes de la presente invención, nadie había publicado o descrito públicamente la producción de una célula porcina alfa 1,3GT negativa homocigótica. Además, como no han estado disponibles hasta la fecha células madre embrionarias porcinas, no había y aún no hay modo de usar una célula madre embrionaria homocigótica para alfa-1,3-GT para intentar preparar un cerdo knockout para alfa-1,3-GT homocigótico vivo.

El 27 de febrero de 2003, Sharma et al. (Transplantation 75:430-436 (2003)) publicaron un informe que demuestra una producción satisfactoria de células fibroblásticas de cerdo fetales homocigóticas para la eliminación del gen de la alfa-1,3-GT.

La publicación PCT N° WO 00/51424 de PPL Therapeutics describe la modificación genética de células somáticas para transferencia nuclear. Esta solicitud de patente describe la alteración genética del gen de la alfa-1,3-GT en células somáticas porcinas, y el posterior uso del núcleo de estas células que carecen de al menos una copia del gen de la alfa-1,3-GT para transferencia nuclear.

La patente de Estados Unidos N° 6.331.658 de Cooper y Koren reivindica pero no confirma ninguna producción real de mamíferos diseñados por ingeniería genética que expresen una proteína sialiltransferasa o fucosiltransferasa. La patente afirma que los mamíferos diseñados por ingeniería genética mostrarían una reducción de epítipos proteicos galactosilados sobre la superficie celular del mamífero.

La publicación PCT N° WO 03/055302 de The Curators of the University of Missouri confirma la producción de cerdos miniatura knockout para alfa 1,3GT heterocigóticos para su uso en xenotransplante. Esta solicitud está dirigida en líneas general a cerdos knockout que incluyen un gen de la alfa-1,3-GT alterado, donde la expresión de alfa-1,3-GT funcional en los cerdos knockout está *disminuida* en comparación con el tipo silvestre. Esta solicitud no proporciona ninguna directriz en cuanto a qué grado debe *disminuirse* la alfa-1,3-GT de modo que los cerdos sean útiles para xenotransplante. Además, esta solicitud no proporciona ninguna prueba de que los cerdos heterocigóticos que se estaban produciendo mostraran una expresión *disminuida* de alfa1,3GT funcional. Además, aunque la solicitud se refiere a cerdos knockout para alfa 1,3GT homocigóticos, no hay evidencias en la solicitud de que

realmente se estuviera produciendo alguno o se pudiera producir, mucho menos si la descendencia resultante sería viable o fenotípicamente útil para xenotransplante.

La eliminación total de las glucoproteínas que contienen galactosa alfa 1,3-galactosa es claramente el mejor enfoque para la producción de animales porcinos para xenotransplante. Teóricamente es posible que knockout dobles, o la alteración de ambas copias del gen de la alfa 1,3GT, pudiera producirse por dos métodos: 1) apareamiento de dos animales knockout de un único alelo para producir descendientes, en cuyo caso, se pronosticaría en base a la genética mendeliana que uno de cada cuatro sería knockout doble o 2) modificación genética del segundo alelo en una célula con una única eliminación pre-existente. De hecho, esto ha sido bastante difícil, como se ilustra por el hecho de que aunque la primera solicitud de patente de células porcinas knockout se presentó en 1993, el primer cerdo knockout para alfa 1,3GT homocigótico no se produjo hasta julio de 2002 (que se basó en el trabajo del presente inventor y se describe en este documento).

Los ratones transgénicos (no cerdos) han sido históricamente el modelo preferido para estudiar los efectos de modificaciones genéticas sobre la fisiología de los mamíferos, por varias razones, de las cuales que hayan estado disponibles células madre embrionarias de ratón mientras que las células embrionarias porcinas no han estado disponibles no es la mínima. Los ratones son animales ideales para aplicaciones de investigación básica porque son relativamente fáciles de manipular, se reproducen rápidamente, y pueden manipularse genéticamente a nivel molecular. Los científicos usan los modelos de ratón para estudiar las patologías moleculares de una diversidad de enfermedades basadas genéticamente, desde cáncer de colon hasta retraso mental. Se han creado miles de ratones modificados genéticamente hasta la fecha. Se ha creado una "base de datos de knockout y mutación en el ratón" (Mouse Knockout and Mutation Database) por BioMedNet para proporcionar una base de datos extensa de información fenotípica y genotípica sobre knockouts y mutaciones clásicas en ratones (<http://research.bmn.com/mkmd>; Brandon et al. Current Biology 5[7]:758-765(1995); Brandon et al. Current Biology 5[8]:873-881 (1995)), esta base de datos proporciona información sobre más de 3.000 genes únicos, que se han modificado de forma dirigida en el genoma del ratón hasta la fecha.

En base a esta experiencia extensiva con ratones, se ha aprendido que la tecnología transgénica tiene algunas limitaciones significativas. A causa de los defectos en el desarrollo, muchos ratones modificados genéticamente, especialmente ratones nulos creados por tecnología de eliminación (knockout) de genes mueren como embriones antes de que el investigador tenga oportunidad de usar el modelo para experimentación. Incluso si los ratones sobreviven, pueden desarrollar fenotipos significativamente alterados, que pueden volverlos gravemente discapacitados, deformados o debilitados (Pray, Leslie, The Scientist 16 [13]: 34 (2002); Smith, The Scientist 14[15]:32, (2000); Brandon et al. Current Biology 5[6]:625-634 (1995); Brandon et al. Current Biology 5[7]:758-765 (1995); Brandon et al. Current Biology 5[8]:873-881 (1995); <http://research.bmn.com/mkmd>) Además, se ha aprendido que no es posible predecir si un gen dado desempeña o no un papel crítico en el desarrollo del organismo y, por tanto, si la eliminación del gen provocará un fenotipo letal o alterado, hasta que se haya creado satisfactoriamente el knockout y se haya producido descendencia viable.

Se han modificado genéticamente ratones para eliminar la expresión de alfa-1,3-GT funcional. Se han producido ratones knockout dobles para alfa-1,3-GT. Son viables embriológicamente y tiene órganos normales (Thall et al. J Biol Chem 270:21437-40 (1995); Tearle et al. Transplantation 61:13-19 (1996), véase también la patente de Estados Unidos Nº 5.849.991). Sin embargo, fueron evidentes dos anomalías fenotípicas en estos ratones. Primero, todos los ratones desarrollan cataratas corticales densas. Segundo, la eliminación de ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT afectaba significativamente al desarrollo de los ratones. El apareamiento de ratones heterocigóticos para el gen de la alfa-1,3-GT produjo proporciones genotípicas que se desviaron significativamente de la proporción mendeliana 1:2:1 predicha (Tearle et al. Transplantation 61:13-19 (1996)).

Los cerdos tienen un nivel de glucoproteínas de superficie celular que contienen galactosa alfa 1,3-galactosa que es 100-1000 veces mayor que el encontrado en ratones. (Sharma et al. Transplantation 75:430-436 (2003); Galili et al. Transplantation 69:187-190 (2000)). Por tanto, la actividad alfa 1,3-GT es más crítica y más abundante en el cerdo que en el ratón.

A pesar de las predicciones y las afirmaciones proféticas, antes de esta invención, nadie sabía si la alteración de ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT sería letal o afectaría al desarrollo porcino o provocaría un fenotipo alterado (Ayares et al. Graft 4(1):80-85 (2001); Sharma et al. Transplantation 75:430-436 (2003); Porter y Dallman Transplantation 64:1227-1235 (1997); Galili, U. Biochimie 83:557-563 (2001)). De hecho, muchos expertos en el campo expresaron serias dudas acerca de si cerdos knockout para alfa-1,3-GT homocigóticos serían del todo viables, mucho menos si se desarrollarían normalmente. Dichas preocupaciones se expresaron hasta que se produjo el cerdo knockout doble de la presente invención. A continuación se incluyen ejemplos de afirmaciones por los que actualmente trabajan en el campo.

"El epítipo alfa-gal expresado abundantemente puede tener algunos papeles biológicos en el desarrollo del cerdo, tales como en la interacción célula-célula. Si la suposición es correcta, puede que los cerdos no se desarrollen en ausencia de este epítipo (Galili, U. Biochimie 83:557-563 (2001))."

"La incapacidad de generar cerdos knockout para alfa-gal puede sugerir que los epítomos alfa-gal son indispensables en esta especie (Galili et al. Transplantation 69:187-190 (2000))."

"Aunque los ratones knockout doble para alfa-gal pueden desarrollarse y mantenerse bastante normales, existe la posibilidad de que la delección de esta enzima tenga consecuencias más graves en otros animales (Porter y Dallman Transplantation 64:1227-1235 (1997))."

"Es posible que el cerdo GT(-/-) pueda no ser viable a causa de que el gen GT es esencial para el desarrollo embrionario. Una respuesta a esta cuestión y a la relevancia de cerdos GT(-/-) para la búsqueda de xenotransplantes debe esperar, si es posible, a la producción de los cerdos apropiados (Sharma et al. Transplantation 75:430-436 (2003))."

"Como la expresión del epítipo Gal en los órganos del cerdo es hasta 500 veces mayor que en los órganos del ratón, existe la posibilidad de que la actividad alfaGT sea más crucial para el cerdo y podría afectar al desarrollo de estos cerdos (Ayares et al. Graft 4(1)80-85 (2001))."

Por tanto, hasta que no se produzca un cerdo knockout doble para la alfa-1,3-GT viable, de acuerdo con los especialistas en la técnica actuales, no será posible determinar (i) si la descendencia sería viable o (ii) si la descendencia presentaría un fenotipo que permita el uso de los órganos para el transplante en seres humanos.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar cerdos viables que carezcan de cualquier expresión de alfa1,3GT funcional.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar células, tejidos y órganos porcinos, que carezcan de cualquier expresión de alfa1,3GT funcional, para su uso en xenotransplante u otras aplicaciones biomédicas.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para seleccionar y detectar células porcinas, que carezcan de los epítomos galactosa alfa 1,3-galactosa sobre la superficie celular.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La invención es la producción de los primeros cerdos vivos que carecen de cualquier expresión funcional de alfa 1,3 galactosiltransferasa. El objeto de esta invención se anunció a página completa en la revista Science en 2003 (Phelps et al. (Science 299:411-414 (2003)) y se presentó ampliamente en la prensa como un gran avance en xenotransplante.

Se ha demostrado por primera vez que puede producirse un animal porcino viable que carece de cualquier expresión de alfa 1,3 galactosiltransferasa funcional. La presente invención proporciona la inactivación completa de ambos alelos del gen de la alfa 1,3 galactosiltransferasa en cerdos, superando de este modo este antiguo obstáculo y haciendo del xenotransplante una realidad. La eliminación de este gen, que provoca la ausencia de epítomos galactosa alfa 1,3-galactosa sobre la superficie celular, representa la etapa primera y principal en la eliminación del rechazo hiperagudo en terapia de xenotransplante cerdo-a-ser humano. La invención también proporciona órganos, tejidos, y células obtenidos de dichos animales porcinos, que son útiles para xenotransplante.

En realizaciones de la presente invención, los alelos del gen de la alfa-1,3-GT se vuelven inactivos, donde un alelo se vuelve inactivo a través de al menos una mutación puntual, de modo que la enzima alfa-1,3-GT resultante ya no puede generar galactosa alfa 1,3-galactosa sobre la superficie celular. En una realización, el gen de la alfa-1,3-GT puede transcribirse en ARN, pero no puede traducirse en proteína. En otra realización, el gen de la alfa-1,3-GT puede transcribirse en una forma truncada inactiva. Dicho ARN truncado puede no traducirse o puede traducirse en una proteína no funcional. En una realización alternativa, el gen de la alfa-1,3-GT puede inactivarse de tal modo que no suceda transcripción del gen. En una realización adicional, el gen de la alfa-1,3-GT puede transcribirse y después traducirse en una proteína no funcional.

En otra realización, los cerdos que carecen de cualquier expresión de alfa-1,3-GT funcional son útiles para proporcionar una evaluación más clara de los enfoques actualmente en desarrollo enfocados a superar los mecanismos de rechazo retardado y crónico potenciales en xenotransplante porcino.

En un aspecto de la presente invención, se proporcionan animales porcinos en los que al menos un alelo del gen de la alfa-1,3-GT puede inactivarse mediante un acontecimiento de modificación genética dirigida. En otra realización de la presente invención, ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT se inactivan mediante un acontecimiento de modificación genética dirigida. El gen puede modificarse de forma dirigida mediante recombinación homóloga. En otras realizaciones, el gen puede alterarse, es decir, puede alterarse una parte del código genético, afectando de este modo a la transcripción y/o traducción de ese segmento del gen. Por ejemplo, puede suceder una alteración de un gen a través de técnicas de sustitución, delección ("knockout") o inserción

("knockin"). Pueden insertarse genes adicionales para una proteína deseada o una secuencia reguladora que module la transcripción de una secuencia existente.

Los cerdos que tienen dos alelos inactivos del gen de la alfa-1,3-GT no son de origen natural. La frecuencia predicha de incidencia de dicho cerdo estaría en el intervalo de 10^{-10} a 10^{-12} , y nunca se ha identificado.

Como un aspecto de la invención, sorprendentemente se descubrió que mientras se intentaba eliminar el segundo alelo del gen de la alfa-1,3-GT a través de un acontecimiento de modificación genética dirigida, se identificó una mutación puntual, que volvía al segundo alelo inactivo. Los cerdos que portan mutaciones puntuales en el gen de la alfa-1,3-GT están libres de genes de resistencia a antibióticos y por tanto tienen el potencial de crear un producto más seguro para uso humano. Por tanto, el cerdo de la invención puede ser un knockout homocigótico para alfa-1,3-GT que no tiene genes de resistencia a antibióticos u otros genes marcadores de selección. En una realización, esta mutación puntual puede suceder mediante un acontecimiento de modificación genética dirigida. En otra realización, esta mutación puntual puede suceder de forma natural. En una realización adicional, pueden inducirse mutaciones en el gen de la alfa-1,3-GT mediante un agente mutagénico.

En una realización específica, la mutación puntual puede ser una mutación T-a-G en la segunda base del exón 9 del gen de la alfa-1,3-GT (Figura 2). En otras realizaciones, pueden existir al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos diez o al menos veinte mutaciones puntuales para volver al gen de la alfa-1,3-GT inactivo. En otras realizaciones, se proporcionan cerdos en los que ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT contienen mutaciones puntuales que evitan cualquier expresión de alfa1,3GT funcional. En una realización específica, se proporcionan cerdos que contienen la mutación T-a-G en la segunda base del exón 9 en ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT (Figura 2).

Otro aspecto de la presente invención proporciona un animal porcino, en el que ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT están inactivados, por la cual se inactiva un alelo mediante una mutación puntual. En una realización, se proporciona un animal porcino, en el que ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT están inactivados, por la cual se inactiva un alelo por un acontecimiento de modificación genética dirigida y el otro alelo se inactiva debido a la presencia de una mutación puntual T-a-G en la segunda base del exón 9. En una realización específica, se proporciona un animal porcino, en el que ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT están inactivados, por la cual se inactiva un alelo mediante una construcción de modificación dirigida al Exón 9 (véase, por ejemplo, la Figura 6) y el otro alelo se inactiva debido a la presencia de una mutación puntual T-a-G en la segunda base del exón 9 (Figura 2). La modificación dirigida, por ejemplo, también puede dirigirse al exón 9, y/o los exones 4-8.

En una realización adicional, un alelo se inactiva por un acontecimiento de modificación genética dirigida y el otro alelo se inactiva debido a la presencia de una mutación puntual T-a-G en la segunda base del exón 9 del gen de la alfa-1,3-GT. En una realización específica, un alelo se inactiva mediante una construcción de modificación dirigida al Exón 9 (véase, por ejemplo, la Figura 6) y el otro alelo se inactiva debido a la presencia de una mutación puntual T-a-G en la segunda base del exón 9 del gen de la alfa-1,3-GT. En la presente se describe un método para clonar dichos cerdos que incluye: enuclear un ovocito no humano, fusionar el ovocito con un núcleo donante de una célula porcina que carece de expresión de alfa1,3GT funcional, e implantar el embrión obtenido por transferencia nuclear en una madre no humana sustituta.

En la presente se describe un método para producir cerdos viables que carezcan de cualquier expresión de alfa-1,3-GT funcional puede incluir cruzar un cerdo macho heterocigótico para el gen de la alfa-1,3-GT con un cerdo hembra heterocigótico para el gen de la alfa-1,3-GT. Los cerdos pueden ser heterocigóticos debido a la modificación genética de un alelo del gen de la alfa-1,3-GT para evitar la expresión de ese alelo. Los cerdos pueden ser heterocigóticos debido a la presencia de una mutación puntual en un alelo del gen de la alfa-1,3-GT. La mutación puntual puede ser una mutación puntual T-a-G en la segunda base del exón 9 del gen de la alfa-1,3-GT. Un método para producir un animal porcino que carezca de cualquier expresión de alfa-1,3-GT funcional puede incluir cruzar un cerdo macho que contiene una mutación puntual T-a-G en la segunda base del exón 9 del gen de la alfa-1,3-GT con un cerdo hembra que contiene una mutación puntual T-a-G en la segunda base del exón 9 del gen de la alfa-1,3-GT, o viceversa.

La invención también proporciona un célula, tejido u órgano que se puede obtener de un cerdo de la invención para su uso en xenotrasplante como un suplemente o reemplazo in vivo o ex vivo para células recipientes, líneas celulares, tejido u órganos.

También se describe en la presente un método para determinar si células porcinas expresan galactosa alfa-1,3 galactosa sobre la superficie celular. El procedimiento de selección puede basarse en una toxina bacteriana para seleccionar células que carecen de la expresión de galactosa alfa-1,3-galactosa. La toxina bacteriana, toxina A producida por Clostridium difficile puede usarse para seleccionar para dichas células. La exposición a la toxina de C. difficile puede causar el redondeo de las células que muestran este epítipo sobre su superficie, liberando las células de la matriz de la placa. Tanto las eliminaciones génicas por modificación dirigida como las mutaciones que inutilizan la función o la expresión de la enzima pueden detectarse usando este método de selección. Las células que carecen

de expresión en la superficie celular de la galactosa alfa 1,3-galactosa, identificadas usando la selección mediada por toxina A descrita, o producidas usando métodos convencionales de inactivación génica incluyendo modificación génica dirigida, pueden usarse después para producir cerdos que carezcan de la expresión de alfa1,3GT funcional.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **Figura 1** es un gráfico que representa los efectos líticos relativos del complemento sobre células de fetos 680B1-4.

La **Figura 2** representa un corto segmento de la región codificante del gen de la alfa-1,3-GT (véase el N° de acceso a GenBank L36152) en el que existe la mutación puntual seleccionada por la toxina A. La secuencia superior existe en el tipo silvestre; la secuencia inferior muestra el cambio debido a la mutación puntual en el segundo alelo.

La **Figura 3** es una representación de un modelo tridimensional del sitio de unión a UDP de la alfa1,3GT bovina. El anillo aromático del resto de tirosina (primer plano, blanco) puede observarse muy cerca de la base de uracilo del UDP (escala de grises).

La **Figura 4** es una fotografía de cerdos clonados deficientes en alfa-1,3-GT homocigóticos producidos por los métodos de la invención, nacidos el 25 de julio de 2002.

La **Figura 5** es un gráfico que representa los niveles de IgM anti-alfa-1,3-gal antes y después de inyecciones de grupos celulares tipo islote (ICC) de lechones en ratones alfa-1,3-GT KO. Cada ratón recibió tres inyecciones en serie de ICC vía i.p. (200-500 ICC por inyección) durante 4 días. Los tres receptores de ICC de lechón tipo silvestre (WT) mostraron una elevación significativa del título de IgM anti-alfa 1,3 gal y posterior retorno a la medida inicial 4 semanas después de los implantes de ICC. Los sueros de los tres ratones inyectados con ICC de lechón alfa-1,3-GT DKO mantuvieron valores basales bajos de título de IgM anti-alfa-1,3-gal durante el tiempo de observación de 35 días (Phelps et al., Science 299: 411-414, 2003, figura S4).

La **Figura 6** es un diagrama del locus alfa-1,3-GT porcino, correspondiente a las secuencias genómicas de alfa-1,3-GT que pueden usarse como brazos 5' y 3' en vectores knockout de alfa-1,3-GT, y la estructura del locus modificado de forma dirigida después de recombinación homóloga. Los nombres y las posiciones de los cebadores usados para la PCR 3' y la PCR de largo alcance se indican por flechas cortas. La barra corta indica la sonda usada para el análisis de transferencia de Southern de alfa-1,3-GT. También se indica el tamaño predicho de las bandas de Southern con digestión con BstEII tanto para el locus alfa-1,3-GT endógeno como para el locus alfa-1,3-GT modificado de forma dirigida.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Ahora se ha demostrado que puede producirse un animal porcino viable que carece de cualquier expresión de alfa 1,3 galactosiltransferasa funcional. La presente invención proporciona la inactivación completa de ambos alelos del gen de la alfa 1,3 galactosiltransferasa en cerdos, superando de este modo este antiguo obstáculo y haciendo del xenotransplante una realidad. Eliminar la expresión de este gen, que provoca la ausencia de galactosa alfa 1,3-galactosa sobre la superficie celular, representa la etapa primera y principal en la eliminación del rechazo hiperagudo en terapia de xenotransplante cerdo-a-ser humano. La invención también proporciona órganos, tejidos, y células obtenidos de dicho animal porcino, que son útiles para xenotransplante.

En un aspecto, la invención proporciona órganos, tejidos y/o células o líneas celulares purificadas o sustancialmente puras porcinos obtenidos de cerdos que carecen de cualquier expresión de alfa-1,3-GT funcional donde ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT son inactivos, y donde un alelo se vuelve inactivo a través de al menos una mutación puntual. Los órganos, tejidos, células o líneas celulares pueden ser útiles para xenotransplante.

Definiciones

Como se usa en este documento, se entiende que el término "animal" (como en "animal modificado (o alterado) genéticamente") incluye cualquier animal no humano, particularmente cualquier mamífero no humano, incluyendo, aunque sin limitación, cerdos, ovejas, cabras, ganado vacuno (bovino), ciervos, mulas, caballos, monos, perros, gatos, ratas, ratones, pájaros, pollos, reptiles, peces, e insectos. En una realización de la invención, se proporcionan cerdos alterados genéticamente y métodos de producción de los mismos.

Como se usa en este documento, un "órgano" es una estructura organizada, que puede estar compuesta por uno o más tejidos. Un "órgano" realiza una o más funciones biológicas específicas. Los órganos incluyen, sin limitación, el corazón, el hígado, el riñón, el páncreas, el pulmón, la tiroides, y la piel.

Como se usa en este documento, un "tejido" es una estructura organizada que comprende células y las

sustancias intracelulares que las rodean. El "tejido", solo o junto con otras células o tejidos pueden realizar una o más funciones biológicas.

Como se usa en este documento, los términos "porcino", "animal porcino", "cerdo" y "puerco" son términos genéricos que se refieren al mismo tipo de animal independientemente del género, tamaño, o estirpe.

I. Modificación Genética Dirigida del gen de la alfa-1,3-GT

En un aspecto de la presente invención, se proporcionan animales porcinos en los que ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT son inactivos, y en los que un alelo se vuelve inactivo a través de al menos una mutación puntual y en los que un alelo del gen de la alfa-1,3-GT se inactiva mediante un acontecimiento de modificación genética dirigida. En otra realización de la presente invención, ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT se inactivan mediante un acontecimiento de modificación genética dirigida. En una realización, el gen puede modificarse de forma dirigida mediante recombinación homóloga. En otras realizaciones, el gen puede alterarse, es decir, puede alterarse una parte del código genético, afectando de este modo a la transcripción y/o traducción de ese segmento del gen. Por ejemplo, la alteración de un gen puede suceder a través de técnicas de sustitución, delección ("knockout") o inserción ("knockin"). Pueden insertarse genes adicionales para una proteína deseada o secuencia reguladora que module la transcripción de una secuencia existente.

En realizaciones de la presente invención, los alelos del gen de la alfa-1,3-GT se vuelven inactivos, de modo que la enzima alfa-1,3-GT resultante ya no pueda generar galactosa alfa1,3-galactosa sobre la superficie celular. En una realización, el gen de la alfa-1,3-GT puede transcribirse en ARN, pero no puede traducirse en proteína. En otra realización, el gen de la alfa-1,3-GT puede transcribirse en una forma truncada. Dicho ARN truncado puede no traducirse o puede traducirse en una proteína no funcional. En una realización alternativa, el gen de la alfa-1,3-GT puede inactivarse de tal modo que no suceda transcripción del gen. En una realización adicional, el gen de la alfa-1,3-GT puede transcribirse y después traducirse en una proteína no funcional.

Los cerdos que tienen dos alelos inactivos del gen de la alfa-1,3-GT no son de origen natural. Se descubrió sorprendentemente que mientras se intentaba eliminar el segundo alelo del gen de la alfa-1,3-GT a través de un acontecimiento de modificación genética dirigida, se identificó una mutación puntual, que evitaba que el segundo alelo produjera alfa1,3GT funcional.

Así, en otro aspecto de la presente invención, el gen de la alfa-1,3-GT se vuelve inactivo a través de al menos una mutación puntual. En otra realización, ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT pueden volverse inactivos, a través de al menos una mutación puntual. En una realización, esta mutación puntual puede suceder mediante un acontecimiento de modificación genética dirigida. En otra realización, esta mutación puntual puede ser de origen natural. En una realización adicional, pueden inducirse mutaciones en el gen de la alfa-1,3-GT mediante un agente mutagénico.

En una realización específica, la mutación puntual puede ser una mutación T-a-G en la segunda base del exón 9 del gen de la alfa-1,3-GT (Figura 2). Los cerdos que portan una mutación puntual de origen natural en el gen de la alfa-1,3-GT permiten la producción de cerdos deficientes en alfa1,3GT libres de genes de resistencia a antibióticos y por tanto tienen el potencial de crear un producto más seguro para uso humano. En otras realizaciones, pueden existir al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos diez o al menos veinte mutaciones puntuales para volver al gen de la alfa-1,3-GT inactivo. En otras realizaciones, se proporcionan cerdos en los que ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT contienen mutaciones puntuales que evitan cualquier expresión de alfa1,3GT funcional. En una realización específica, se proporcionan cerdos que contienen la mutación T-a-G en la segunda base del exón 9 en ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT (Figura 2).

Otra aspecto de la presente invención proporciona un animal porcino, en el que ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT se inactivan, por lo cual un alelo se inactiva por un acontecimiento de modificación genética dirigida y el otro alelo se inactiva mediante una mutación puntual. En una realización, se proporciona un animal porcino, en el que ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT se inactivan, por lo cual un alelo se inactiva por un acontecimiento de modificación genética dirigida y el otro alelo se inactiva debido a la presencia de una mutación puntual T-a-G en la segunda base del exón 9. En una realización específica, se proporciona un animal porcino, en el que ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT se inactivan, por lo cual un alelo se inactiva mediante una construcción de modificación dirigida al Exón 9 (véase, por ejemplo, la Figura 6) y el otro alelo se inactiva debido a la presencia de una mutación puntual T-a-G en la segunda base del exón 9.

Tipos de células porcinas

Las células porcinas que pueden modificarse genéticamente pueden obtenerse de una diversidad de diferentes órganos y tejidos tales como, aunque sin limitación, piel, mesénquima, pulmón, páncreas, corazón, intestino, estómago, vejiga, vasos sanguíneos, riñón, uretra, órganos reproductores, y una preparación disgregada de un embrión, feto o animal adulto completo o una parte del mismo. Por ejemplo, las células porcinas pueden

seleccionarse entre el grupo compuesto por, aunque sin limitación, células epiteliales, células fibroblásticas, células neurales, queratinocitos, células hematopoyéticas, melanocitos, condrocitos, linfocitos (B y T), macrófagos, monocitos, células mononucleares, células de músculo cardíaco, otras células musculares, células de la granulosa, células del cumulus, células epidérmicas, células endoteliales, células de los islotes de Langerhans, células sanguíneas, células precursoras sanguíneas, células óseas, células precursoras óseas, células madre neuronales, células madre primordiales, hepatocitos, queratinocitos, células endoteliales de la vena umbilical, células endoteliales aórticas, células endoteliales microvasculares, fibroblastos, células estrelladas hepáticas, células del músculo liso aórtico, miocitos cardíacos, neuronas, células de Kupffer, células de músculo liso, células de Schwann, y células epiteliales, eritrocitos, plaquetas, neutrófilos, linfocitos; monocitos, eosinófilos, basófilos, adipocitos, condrocitos, células del islote pancreático, células tiroideas, células paratiroides, células parótidas, células tumorales, células gliales, astrocitos, glóbulos rojos, glóbulos blancos, macrófagos, células epiteliales, células somáticas, células de la pituitaria, células suprarrenales, células pilosas, células de la vejiga, células renales, células retinianas, bastones retinianos, conos retinianos, células cardíacas, células del marcapasos, células esplénicas, células presentadoras de antígeno, células de memoria, células T, células B, células plasmáticas, células musculares, células del ovario, células del útero, células de la próstata, células epiteliales vaginales, células espermáticas, células testiculares, células germinales, óvulos, células de Leydig, células peritubulares, células de Sertoli, células luteínicas, células cervicales, células del endometrio, células mamarias, células foliculares, células mucosas, células ciliadas, células epiteliales no queratinizadas, células epiteliales queratinizadas, células pulmonares, células calciformes, células epiteliales columnares, células epiteliales escamosas, osteocitos, osteoblastos, y osteoclastos.

En una realización alternativa, pueden usarse células madre embrionarias no humanas. Puede emplearse una línea de células madre embrionarias o pueden obtenerse células madre embrionarias no humanas recientemente de un hospedador, tal como un animal porcino. Las células pueden cultivarse en una capa de alimentación de fibroblastos o cultivarse en presencia del factor inhibidor de leucemia (LIF). En una realización preferida, las células porcinas pueden ser fibroblastos; en una realización específica, las células porcinas pueden ser fibroblastos fetales. Las células fibroblásticas son un tipo de célula somática preferido porque pueden obtenerse de fetos en desarrollo y animales adultos en grandes cantidades. Estas células pueden propagarse fácilmente in vitro con un tiempo de duplicación rápido y pueden propagarse clonalmente para su uso en procedimientos de modificación génica dirigida.

Construcciones de modificación dirigida

Recombinación homóloga

La recombinación homóloga permite modificaciones específicas de sitio en genes endógenos y por tanto pueden diseñarse nuevas alteraciones en el genoma. En la recombinación homóloga, el ADN entrante interacciona con y se integra en un sitio en el genoma que contiene una secuencia de ADN sustancialmente homóloga. En integración no homóloga ("aleatoria" o "ilícita"), el ADN entrante no se encuentra en una secuencia homóloga en el genoma sino que se integra en cualquier parte, en uno de la gran cantidad de lugares potenciales. En general, estudios con células eucariotas superiores han revelado que la frecuencia de recombinación homóloga es mucho menor que la frecuencia de integración aleatoria. La proporción de estas frecuencias tiene implicaciones directas para "la modificación génica dirigida" que depende de la integración mediante recombinación homóloga (es decir, recombinación entre el "ADN de modificación dirigida" exógeno y el correspondiente "ADN diana" en el genoma).

Varios artículos describen el uso de recombinación homóloga en células de mamífero. Son ilustrativos de estos artículos Kucherlapati et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:3153-3157, 1984; Kucherlapati et al., Mol. Cell. Bio. 5: 714-720, 1985; Smithies et al., Nature 317:230-234, 1985; Wake et al., Mol. Cell. Bio. 8:2080-2089, 1985; Ayares et al., Genetics 111:375-388, 1985; Ayares et al., Mol. Cell. Bio. 7:1656-1662, 1986; Song et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:6820-6824, 1987; Thomas et al. Cell 44:419-428, 1986; Thomas y Capecchi, Cell 51: 503-512, 1987; Nandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:3845-3849, 1988; y Mansour et al., Nature 336:348-352, 1988. Evans y Kaufman, Nature 294:146-154, 1981; Doetschman et al., Nature 330:576-578, 1987; Thomas y Capecchi, Cell 51:503-512, 1987; Thompson et al., Cell 56:316-321, 1989.

La presente invención usa la recombinación homóloga para inactivar el gen de la alfa-1,3-GT en las células, tales como las células porcinas descritas anteriormente. El ADN puede comprender al menos una parte de (de los) gene(s) en el locus particular con la introducción de una alteración en al menos una, opcionalmente ambas copias, del (de los) gene(s) nativo(s), para evitar la expresión de alfa1,3GT funcional. La alteración puede ser una inserción, delección, reemplazo o combinación de los mismos. Cuando la alteración se introduce en solamente una copia del gen que se está inactivando, las células que tienen una única copia sin mutar del gen diana se amplifican y pueden someterse a una segunda etapa de modificación dirigida, donde la alteración puede ser igual o diferente de la primera alteración, habitualmente diferente, y donde está implicada una delección, o reemplazo, que puede estar solapando con al menos una parte de la alteración introducida originalmente. En esta segunda etapa de modificación dirigida, puede usarse un vector de modificación dirigida con los mismos brazos de homología, pero que contiene marcadores de selección en mamíferos diferentes. Los transformantes resultantes se exploran para la ausencia de

un antígeno diana funcional y el ADN de la célula puede explorarse adicionalmente para asegurar la ausencia de un gen diana tipo silvestre. Como alternativa, puede conseguirse homocigosidad en cuanto a un fenotipo por cruce de hospedadores heterocigóticos para la mutación.

5 Vectores de modificación dirigida

La modificación de un locus diana de una célula puede producirse por introducción de ADN en las células, donde el ADN tiene homología con el locus diana e incluye un gen marcador, que permite la selección de células que comprenden la construcción integrada. El ADN homólogo en el vector diana se recombinará con el ADN cromosómico en el locus diana. El gen marcador puede estar flanqueado en ambos lados por secuencias de ADN homólogas, un brazo de recombinación 3' y un brazo de recombinación 5'. Los métodos para la construcción de vectores de modificación dirigida se han descrito en la técnica, véase, por ejemplo, Dai et al., *Nature Biotechnology* 20: 251-255, 2002; el documento WO 00/51424, Figura 6.

Pueden prepararse diversas construcciones para recombinación homóloga en un locus diana. La construcción puede incluir al menos 50 pb, 100 pb, 500 pb, 1 kpb, 2 kpb, 4 kpb, 5 kpb, 10 kpb, 15 kpb, 20 kpb, o 50 kpb de secuencia homóloga con el locus diana. La secuencia puede incluir cualquier secuencia contigua del gen porcino de la alfa-1,3-GT (véase, por ejemplo, N° de acceso de GenBank L36152, el documento WO 01/30992 de la University of Pittsburgh of the Commonwealth System of Higher Education; el documento WO 01/123541 de Alexion, Inc.).

Diversas consideraciones pueden estar implicadas en la determinación del grado de homología de secuencias de ADN diana, tales como, por ejemplo, el tamaño del locus diana, la disponibilidad de secuencias, la eficacia relativa de acontecimientos de entrecruzamiento doble en el locus diana y la similitud de la secuencia diana con otras secuencias.

El ADN de modificación dirigida puede incluir una secuencia en la que el ADN sustancialmente isogénico flanquea las modificaciones de secuencia deseadas con una secuencia diana correspondiente en el genoma a modificar. La secuencia sustancialmente isogénica puede ser al menos aproximadamente un 95%, 97-98%, 99,0-99,5%, 99,6-99,9%, o 100% idéntica a la secuencia diana correspondiente (excepto para las modificaciones de secuencia deseadas). El ADN de modificación dirigida y el ADN diana preferiblemente pueden compartir tramos de ADN de al menos aproximadamente 75, 150 ó 500 pares de bases que son 100% idénticos. Por consiguiente, el ADN de modificación dirigida puede obtenerse de células muy relacionadas con la línea celular que se está modificando de forma dirigida; o el ADN de modificación dirigida puede obtenerse de células de la misma línea celular o animal que las células que se están modificando de forma dirigida.

Las construcciones de ADN pueden diseñarse para modificar la alfa1,3GT diana endógena. La secuencia homóloga para dirigir la construcción puede tener una o más delecciones, inserciones, sustituciones o combinaciones de los mismos. La alteración puede ser la inserción de un gen marcador de selección fusionado en fase de lectura con la secuencia cadena arriba del gen diana.

Los genes marcadores de selección adecuados incluyen, aunque sin limitación: genes que confieren la capacidad de crecer en ciertos sustratos del medio, tales como el gen tk (timidina quinasa) o el gen hprt (hipoxantina fosforribosiltransferasa) que confiere la capacidad de crecer en medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina); el gen gpt bacteriano (guanina/xantina fosforribosiltransferasa) que permite el crecimiento en medio MAX (ácido micofenólico, adenina, y xantina). Véase, por ejemplo, Song, K-Y., et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A.* 84:6820-6824 (1987); Sambrook, J., et al., *Molecular Cloning-A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Capítulo 16. Otros ejemplos de marcadores de selección incluyen: genes que confieren resistencia a compuestos tales como antibióticos, genes que confieren la capacidad de crecer en sustratos seleccionados, genes que codifican proteínas que producen señales detectables tales como luminiscencia, tales como la proteína verde fluorescente, la proteína verde fluorescente potenciada (eGFP). Se conoce y está disponible una amplia diversidad de dichos marcadores, incluyendo, por ejemplo, genes de resistencia a antibióticos tales como el gen de resistencia a neomicina (neo) (Southern, P., y P. Berg, *J. Mol. Appl. Genet.* 1:327-341 (1982)); y el gen de resistencia a higromicina (hyg) (*Nucleic Acids Research* 11:6895-6911 (1983), y Te Riele, H., et al., *Nature* 348:649-651 (1990)). Otros genes marcadores de selección incluyen: acetohidroxiácido sintasa (AHAS), fosfatasa alcalina (AP), beta galactosidasa (LacZ), beta glucuronidasa (GUS), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), proteína verde fluorescente (GFP), proteína roja fluorescente (RFP), proteína amarilla fluorescente (YFP), proteína cian fluorescente (CFP), peroxidasa de rábano rusticano (HRP), luciferasa (Luc), nopalina sintasa (NOS), octopina sintasa (OCS), y derivados de los mismos. Están disponibles múltiples marcadores de selección que confieren resistencia a ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfinotricina, puromicina, y tetraciclina.

Los métodos para la incorporación de genes de resistencia a antibióticos y factores de selección negativa serán conocidos para los especialistas en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 99/15650; la patente de Estados Unidos N° 6.080.576; la patente de Estados Unidos N° 6.136.566; Niwa et al., *J. Biochem.* 113:343-349

(1993); y Yoshida et al., Transgenic Research 4:277-287 (1995)).

Tabla 1: Genes marcadores de selección que emiten señales detectables

	Nº Patente	Título
5	6.319.669	Proteínas verdes fluorescentes modificadas
	6.316.181	Establecimiento de líneas celulares con expresión persistente de una proteína verde fluorescente (GFP) usando una construcción de vector de ADN pIRES/EGFP
	6.303.373	Método para medir el direccionamiento de membrana plasmática de GLUT4
10	6.291.177	Ensayo para agentes que alteran la actividad del receptor acoplado a proteína G
	6.284.519	Sistemas celulares que tienen interacción específica de pares de unión peptídicos
	6.284.496	Vector de ADN para determinar la presencia de mutaciones fuera de la fase de lectura
	6.280.934	Ensayo para agentes que alteran la actividad del receptor acoplado a proteína G
	6.274.354	Métodos para usar cre-lox para la producción de virus adeno-asociados recombinantes
15	6.270.958	Detección de virus ARN de cadena negativa
	6.268.201	Genes iniB, iniA e iniC de micobacterias y métodos de uso
	6.265.548	Proteínas fluorescentes de <i>Aequorea victoria</i> mutante que tienen fluorescencia celular aumentada
	6.261.760	Regulación del ciclo celular por esteroides
20	6.255.558	Expresión génica
	6.255.071	Vectores virales de mamífero y sus usos
	6.251.677	Virus híbridos adenovirus-AAV y métodos de uso de los mismos
	6.251.602	Sistemas celulares que tienen interacción específica de pares de unión peptídicos
	6.251.582	Receptores acoplados a G alternativos asociados con la entrada de retrovirus en células, métodos para identificar los mismos y usos de diagnóstico y terapéuticos de los mismos
25	6.251.384	Modelos de metástasis usando la proteína verde fluorescente (GFP) como marcador
	6.248.558	Secuencia y método para el diseño por ingeniería genética de proteínas con actividad de desplazamiento a través de la membrana celular
30	6.248.550	Ensayos para proteína quinasas usando sustratos de proteína fluorescente
	6.248.543	Composiciones y métodos para explorar agentes antimicrobianos
	6.232.107	Luciferasas, proteínas fluorescentes, ácidos nucleicos que codifican las luciferasas y las proteínas fluorescentes y el uso de las mismas en diagnóstico, exploración de alta producción y artículos novedosos
35	6.228.639	Vectores y métodos para la mutagénesis de genes de mamíferos
	6.225.082	Transporte del ARNm de la proteína básica de mielina y secuencias potenciadoras de la traducción
	6.221.612	Agentes reductores de fotones para su uso en ensayos de fluorescencia
	6.218.185	Sistema de transformación genética basada en el transposón piggyback para insectos
40	6.214.567	Línea celular de queratinocitos humanos inmortalizada
	6.214.563	Agentes reductores de fotones para reducir la emisión de luz indeseada en ensayos
	6.210.922	Producción libre de suero de proteínas recombinantes y vectores adenovirales
	6.210.910	Serie biodetectora de fibra óptica que comprende poblaciones celulares confinadas en microcavidades
45	6.203.986	Visualización de ARN en células vivas
	6.197.928	Detectores de proteína fluorescente para la detección de analitos
	6.180.343	Fusiones de la proteína verde fluorescente con péptidos aleatorios
	6.172.188	Proteínas fluorescentes
	6.153.409	Proceso para la producción continua optimizada de proteínas en larvas de insecto
50	6.150.176	Detectores de proteína fluorescente para medir el pH de una muestra biológica
	6.146.826	Proteína verde fluorescente
	6.140.132	Detectores de proteína fluorescente para medir el pH de una muestra biológica
	6.136.539	Composiciones y métodos para la inhibición de la expresión del gen de mucina MUC-5
	6.136.538	Replicones viales inducibles silenciosos y usos de los mismos
55	6.133.429	Cromóforos útiles para la preparación de nuevos conjugados en tándem
	6.130.313	Proteínas de fusión de GFP de degradación rápida
	6.124.128	Proteínas fluorescentes diseñadas de larga longitud de onda
	6.110.711	Método para definir tipos celulares por sondeo de bibliotecas de expresión extensa con ARN amplificado
60	6.096.865	Mutantes de la proteína verde fluorescente que tienen propiedades fluorescentes mejoradas a 37 grados
	6.096.717	Método para producir transcritos génicos y proteínas marcados
	6.093.808	Construcciones λ B eGFP, líneas celulares y métodos de uso
	6.090.919	Mutantes optimizados por FACS de la proteína verde fluorescente (GFP)
65	6.083.690	Métodos y composiciones para identificar agentes osteogénicos

	6.077.707	Proteínas fluorescentes diseñadas de larga longitud de onda
	6.066.476	Proteínas verdes fluorescentes modificadas
5	6.060.247	Neuronas post-mitóticas que contienen vectores adenovirales que modulan la apoptosis y el crecimiento
	6.054.321	Proteínas fluorescentes diseñadas de larga longitud de onda
	6.037.133	Construcciones IκB eGFP, líneas celulares y métodos de uso
	6.027.881	Proteínas fluorescentes de <i>Aequorea victoria</i> mutante que tienen fluorescencia celular aumentada
10	6.025.192	Vectores retrovirales modificados
	6.020.192	Genes de proteína verde fluorescente humanizada y métodos
	6.013.447	Método intracelular aleatorio para obtener moléculas de ácido nucleico óptimamente activas
	6.001.557	Adenovirus y métodos de uso de los mismos
15	5.994.077	Aislamiento basado en fluorescencia de genes inducidos diferencialmente
	5.994.071	Evaluación de cáncer de próstata
	5.993.778	Expresión funcional de, y ensayo de, receptores celulares funcionales in vivo
	5.989.808	Identificación de compuestos que afectan a la interacción específica de pares de unión peptídicos
20	5.985.577	Conjugados proteicos que contienen multímeros de proteína verde fluorescente
	5.968.773	Sistema y métodos para la regulación de la expresión génica
	5.968.738	Análisis FACS de dos informadores de células de mamífero usando proteínas verdes fluorescentes
	5.958.713	Método para detectar sustancias biológicamente activas usando la proteína verde fluorescente
25	5.952.236	Biodetector de fluorescencia basado en enzimas para análisis químico
	5.948.889	Composiciones y métodos para explorar agentes antimicrobianos
	5.948.681	Vehículos no virales para su uso en transferencia génica
	5.942.357	Proceso combinatorio para preparar bibliotecas de tiofeno sustituido
30	5.932.435	Exploración de ácidos nucleicos antisentido y de ribozimas en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
	5.922.576	Sistema simplificado para generar adenovirus recombinantes
	5.919.445	Uso de proteína verde fluorescente para rastrear la infección de baculovirus en insectos y para aumentar la estabilidad viral a UV
35	5.914.233	Ensayo de exploración para la identificación de agentes que alteran la expresión de PTH-rP

40 También pueden usarse combinaciones de marcadores de selección. Por ejemplo, para marcar alfa1,3GT, puede clonarse un gen neo (con o sin su propio promotor, como se ha analizado anteriormente) en una secuencia de ADN que es homóloga al gen de la alfa-1,3-GT. Para usar una combinación de marcadores, puede clonarse el gen HSV-tk de modo que esté fuera del ADN de modificación dirigida (podría colocarse otro marcador de selección en el flanco opuesto, si se desea). Después de introducir la construcción de ADN en las células a modificar de forma dirigida, las células pueden seleccionarse en los antibióticos apropiados. En este ejemplo particular, aquellas células que son resistentes a G418 y ganciclovir tienen mayor probabilidad de haber surgido por recombinación homóloga en la que el gen neo se ha combinado en el gen de la alfa-1,3-GT pero se ha perdido el gen tk porque estaba localizado fuera de la región de entrecruzamiento doble.

50 Las delecciones pueden ser de al menos aproximadamente 50 pb, más habitualmente de aproximadamente 100 pb, y generalmente de no más de aproximadamente 20 kpb, donde la delección normalmente puede incluir al menos una parte de la región codificante que incluye una parte de uno o más exones, una parte de uno o más intrones, y puede incluir o no una parte de las regiones no codificantes flanqueantes, particularmente, la región no codificante 5' (región reguladora de la transcripción). Por tanto, la región homóloga puede extenderse más allá de la región codificante en la región no codificante 5' o como alternativa en la región no codificante 3'. Las inserciones generalmente no pueden exceder de 10 kpb, habitualmente no exceden de 5 kpb, siendo generalmente de al menos 55 50 pb, más habitualmente de al menos 200 pb.

60 La(s) región(es) de homología puede(n) incluir mutaciones, donde las mutaciones pueden inactivar adicionalmente el gen diana, proporcionando un desplazamiento de fase, o cambiando un aminoácido clave, o la mutación puede corregir un alelo disfuncional, etc. La mutación puede ser un cambio sutil, que no excede de aproximadamente el 5% de las secuencias flanqueantes homólogas. Cuando se desea la mutación de un gen, el gen marcador puede insertarse en un intrón o un exón.

65 La construcción puede prepararse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, diversos fragmentos pueden juntarse, introducirse en vectores apropiados, clonarse, analizarse y después manipularse adicionalmente hasta que se haya conseguido la construcción deseada. Pueden hacerse diversas modificaciones a la secuencia,

para permitir el análisis de restricción, la escisión, identificación de sondas, etc. Pueden introducirse mutaciones silenciosas, según se desee. En diversas fases, puede emplearse análisis de restricción, secuenciación, amplificación con la reacción en cadena de la polimerasa, reparación con cebador, mutagénesis in vitro, etc.

La construcción puede prepararse usando un vector bacteriano, que incluye un sistema de replicación procariota, por ejemplo, un origen reconocible por *E. coli*, en cada fase la construcción pueden clonarse y analizarse. Puede emplearse un marcador, igual o diferente del marcador a usar para inserción, que puede eliminarse antes de la introducción en la célula diana. Una vez se ha completado el vector que contiene la construcción, puede manipularse adicionalmente, tal como por delección de las secuencias bacterianas, linealización, introduciendo una corta delección en la secuencia homóloga. Después de la manipulación final, la construcción puede introducirse en la célula.

En la presente invención se describen construcciones recombinantes que contienen secuencias del gen de la alfa-1,3-GT. Las construcciones comprenden un vector, tal como un vector plasmídico o viral, en el que se ha insertado una secuencia de la invención, en orientación directa o inversa. La construcción también puede incluir secuencias reguladoras incluyendo, por ejemplo, un promotor, unido de forma funcional a la secuencia. Los especialistas en la técnica conocen grandes cantidades de vectores y promotores adecuados, y están disponibles en el mercado. Los siguientes vectores se proporcionan a modo de ejemplo. Bacterianos: pBS, pQE-9 (Qiagen), phagescript, PsiX174, pBluescript SK, pBSKS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia). Eucariotas: pWNeo, pSv2cat, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPv, pMSG, pSVL (Pharmacia), vectores de origen viral (vectores M13, vectores de fago 1 bacteriano, vectores adenovirales, y vectores retrovirales), vectores de número de copia elevado, bajo y ajustable, vectores que tienen replicones compatibles para su uso en combinación en un único hospedador (pACYCI 84 y pBR322) y vectores de replicación episómicos eucariotas (pCDM8). Otros vectores incluyen vectores de expresión procariotas tales como pcDNA II, pSL301, pSE280, pSE380, pSE420, pTrcHisA, B, y C, pRSET A, B, y C (Invitrogen, Corp.), pGEMEX-1, y pGEMEX-2 (Promega, Inc.), los vectores pET (Novagen, Inc.), pTrc99A, pKK223-3, los vectores pGEX, pEZZ18, pRIT2T, y pMC1871 (Pharmacia, Inc.), pKK233-2 y pKK388-1 (Clontech, Inc.), y pProEx-HT (Invitrogen, Corp.) y variantes y derivados de los mismos. Otros vectores incluyen vectores de expresión eucariotas tales como pFastBac, pFastBacHT, pFastBacDUAL, pSFV, y pTet-Splice (Invitrogen), pEUK-C1, pPUR, pMAM, pMAMneo, pBI101, pBI121, pDR2, pCMVEBNA, y pYACneo (Clontech), pSVK3, pSVL, pMSG, pCH110, y pKK232-8 (Pharmacia, Inc.), p3'SS, pXT1, pSG5, pPbac, pMbac, pMC1neo, y pOG44 (Stratagene, Inc.), y pYES2, pAC360, pBlueBacHis A, B, y C, pVL1392, pBlueBacIII, pCDM8, pcDNA1, pZeoSV, pcDNA3, pREP4, pCEP4, y pEBVHis (Invitrogen, Corp.) y variantes o derivados de los mismos. Vectores adicionales que pueden usarse incluyen: pUC18, pUC19, pBlueScript, pSPORT, cósmidos, fagómidos, YAC (cromosomas artificiales de levaduras), BAC (cromosomas artificiales bacterianos), P1 (fago de *Escherichia coli*), pQE70, pQE60, pQE9 (quagan), vectores pBS, vectores PhageScript, vectores BlueScript, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A (Stratagene), pcDNA3 (Invitrogen), pGEX, pTrsfus, pTrc99A, pET-5, pET-9, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia), pSPORT1, pSPORT2, pCMVSPORT2.0 y pSV-SPORT1 (Invitrogen), pTrxFus, pThioHis, pLEX, pTrcHis, pTrcHis2, pRSET, pBlueBacHis2, pcDNA3.1/His, pcDNA3.1(-) /Myc-His, pSecTag, pEBVHis, pPIC9K, pPIC3.5K, pAO815, pPICZ, pPICZ $\square$, pGAPZ, pGAPZ $\square$, pBlueBac4.5, pBlueBacHis2, pMelBac, pSinRep5, pSinHis, pIND, pIND(SP1), pVgRXR, pcDNA2.1, pYES2, pZerO1.1, pZerO-2.1, pCR-Blunt, pSE280, pSE380, pSE420, pVL1392, pVL1393, pCDM8, pcDNA1.1, pcDNA1.1/Amp, pcDNA3.1, pcDNA3.1/Zeo, pSe, SV2, pRc/CMV2, pRc/RSV, pREP4, pREP7, pREP8, pREP9, pREP10, pCEP4, pEBVHis, pCR3.1, pCR2.1, pCR3.1-Uni, y pCRBac de Invitrogen; $\square$ ExCell, $\square$ gt11, pTrc99A, pKK223-3, pGEX-1 $\square$ T, pGEX-2T, pGEX-2TK, pGEX-4T-1, pGEX-4T-2, pGEX-3X, pGEX-5X-1, pGEX-5X-2, pGEX-5X-3, pEZZ18, pRIT2T, pMC1871, pSVK3, pSVL, pMSG, pCH110, pKK232-8, pSL1180, pNEO, y pUC4K de Pharmacia; pSCREEN-1b(+), pT7Blue(R), pT7Blue-2, pCITE-4abc(+), pOCUS-2, pTag, pET-32LIC, pET-30LIC, pBAC-2cp LIC, pBACgus-2cp LIC, pT7Blue-2 LIC, pT7Blue-2, $\square$ SCREEN-1, $\square$ BlueSTAR, pET-3abcd, pET-7abc, pET9abcd, pET11abcd, pET12abc, pET-14b, pET-15b, pET-16b, pET-17b-pET-17xb, pET-19b, pET-20b(+), pET-21abcd(+), pET-22b(+), pET-23abcd(+), pET-24abcd(+), pET-25b(+), pET-26b(+), pET-27b(+), pET-28abc(+), pET-29abc(+), pET-30abc(+), pET-31b(+), pET-32abc(+), pET-33b(+), pBAC-1, pBACgus-1, pBAC4x-1, pBACgus4x-1, pBAC-3cp, pBACgus-2cp, pBACsurf-1, plg, Signal plg, pYX, Selecta Vecta-Neo, Selecta Vecta-Hyg, y Selecta Vecta-Gpt de Novagen; pLexA, pB42AD, pGBT9, pAS2-1, pGAD424, pACT2, pGAD GL, pGAD GH, pGAD10, pGilda, pEZM3, pEGFP, pEGFP-1, pEGFP-N, pEGFP-C, pEBFP, pGFPUv, pGFP, p6xHis-GFP, pSEAP2-Basic, pSEAP2-Control, pSEAP2-Promoter, pSEAP2-Enhancer, p $\square$ gal-Basic, p $\square$ gal-Control, p $\square$ gal-Promoter, p $\square$ gal-Enhancer, pCMV $\square$, pTet-Off, pTet-On, pTK-Hyg, pRetro-Off, pRetro-On, pIRES1neo, pIRES1hyg, pLXSN, pLNCX, pLAPSN, pMAMneo, pMAMneo-CAT, pMAMneo-LUC, pPUR, pSV2neo, pYEX4T-1/2/3, pYEX-S1, pBacPAK-His, pBacPAK8/9, pAcUW31, BacPAK6, pTriplEx, $\square$ gt10, $\square$ gt11, pWE15, y $\square$ TriplEx de Clontech; Lambda ZAP II, pBK-CMV, pBK-RSV, pBluescript II KS +/-, pBluescript II SK +/-, pAD-GAL4, pBD-GAL4 Cam, pSurfsript, Lambda FIX II, Lambda DASH, Lambda EMBL3, Lambda EMBL4, SuperCos, pCR-Script Amp, pCR-Script Cam, pCR-Script Direct, pBS +/-, pBC KS +/-, pBC SK +/-, Phagescript, pCAL-n-EK, pCAL-n, pCAL-c, pCAL-kc, pET-3abcd, pET-11abcd, pSPUTK, pESP-1, pCMVLacl, pOPRSVI/MCS, pOPI3 CAT, pXT1, pSG5, pPbac, pMbac, pMC1neo, pMC1neo Poly A, pOG44, pOG45, pFRT $\square$ GAL, pNEO $\square$ GAL, pRS403, pRS404, pRS405, pRS406, pRS413, pRS414, pRS415, y pRS416 de Stratagene y variantes o derivados de los mismos. También pueden usarse vectores de doble híbrido y de doble híbrido inversos, por ejemplo, pPC86, pDBLeu, pDBTrp, pPC97, p2.5, pGAD1-3, pGAD10, pACT, pACT2, pGADGL, pGADGH, pAS2-1, pGAD424, pGBT8, pGBT9, pGAD-GAL4, pLexA, pBD-GAL4, pHISi, pHISi-1, placZi,

pB42AD, pDG202, pJK202, pJG4-5, pNLexA, pYESTrp y variantes o derivados de los mismos. Puede usarse cualquier otro plásmido y vector siempre que sea replicable y viable en el hospedador.

Las técnicas que pueden usarse para permitir que la construcción de ADN entre en la célula hospedadora incluyen coprecipitación de fosfato cálcico/ADN, microinyección de ADN en el núcleo, electroporación, fusión del protoplasto bacteriano con células intactas, transfección, o cualquier otra técnica conocida por los especialistas en la técnica. El ADN puede ser ADN monocatenario o bicatenario, lineal o circular, relajado o superenrollado. Para diversas técnicas para transfectar células de mamífero véase, por ejemplo, Keown et al., *Methods in Enzymology* Vol. 185, págs. 527-537 (1990).

En una realización específica, pueden producirse células knockout heterocigóticas por transfección de fibroblastos fetales porcinos primarios con un vector knockout que contiene la secuencia de alfa-1,3-GT aislada de ADN isogénico. Como se describe en Dai et al. (*Nature Biotechnology*, 20:451-455), el brazo 5' puede ser de 4,9 kb y estar compuesto por una gran fragmento del intrón 8 y el extremo 5' del exón 9. El brazo 3' puede ser y estar compuesto por la secuencia del exón 9. El vector puede incorporar una estrategia de captura de promotor, usando, por ejemplo, IRES (sitio de entrada interno de ribosomas) para iniciar la traducción del gen Neo (véase, por ejemplo, la Figura 6).

Selección de células recombinadas de forma homóloga

Las células después pueden cultivarse en medio seleccionado apropiadamente para identificar las células que proporcionan la integración apropiada. La ausencia del gen marcador de selección insertado en el gen de la alfa-1,3-GT establece la integración de la construcción diana en el genoma hospedador. Aquellas células que muestran el fenotipo deseado después pueden analizarse adicionalmente por análisis de restricción, electroforesis, análisis de Southern, reacción en cadena de la polimerasa, etc. para analizar el ADN para establecer si ha sucedido recombinación homóloga o no homóloga. Esto puede determinarse empleando sondas para el inserto y después secuenciando las regiones 5' y 3' que flanquean el inserto para la presencia del gen de la alfa-1,3-GT que se extiende más allá de las regiones flanqueantes de la construcción o identificando la presencia de una delección, cuando se introduce dicha delección. También pueden usarse cebadores que son complementarios a una secuencia dentro de la construcción y complementarios a una secuencia fuera de la construcción y en el locus diana. De este modo, pueden obtenerse solamente dúplex de ADN que tienen ambos cebadores presentes en las cadenas complementarias si ha sucedido recombinación homóloga. Demostrando la presencia de las secuencias cebadoras o la secuencia de tamaño esperado, se apoya la existencia de recombinación homóloga.

La reacción en cadena de la polimerasa usada para explorar acontecimientos de recombinación homóloga es conocida en la técnica, véase, por ejemplo, Kim y Smithies, *Nucleic Acids Res.* 16:8887-8903, 1988; y Joyner et al., *Nature* 338:153-156, 1989. La combinación específica de un potenciador de polioma mutante y un promotor de la timidina quinasa para dirigir el gen de la neomicina ha demostrado ser activa tanto en células madre embrionarias como en células EC por Thomas y Capecchi, supra, 1987; Nicholas y Berg (1983) en *Teratocarcinoma Stem Cell*, eds. Siver, Martin y Strikland (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N.Y. (pág. 469-497); y Linney y Donerly, *Cell* 35:693-699, 1983.

Las líneas celulares obtenidas de la primera ronda de modificación dirigida probablemente son heterocigóticas para el alelo modificado de forma dirigida. La homocigosidad, en la que ambos alelos están modificados, puede conseguirse de varios modos. Un enfoque es cultivar varias células en las que se ha modificado una copia y después someter estas células a otra ronda de modificación dirigida usando un marcador de selección diferente. Como alternativa, los homocigotos pueden obtenerse cruzando animales heterocigóticos para el alelo modificado, de acuerdo con la genética mendeliana tradicional. En algunas situaciones, puede ser deseable obtener dos alelos modificados diferentes. Esto puede conseguirse por rondas sucesivas de modificación génica dirigida o cruzando heterocigotos, cada uno de los cuales porta uno de los alelos modificados deseados.

Mutación inducida en el locus alfa 1,3 GT

Los métodos descritos en la presente implican la introducción intencionada de una mutación mediante un agente mutagénico. Ejemplos de agentes mutagénicos conocidos en la técnica y adecuados para su uso en la presente invención incluyen, aunque sin limitación, mutágenos químicos (por ejemplo, agentes químicos que se intercalan en el ADN o que se unen al ADN tales como N-etil-N-nitrosourea (ENU), etilmetanosulfonato (EMS), gas mostaza, ICR191 y similares; véase, por ejemplo, E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Siede, *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM Press, Washington DC (1995), mutágenos físicos (por ejemplo, radiación UV, radiación, rayos x), mutágenos bioquímicos (por ejemplo, enzimas de restricción, mutágenos de reparación del ADN, inhibidores de la reparación del ADN, y ADN polimerasas y proteínas de replicación propensas a error), así como la inserción de transposones. De acuerdo con los métodos de la presente invención, las células en cultivo pueden exponerse a uno de estos agentes, y puede seleccionarse cualquier mutación que provoque la eliminación de galactosa alfa1,3-galactosa sobre la superficie celular, por ejemplo, mediante exposición a toxina A.

Las dosis preferidas de mutágenos químicos para inducir mutaciones en células son conocidas en la técnica, o pueden determinarlas fácilmente los especialistas en la técnica usando ensayos de mutagénesis conocidos en la técnica. La mutagénesis química de células in vitro puede conseguirse tratando las células con diversas dosis del agente mutagénico y/o controlando el tiempo de exposición al agente. Valorando la exposición al agente mutagénico y/o la dosis, es posible realizar el grado óptimo de mutagénesis para el propósito pretendido, mutando de este modo una cantidad deseada de genes en cada célula diana. Por ejemplo, dosis útiles de ENU pueden ser 0,1 - 0,4 mg/ml durante aproximadamente 1 - 2 horas. En otro ejemplo, dosis útiles de EMS pueden ser 0,1 - 1 mg/ml durante aproximadamente 10 - 30 horas. Además, también pueden usarse dosis y tiempos de exposición menores y mayores para conseguir la frecuencia de mutación deseada.

II. Identificación De Células Que No Expresan Alfa-1,3-GT Funcional

En la presente se describe método de selección para determinar si células porcinas carecen de la expresión de alfa-1,3-GT funcional.

El procedimiento de selección puede basarse en una toxina bacteriana para seleccionar células que carecen de expresión de alfa 1,3GT funcional. La toxina bacteriana, toxina A producida por *Clostridium difficile*, se usa para seleccionar células que carecen del epítipo de superficie celular galactosa alfa1,3-galactosa. La exposición a la toxina de *C. difficile* puede causar el redondeo de células que muestran este epítipo sobre su superficie, liberando las células de la matriz de la placa. Tanto los knockouts génicos dirigidos como las mutaciones que inutilizan la función o la expresión enzimática pueden detectarse usando este método de selección. Las células que carecen de la expresión en la superficie celular del epítipo galactosa alfa1,3-galactosa, identificadas usando la selección mediada por toxina A descrita, o producidas usando métodos convencionales de inactivación génica incluyendo modificación génica dirigida, después pueden usarse para producir cerdos, en los que ambos alelos del gen de la alfa 1,3 GT son inactivos.

El método de selección puede detectar la eliminación del epítipo de alfa 1,3GT directamente, ya sea debido a eliminación dirigida del gen de la alfa 1,3GT por recombinación homóloga, o una mutación en el gen que provoca una enzima que no funciona o que no se expresa. La selección mediante resistencia a antibióticos se ha usado más habitualmente para la exploración (véase anteriormente). Este método puede detectar la presencia del gen de resistencia en el vector de modificación dirigida, pero no indica directamente si la integración fue un acontecimiento de recombinación dirigida o una integración aleatoria. Cierta tecnología, tal como la tecnología de captura de poli A y promotor, aumenta la probabilidad de acontecimientos dirigidos, pero de nuevo, no da evidencias directas de que se haya conseguido el fenotipo deseado, una célula deficiente en epítopos gal alfa 1,3 gal sobre la superficie celular. Además, pueden usarse formas negativas de selección para seleccionar la integración dirigida; en estos casos, se inserta el gen de un factor letal para las células de tal modo que solamente los acontecimientos dirigidos permitan que la célula evite la muerte. Las células seleccionadas por estos métodos después pueden ensayarse para alteración génica, integración de vector y, finalmente, eliminación del epítipo alfa 1,3 gal. En estos casos, como la selección se basa en la detección de la integración del vector de modificación dirigida y no en el fenotipo alterado, solamente pueden detectarse knockouts dirigidos, no mutaciones puntuales, reordenamientos génicos o truncamientos u otras de dichas modificaciones.

La toxina A, una citotoxina producida por la bacteria *Clostridium difficile*, se une específicamente a la secuencia de carbohidrato terminal de la galactosa alfa1,3-galactosa gal alfa 1-3 gal beta 1-4GlcNAc. La unión a este receptor media un efecto citotóxico en la célula, causando que cambie de morfología y, en algunos casos, se libere de la matriz de la placa. En condiciones controladas, las células que no portan este marcador no se ven afectadas por la toxina. Por tanto, en una realización, para determinar si se ha eliminado satisfactoriamente o no el epítipo alfa 1,3 gal mediante eliminación dirigida o mutación génica del locus gal alfa-1,3-GT, pueden seleccionarse las células que no portan el epítipo. La exposición a toxina A puede ser tóxica para células que portan el epítipo, y promueve la selección de aquellas células en las que el gen se ha inactivado satisfactoriamente. Las células útiles como donantes nucleares para la producción de animales alterados genéticamente (por ejemplo, cerdos) que tiene el locus gal alfa 1,3 eliminado o mutado pueden seleccionarse por exposición de las células a la toxina A de *C. difficile*.

La toxina A, una de las dos citotoxinas producidas por *Clostridium difficile*, tiene elevada afinidad de unión por la secuencia de galactosa alfa1,3-galactosa gal alfa 1,3-gal beta 1,4GlcNAc encontrada sobre la superficie de una diversidad de tipos celulares (Clark et al., Arch. Biochem. Biophys. 257 (1): 217-229, 1987). Este carbohidrato parece servir como receptor funcional para la toxina A, ya que células que presentan este epítipo sobre su superficie son más sensibles al efecto citotóxico de la toxina A que las células que carecen de este receptor. Las células sensibles expuestas a toxina A en cultivo muestran redondeo celular, probablemente debido a la despolimerización de la actina y los cambios resultantes en la integridad del citoesqueleto (Kushnaryov et al., J. Biol. Chem. 263: 17755-17762 (1988) y Just et al., J. Clin. Invest. 95: 1026-1031, 1995). Estas células pueden eliminarse selectivamente del cultivo, ya que se levantan de la matriz y flotan en suspensión, dejando las células sin afectar unidas firmemente a la superficie de la placa.

Exposición de las células a toxina A. En una realización, las células unidas se exponen a toxina A como un componente del medio de cultivo celular. Después de un tiempo fijo de exposición, se retira el medio que contiene la toxina A y las células sensibles a toxina A liberadas, se lava la placa, y se repone el medio, sin toxina A. La exposición a toxina A se repite durante un periodo de días para retirar las células sensibles a toxina unidas de las placas, y permitir que las células insensibles proliferen y se expandan. La toxina A purificada puede usarse en los métodos de la presente invención (disponible en el mercado, véase, por ejemplo, Techlab Inc., N° Cat. T3001, Blacksburg, VA). También puede usarse toxina A no purificada sin refinar (disponible en el mercado, véase, por ejemplo, Techlab Inc. N° Cat. T5000 o T3000, Blacksburg, VA), que puede requerir una titulación inicial para determinar la dosificación eficaz para la selección.

Método de selección basado en suero

El procedimiento de selección puede realizarse usando suero que contiene factores del complemento y anticuerpos naturales contra el epítipo gal alfa1,3 gal (véase, por ejemplo, Koike et al., Xenotransplantation 4:147-153, 1997). La exposición a suero de un ser humano o primate no humano que contiene anticuerpos anti-Gal puede causar lisis celular debido a la unión específica del anticuerpo y la activación del complemento en células que muestran el epítipo gal alfa 1,3 gal. Por lo tanto, las células deficientes en alfa-1,3-GT seguirán vivas y por tanto pueden seleccionarse.

Caracterización adicional de células porcinas que carecen de la expresión de alfa 1,3GT funcional

Las células porcinas que se cree que carecen de la expresión de alfa-1,3-GT funcional pueden caracterizarse adicionalmente. Dicha caracterización puede realizarse por las siguientes técnicas, incluyendo, aunque sin limitación: análisis de PCR, análisis de transferencia de Southern, análisis de transferencia de Northern, ensayos de unión específica de lectina, y/o análisis de secuenciación.

Puede usarse el análisis de PCR como se describe en la técnica (véase, por ejemplo, Dai et al. Nature Biotechnology 20:431-455) para determinar la integración de vectores de modificación dirigida. Pueden originarse amplímeros en el gen de resistencia a antibiótico y extenderse en una región fuera de la secuencia del vector. También puede usarse análisis de Southern (véase, por ejemplo, Dai et al. Nature Biotechnology 20:431-455) para caracterizar modificaciones globales en el locus, tales como la integración de un vector de modificación dirigida en el locus alfa 1,3GT. Aunque puede usarse análisis de Northern para caracterizar el transcrito producido a partir de cada uno de los alelos.

La unión específica de lectina, usando lectina GSL IB4 de Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia (Vector Labs), una lectina que se une específicamente al resto de carbohidrato gal alfa 1,3 gal, y el análisis de unión FACS (separación de células activadas por fluorescencia) puede determinar si el epítipo alfa 1,3 gal está presente o no en las células. Este tipo de análisis implica la adición de lectina GSL-IB4 marcada con fluoresceína a las células y la posterior separación celular.

Además, también puede usarse análisis de secuenciación del ADNc producido a partir del transcrito de ARN para determinar la ubicación precisa de cualquier mutación en el alelo de la alfa 1,3GT.

III. Producción de Animales Porcinos

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un método para producir cerdos viables en los que ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT se han vuelto inactivos, donde el método es como se indica en la reivindicación 24. En una realización, los cerdos se producen por clonación usando un núcleo donante de una célula porcina en la que ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT se han inactivado. En una realización, ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT se inactivan mediante un acontecimiento de modificación genética dirigida. En otra realización, ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT se inactivan debido a la presencia de una mutación puntual. En otra realización, un alelo se inactiva por un acontecimiento de modificación genética dirigida y el otro alelo se inactiva mediante una mutación puntual. En una realización adicional, un alelo se inactiva por un acontecimiento de modificación genética dirigida y el otro alelo se inactiva debido a la presencia de una mutación puntual T-a-G en la segunda base del exón 9 del gen de la alfa-1,3-GT. En una realización específica, un alelo se inactiva mediante una construcción de modificación dirigida al Exón 9 (Figura 6) y el otro alelo se inactiva debido a la presencia de una mutación puntual T-a-G en la segunda base del exón 9 del gen de la alfa-1,3-GT. En otra realización, un método para clonar dichos cerdos incluye: enuclear un ovocito, fusionar el ovocito con un núcleo donante de una célula porcina en la que ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT se han inactivado, e implantar el embrión obtenido por transferencia nuclear en una madre sustituta.

Como alternativa, se describe un método para producir cerdos viables que carecen de cualquier expresión de alfa-1,3-GT inactivando ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT en células madre embrionarias no humanas, que después pueden usarse para producir descendencia.

Animales no humanos alterados genéticamente que pueden crearse modificando cigotos directamente. Para mamíferos, los cigotos modificados después pueden introducirse en el útero de una hembra pseudo-preñada no humana capaz de llevar el animal a término. Por ejemplo, si se desean animales no humanos completos que carezcan del gen de la alfa-1,3-GT, entonces pueden modificarse de forma dirigida células madre embrionarias obtenidas de este animal y después introducirse en blastocistos para que las células modificadas crezcan en animales quiméricos. Para células madre embrionarias, puede usarse una línea de células madre embrionarias no humanas o células madre no humanas recién obtenidas.

Las células totipotentes pueden ser células madre embrionarias (ES) no humanas. El aislamiento de células ES a partir de blastocistos, el establecimiento de líneas celulares ES y su posterior cultivo se realizan por métodos convencionales descritos, por ejemplo, por Doetschmann et al., J. Embryol. Exp. Morph. 87:27-45 (1985); Li et al., Cell 69:915-926 (1992); Robertson, E. J. "Tetracarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach," ed. E. J. Robertson, IRL Press, Oxford, Inglaterra (1987); Wurst y Joyner, "Gene Targeting: A Practical Approach," ed. A. L. Joyner, IRL Press, Oxford, Inglaterra (1993); Hogen et al., "Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual," eds. Hogan, Beddington, Costantini y Lacy, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1994); y Wang et al., Nature 336:741-744 (1992). Las células totipotentes pueden ser células germinales embrionarias (EG) no humanas. Las células germinales embrionarias son células no diferenciadas funcionalmente equivalentes a las células ES, es decir, pueden cultivarse y transfectarse in vitro, después contribuyen a los linajes celulares somático y germinal de una quimera (Stewart et al., Dev. Biol. 161:626-628 (1994)). Las células EG se obtienen por cultivo de células germinales primordiales, las progenitoras de los gametos, con una combinación de factores de crecimiento: factor inhibidor de leucemia, factor steel y factor de crecimiento de fibroblastos básico (Matsui et al., Cell 70:841-847 (1992); Resnick et al., Nature 359:550-551 (1992)). El cultivo de células EG puede realizarse usando métodos descritos en el artículo de Donovan et al., "Transgenic Animals, Generation and Use," Ed. L. M. Houdebine, Harwood Academic Publishers (1997), y en la bibliografía original mencionada en este documento.

Pueden obtenerse blastocistos tetraploides no humanos para su uso en la invención por producción y desarrollo natural de cigotos, o por métodos conocidos por electrofusión de embriones de dos células y pueden cultivarse posteriormente como se describe, por ejemplo, por James et al., Genet. Res. Camb. 60:185-194 (1992); Nagy y Rossant, "Gene Targeting: A Practical Approach," ed. A. L. Joyner, IRL Press, Oxford, Inglaterra (1993); o por Kubiak y Tarkowski, Exp. Cell Res. 157:561-566 (1985).

La introducción de las células ES no humanas o las células EG no humanas en los blastocistos puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica. Un método adecuado para los propósitos de la presente invención es el método de microinyección descrito por Wang et al., EMBO J. 10:2437-2450 (1991).

Como alternativa, mediante células madre embrionarias no humanas modificadas pueden producirse animales transgénicos. Las células madre embrionarias modificadas genéticamente pueden inyectarse en un blastocisto y después llevarse a término en un mamífero hospedador hembra de acuerdo con técnicas convencionales. La progenie heterocigótica después puede explorarse para la presencia de la alteración en el sitio del locus diana, usando técnicas tales como PCR o transferencia de Southern. Después del apareamiento con un hospedador de tipo silvestre de la misma especie, la progenie quimérica resultante puede después aparearse de forma cruzada para conseguir hospedadores homocigóticos.

Después de transformar células madre embrionarias no humanas con el vector de modificación dirigida para alterar el gen de la alfa-1,3-GT, las células pueden sembrarse sobre una capa de alimentación en un medio apropiado, por ejemplo, DMEM potenciado con suero bovino fetal. Las células que contienen la construcción pueden detectarse empleando un medio selectivo, y después de tiempo suficiente para que las colonias crezcan, pueden recogerse las colonias y analizarse para la existencia de recombinación homóloga. Puede usarse la reacción en cadena de la polimerasa, con cebadores dentro de y sin la secuencia de construcción pero en el locus diana. Aquellas colonias que muestran recombinación homóloga después pueden usarse para la manipulación de embriones y la inyección de blastocistos. Los blastocistos pueden obtenerse de hembras superovuladas. Las células madre embrionarias después pueden tratarse con tripsina y añadirse las células modificadas a una gota que contiene los blastocistos. Puede inyectarse al menos una de las células madre embrionarias modificadas en el blastocelo del blastocisto. Después de la inyección, al menos uno de los blastocistos puede devolverse a cada uno de los cuernos uterinos de hembras pseudopreñadas. Se deja que las hembras continúen a término y las camadas resultantes se exploran para células mutantes que tengan la construcción. Los blastocistos se seleccionan por diferente ascendencia a partir de las células ES transformadas. Proporcionando un diferente fenotipo del blastocisto y las células ES, la progenie quimérica puede detectarse fácilmente, y después puede realizarse el genotipado para sondear la presencia del gen de la alfa-1,3-GT modificado.

Transferencia nuclear de células somáticas para producir descendencia transgénica clonada

En la presente se describe un método para clonar un cerdo que carece de un gen de la alfa-1,3-GT funcional mediante transferencia nuclear de células somáticas que comprende las etapas enumeradas en la reivindicación 24. En general, el cerdo puede producirse por un proceso de transferencia nuclear que comprende las

siguientes etapas: obtener células de cerdo diferenciadas deseadas a usar como fuente de núcleos donantes; obtener ovocitos de un cerdo; enuclear dichos ovocitos; transferir el núcleo deseado de la célula diferenciada o la célula en el ovocito enucleado, por ejemplo, por fusión o inyección, para formar unidades de TN; activar la unidad de TN resultante; y transferir dicha unidad de TN cultivada en un cerdo hospedador de modo que la unidad de TN se desarrolle en un feto.

Las técnicas de transferencia nuclear o las técnicas de transplante nuclear son conocidas en la técnica (Dai et al. *Nature Biotechnology* 20:251-255; Polejaeva et al. *Nature* 407:86-90 (2000); Campbell et al., *Theriogenology*, 43:181 (1995); Collas et al., *Mol. Reprod. Dev.*, 38:264-267 (1994); Keefer et al., *Biol. Reprod.*, 50:935-939 (1994); Sims et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90:6143-6147 (1993); documento WO 94/26884; documento WO 94/24274, y documento WO 90/03432, patentes de Estados Unidos N° 4.944.384 y 5.057.420).

Un núcleo celular donante no humano, que se ha modificado para alterar el gen de la alfa-1,3-GT, se transfiere a un ovocito porcino receptor. El uso de este método no está restringido a un tipo celular donante particular. La célula donante puede ser como se describe en este documento, véase también, por ejemplo, Wilmut et al. *Nature* 385 810 (1997); Campbell et al. *Nature* 380 64-66 (1996); Dai et al., *Nature Biotechnology* 20:251-255, 2002 o Cibelli et al. *Science* 280 1256-1258 (1998). Pueden emplearse todas las células de cariotipo normal, incluyendo células somáticas embrionarias, fetales y adultas que pueden usarse satisfactoriamente en transferencia nuclear. Los fibroblastos fetales son una clase particularmente útil de células donantes. Se describen métodos generalmente adecuados de transferencia nuclear en Campbell et al. *Theriogenology* 43 181 (1995), Dai et al. *Nature Biotechnology* 20:251-255, Polejaeva et al. *Nature* 407:86-90 (2000), Collas et al. *Mol. Reprod. Dev.* 38 264-267 (1994), Keefer et al. *Biol. Reprod.* 50 935-939 (1994), Sims et al. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90 6143-6147 (1993), documento WO-A-9426884; documento WO-A-9424274, documento WO-A-9807841, documento WO-A-9003432, patente de Estados Unidos N° 4.994.384 y patente de Estados Unidos N° 5.057.420. También pueden usarse células donantes diferenciadas o al menos parcialmente diferenciadas. Las células también pueden estar, aunque no necesariamente, en cultivo y pueden ser quiescentes. Las células donantes nucleares que son quiescentes son células que pueden inducirse a entrar en quiescencia o que existen en un estado quiescente in vivo. Métodos de la técnica anterior también han usado tipos celulares embrionarios en procedimientos de clonación (Campbell et al. (*Nature*, 380:64-68, 1996) y Stice et al. (*Biol. Reprod.*, 20 54:100-110, 1996).

Las células donantes nucleares somáticas pueden obtenerse de una diversidad de diferentes órganos y tejidos tales como, aunque sin limitación, piel, mesénquima, pulmón, páncreas, corazón, intestino, estómago, vejiga, vasos sanguíneos, riñón, uretra, órganos reproductores, y una preparación disgregada de un embrión, feto o animal adulto completo o parte del mismo. Las células donantes nucleares, por ejemplo, se seleccionan entre el grupo compuesto por células epiteliales, células fibroblásticas, células neurales, queratinocitos, células hematopoyéticas, melanocitos, condrocitos, linfocitos (B y T), macrófagos, monocitos, células mononucleares, células de músculo cardíaco, otras células musculares, células de la granulosa, células del cumulus, células epidérmicas o células endoteliales.

La célula donante nuclear puede ser una célula madre embrionaria no humana. Preferiblemente, pueden usarse células fibroblásticas como células donantes.

Las células donantes nucleares de la invención pueden ser células germinales de un animal no humano. Puede usarse cualquier célula germinal de una especie animal en la fase embrionaria, fetal, o adulta como célula donante nuclear. En una realización adecuada, la célula donante nuclear es una célula germinal embrionaria.

Las células donantes nucleares pueden detenerse en cualquier fase del ciclo celular (G0, G1, G2, S, M) para asegurar la coordinación con la célula aceptora. Puede usarse cualquier método conocido en la técnica para manipular la fase del ciclo celular. Los métodos para controlar la fase del ciclo celular incluyen, aunque sin limitación, quiescencia G0 inducida por inhibición por contacto de células cultivadas, quiescencia G0 inducida por la eliminación de suero u otro nutriente esencial, quiescencia G0 inducida por senescencia, quiescencia G0 inducida por la adición de un factor de crecimiento específico; quiescencia G0 o G1 inducida por medios físicos o químicos tales como choque por calor, presión hiperbárica u otro tratamiento con un agente químico, hormona, factor de crecimiento u otra sustancia; control de la fase S mediante tratamiento con un agente químico que interfiere con cualquier punto del procedimiento de replicación; control de la fase M mediante selección usando separación de células activadas por fluorescencia, agitación mitótica, tratamiento con agentes de alteración de microtúbulos o cualquier agente químico que altere el progreso en la mitosis (véase también Freshney, R. I., "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique," Alan R. Liss, Inc, Nueva York (1983).

Los métodos para el aislamiento de ovocitos son bien conocidos en la técnica. Esencialmente, esto puede comprender aislar ovocitos de los ovarios o el tracto reproductor de un cerdo. Una fuente fácilmente disponible de ovocitos de cerdo es materiales del matadero. Para la combinación de técnicas tales como ingeniería genética, transferencia nuclear y clonación, los ovocitos generalmente deben madurarse in vitro antes de que estas células puedan usarse como células receptoras para transferencia nuclear, y antes de que puedan fertilizarse por la célula espermática para desarrollarse en un embrión. Este proceso generalmente requiere recoger ovocitos inmaduros

(profase I) de ovarios de mamífero, por ejemplo, ovarios bovinos obtenidos en un matadero, y madurar los ovocitos en un medio de maduración antes de la fertilización o enucleación hasta que el ovocito alcance la fase de metafase II, que en el caso de ovocitos bovinos generalmente ocurre aproximadamente 18-24 horas después de la aspiración. Este periodo de tiempo se conoce como el "periodo de maduración". En ciertas realizaciones, el ovocito se obtiene de una lechona. Una "lechona" es un cerdo hembra que nunca ha tenido descendencia. En otras realizaciones, el ovocito se obtiene de una cerda. Una "cerda" es un cerdo hembra que previamente ha producido descendencia.

Un ovocito no humano en fase de metafase II puede ser el ovocito receptor, en esta fase se cree que el ovocito puede estar o está suficientemente "activado" para tratar al núcleo introducido como a un espermatozoides fertilizante. Los ovocitos en fase de metafase II, que se han madurado in vivo se han usado satisfactoriamente en técnicas de transferencia nuclear. Esencialmente, pueden recogerse quirúrgicamente ovocitos en metafase II maduros de cerdos no superovulados o superovulados de 35 a 48, o 39-41, horas después del inicio del celo o después de la inyección de gonadotropina coriónica humana (hCG) o una hormona similar.

Después de un periodo de tiempo de maduración fijo, que varía de aproximadamente 10 a 40 horas, y preferiblemente aproximadamente 16-18 horas, los ovocitos pueden enuclearse. Antes de la enucleación, los ovocitos pueden retirarse y colocarse en medio apropiado, tal como HECM que contiene 1 miligramo por mililitro de hialuronidasa antes de retirar las células del cumulus. Los ovocitos separados después pueden explorarse para los cuerpos polares, y los ovocitos en metafase II seleccionados, determinados por la presencia de cuerpos polares, se usan después para transferencia nuclear. La enucleación viene seguida.

La enucleación puede realizarse por métodos conocidos, tales como los descritos en la patente de Estados Unidos Nº 4.994.384. Por ejemplo, ovocitos en metafase II pueden colocarse en HECM, que contiene opcionalmente 7,5 microgramos por mililitro de citocalasina B, para la enucleación inmediata, o pueden colocarse en un medio adecuado, por ejemplo un medio de cultivo de embriones tal como CR1aa, más suero de vaca en celo al 10%, y después enuclearse posteriormente, preferiblemente no más de 24 horas después, y más preferiblemente 16-18 horas después.

La enucleación puede realizarse por microcirugía usando una micropipeta para retirar el cuerpo polar y el citoplasma adyacente. Los ovocitos después pueden explorarse para identificar aquellos que se han enucleado satisfactoriamente. Un modo de explorar los ovocitos es teñir los ovocitos con 1 microgramo por mililitro de colorante Hoechst 33342 en HECM, y después visualizar los ovocitos bajo irradiación ultravioleta durante menos de 10 segundos. Los ovocitos que se han enucleado satisfactoriamente después pueden sembrarse en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, CR1aa más suero al 10%.

Puede transferirse una única célula de mamífero no humano de la misma especie que el ovocito enucleado en el espacio perivitelino del ovocito enucleado usado para producir la unidad de TN. La célula de mamífero y el ovocito enucleado pueden usarse para producir unidades de TN de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células pueden fusionarse por electrofusión. La electrofusión se consigue proporcionando un pulso de electricidad que es suficiente para causar una descomposición transitoria de la membrana plasmática. Esta descomposición de la membrana plasmática es muy corta porque la membrana se vuelve a formar rápidamente. Por tanto, si se induce que dos membranas adyacentes se descompongan y después de la reformación las bicapas lipídicas se entremezclan, pueden abrirse pequeños canales entre las dos células. Debido a la inestabilidad termodinámica de dicha pequeña abertura, ésta se agranda hasta que las dos células se convierten en una. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 4.997.384 de Prather et al. Puede usarse una diversidad de medios de electrofusión incluyendo, por ejemplo, sacarosa, manitol, sorbitol y solución tamponada con fosfato. La fusión también puede conseguirse usando el virus Sendai como agente fusogénico (Graham, Wister Inot. Symp. Monogr., 9, 19, 1969). También, el núcleo puede inyectarse directamente en el ovocito en lugar de usar fusión por electroporación. Véase, por ejemplo, Collas y Barnes, Mol. Reprod. Dev., 38:264-267 (1994). Después de la fusión, las unidades de TN fusionadas resultantes se colocan posteriormente en un medio adecuado hasta su activación, por ejemplo, medio CR1aa. Típicamente la activación puede realizarse poco después, por ejemplo, menos de 24 horas después, o aproximadamente 4-9 horas después, u óptimamente 1-2 horas después de la fusión. En una realización preferida, la activación sucede al menos una hora después de la fusión y a las 40-41 horas después de la maduración.

La unidad de TN puede activarse por métodos conocidos. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, cultivar la unidad de TN a temperatura sub-fisiológica, en esencia, aplicar un choque térmico frío, o realmente helado a la unidad de TN. Esto puede hacerse más convenientemente cultivando la unidad de TN a temperatura ambiente, que es relativamente fría respecto a las condiciones de temperatura fisiológicas a las que los embriones se exponen habitualmente. Como alternativa, la activación puede conseguirse por la aplicación de agentes de activación conocidos. Por ejemplo, la penetración de ovocitos por espermatozoides durante la fertilización ha demostrado activar los ovocitos pre-fusión produciendo cantidades mayores de preñeces viables y múltiples terneros genéticamente idénticos después de la transferencia nuclear. Además, pueden usarse tratamientos tales como choque eléctrico y químico para activar los embriones de TN después de la fusión. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 5.496.720, de Susko-Parrish et al. Además, la activación puede realizarse aumentando simultánea o

secuencialmente los niveles de cationes divalentes en el ovocito, y reduciendo la fosforilación de proteínas celulares en el ovocito. Esto puede realizarse generalmente introduciendo cationes divalentes en el citoplasma del ovocito, por ejemplo, magnesio, estroncio, bario o calcio, por ejemplo, en forma de un ionóforo. Otros métodos para aumentar los niveles de cationes divalentes incluyen el uso de choque eléctrico, tratamiento con etanol y tratamiento con queladores enjaulados. La fosforilación puede reducirse por métodos conocidos, por ejemplo, por la adición de inhibidores de quinasa, por ejemplo, inhibidores de serina-treonina quinasa, tales como 6-dimetil-aminopurina, estaurosporina, 2-aminopurina, y esfingosina. Como alternativa, la fosforilación de las proteínas celulares puede inhibirse por la introducción de una fosfatasa en el ovocito, por ejemplo, fosfatasa 2A y fosfatasa 2B.

Las unidades de TN activadas, o "embriones fusionados", después pueden cultivarse en un medio de cultivo in vitro adecuado hasta la generación de colonias celulares. Los medios de cultivo adecuados para el cultivo y maduración de embriones son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de medios conocidos, que pueden usarse para el cultivo y mantenimiento de embriones, incluyen medio de Ham F-10+suero de ternera fetal al 10% (FCS), Medio de Cultivo Tisular-199 (TCM-199)+suero de ternera fetal al 10%, medio Tyrode-Albúmina-Lactato-Piruvato (TALP), solución salina tamponada con fosfato (PBS) de Dulbecco, medios de Eagle y Whitten y, en un ejemplo específico, las unidades de TN activadas pueden cultivarse en medio NCSU-23 durante aproximadamente 1-4 h a aproximadamente 38,6°C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5%.

Después, la unidad o unidades de TN cultivadas pueden lavarse y después colocarse en un medio adecuado contenido en placas de pocillos que contienen preferiblemente una capa de alimentación confluyente adecuada. Las capas de alimentación adecuadas incluyen, a modo de ejemplo, fibroblastos y células epiteliales. Las unidades de TN se cultivan en la capa de alimentación hasta que las unidades de TN alcanzan un tamaño adecuado para transferirlas a una hembra receptora, o para obtener células que puedan usarse para producir colonias celulares. Preferiblemente, estas unidades de TN pueden cultivarse hasta al menos aproximadamente 2 a 400 células, aproximadamente 4 a 128 células, o al menos aproximadamente 50 células.

Las unidades de TN activadas después pueden transferirse (transferencias de embrión) al oviducto de cerdos hembra. En una realización, los cerdos hembra pueden ser lechonas receptoras de celo sincronizado. Pueden usarse lechonas de estirpe cruzada (large white/Duroc/Landrace) (127,01-181,44 kg (280-400 lbs)). Las lechonas pueden sincronizarse como animales receptores por administración oral de 18-20 mg de Regu-Mate (Altrenogest, Hoechst, Warren, NJ) mezclado en el pienso. Regu-Mate puede suministrarse durante 14 días consecutivos. Después pueden administrarse i.m. mil unidades de gonadotropina coriónica humana (hCG, Intervet America, Millsboro, DE) aproximadamente 105 h después del último tratamiento con Regu-Mate. Las transferencias de embrión pueden entonces realizarse aproximadamente 22-26 h después de la inyección de hCG. En una realización, la preñez puede llevarse a término y producir el nacimiento de descendencia viva. En otra realización, la preñez puede detenerse temprano y pueden recogerse las células embrionarias.

Cría de animales knockout homocigóticos deseados

También se describe en la presente un método para producir cerdos viables que carezcan de cualquier expresión de alfa-1,3-GT funcional cruzando un cerdo macho heterocigótico para el gen de la alfa-1,3-GT con un cerdo hembra heterocigótico para el gen de la alfa-1,3-GT. Los cerdos pueden ser heterocigóticos debido a la modificación genética de un alelo del gen de la alfa-1,3-GT para evitar la expresión de ese alelo. Como alternativa, los cerdos pueden ser heterocigóticos debido a la presencia de una mutación puntual en un alelo del gen de la alfa-1,3-GT. La mutación puntual puede ser una mutación puntual T-a-G en la segunda base del exón 9 del gen de la alfa-1,3-GT. Se describe un método para producir un animal porcino que carezca de cualquier expresión de alfa-1,3-GT funcional en el que un cerdo macho que contiene una mutación puntual T-a-G en la segunda base del exón 9 del gen de la alfa-1,3-GT se cruza con un cerdo hembra que contiene una mutación puntual T-a-G en la segunda base del exón 9 del gen de la alfa-1,3-GT.

Pueden cruzarse animales sexualmente maduros producidos a partir de transferencia nuclear de células donantes que portan una doble eliminación en el gen de la alfa-1,3-GT, y ensayarse su descendencia para el knockout homocigótico. Estos animales knockout homocigóticos después pueden cruzarse para producir más animales.

Los ovocitos de un animal no humano knockout doble sexualmente maduro pueden fertilizarse in vitro usando esperma de tipo silvestre de dos líneas de cerdos genéticamente diferentes e implantarse los embriones en sustitutos adecuados. La descendencia de estos apareamientos puede ensayarse para la presencia de la eliminación, por ejemplo, pueden ensayarse por secuenciación de ADNc, PCR, sensibilidad a toxina A y/o unión de lectina. Después, en la madurez sexual, pueden aparearse los animales de cada una de estas camadas.

Los embarazos pueden detenerse de manera temprana de modo que puedan aislarse fibroblastos fetales y caracterizarse adicionalmente fenotípica y/o genotípicamente. Los fibroblastos que carecen de la expresión del gen de la alfa-1,3-GT pueden usarse después para transferencia nuclear de acuerdo con los métodos descritos en este documento (véase también Dai et al.) para producir múltiples preñeces y descendencia que porte la doble

eliminación deseada.

IV. Tipos de Animales Porcinos Modificados Genéticamente

En un aspecto de la presente invención, se proporcionan animales porcinos en los que un alelo del gen de la alfa-1,3-GT está inactivado a través de un acontecimiento de modificación genética. En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan animales porcinos en los que ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT están inactivados a través de un acontecimiento de modificación genética. En una realización el gen puede modificarse a través de recombinación homóloga. En otras realizaciones, el gen puede interrumpirse, es decir puede alterarse una porción del código genético, afectando de este modo a la transcripción y/o traducción de ese segmento del gen. Por ejemplo, la disrupción de un gen puede tener lugar a través de técnicas de sustitución, delección ("knockout") o inserción ("knockin"). Pueden insertarse genes adicionales para una proteína deseada o secuencia reguladora que modulan la transcripción de una secuencia existente.

Los cerdos que poseen dos alelos inactivos del gen de la alfa-1,3-GT no son de origen natural. Se descubrió sorprendentemente que mientras se intentaba knockout el segundo alelo del gen alfa-1,3-GT a través de un acontecimiento de modificación genética, se identificó una mutación puntual, que volvió al segundo alelo inactivo.

Así, en otro aspecto de la presente invención, el gen de la alfa-1,3-GT puede volverse inactivo a través de al menos una mutación puntual. En una realización, un alelo del gen de alfa-1,3-GT puede volverse inactivo a través de al menos una mutación puntual. En otra realización, ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT pueden volverse inactivos a través de al menos una puntuación puntual. En una realización, la mutación puntual puede tener lugar a través de un acontecimiento de modificación genética. En una realización específica la mutación puntual puede ser una mutación T a G en la segunda base del exón 9 del gen de la alfa-1,3-GT (Figura 2). Los cerdos que llevan una mutación puntual de origen natural en el gen de la alfa-1,3-GT permiten la producción de cerdos deficientes en alfa1,3GT libres de genes resistentes a antibióticos y por lo tanto tienen el potencial de hacer un producto más seguro para el uso humanos. En otras realizaciones, pueden existir al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos diez o al menos veinte mutaciones puntuales par volver el gen de la alfa-1,3-GT inactivo. En otras realizaciones, se proporcionan cerdos en los que ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT contienen mutaciones puntuales que evitan cualquier expresión de alfa1,3GT funcional. En una realización específica, se proporcionan cerdos que contienen la mutación T a G en la segunda base del exón 9 en ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT (Figura 2).

Otro aspecto de la presente invención proporciona un animal porcino, en el que ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT están inactivados, por lo que un alelo está inactivado por un acontecimiento de modificación genética y el otro alelo está inactivado por una mutación puntual de origen natural. En una realización, se proporciona un animal porcino, en el que ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT están inactivados, por lo que un alelo está inactivado por un acontecimiento de modificación genética y el otro alelo está inactivado debido a la presencia de una mutación puntual T a G en la segunda base del exón 9. En una realización específica, se proporciona un animal porcino, en el que ambos alelos del gen de la alfa-1,3-GT están inactivados, por el que un alelo está inactivado a través de una construcción de modificación dirigida al Exón 9 (Figura 6) y el otro alelos está inactivado debido a la presencia de una mutación puntual T a G en la segunda base del exón 9.

V. Órganos, tejidos, células y líneas celulares porcinos

La presente invención proporciona, por primera vez, cerdos viables en los que ambos alelos del gen de la alfa 1,3 galactosiltransferasa se han inactivado. La invención también proporciona órganos, tejidos, y células obtenidos de dicho cerdo, que son útiles para xenotransplante.

En una realización, la invención proporciona órganos, tejidos y/o células o líneas celulares purificadas o sustancialmente puras porcinos obtenidos de cerdos que carecen de cualquier expresión de alfa1,3GT funcional.

En una realización, la invención proporciona órganos que son útiles para xenotransplante. Puede usarse cualquier órgano porcino, incluyendo, aunque sin limitación: cerebro, corazón, pulmones, glándulas, cerebro, ojo, estómago, bazo, páncreas, riñones, hígado, intestinos, útero, vejiga, piel, pelo, uñas, orejas, nariz, boca, labios, encías, dientes, lengua, glándulas salivares, amígdalas, faringe, esófago, intestino grueso, intestino delgado, recto, ano, píloro, glándula tiroides, glándula tímica, cápsula suprarrenal, huesos, cartílago, tendones, ligamentos, músculos esqueléticos, músculos lisos, vasos sanguíneos, sangre, médula espinal, tráquea, uréteres, uretra, hipotálamo, pituitaria, glándulas suprarrenales, ovarios, oviductos, útero, vagina, glándulas mamarias, testículos, vesículas seminales, pene, linfa, ganglios linfáticos y vasos linfáticos.

En otra realización, la invención proporciona tejidos que son útiles para xenotransplante. Puede usarse cualquier tejido porcino, incluyendo, aunque sin limitación: epitelio, tejido conectivo, sangre, hueso, cartílago, músculo, nervio, adenoide, adiposo, areolar, hueso, adiposo pardo, esponjoso, músculo, cartilaginoso, cavernoso, condroide, cromafínico, dartoico, elástico, epitelial, graso, fibrohalino, fibroso, de Gamgee, gelatinoso, de

granulación, linfoide asociado al intestino, vascular de Haller, hemopoyético duro, indiferente, intersticial, de revestimiento, de los islotes, linfático, linfoide, mesenquimático, mesonefrítico, conectivo mucoso, adiposo multilocular, mieloide, noción blanda, nefrogénico, nodal, óseo, osteogénico, osteoide, periapical, reticular, retiforme, elástico, músculo esquelético, músculo liso, y tejido subcutáneo.

En una realización adicional, la invención proporciona células y líneas celulares de animales porcinos que carecen de la expresión de alfa1,3GT funcional. En una realización, estas células o líneas celulares pueden usarse para xenotransplante. Pueden usarse células de cualquier tejido u órgano porcino, incluyendo, aunque sin limitación: células epiteliales, células fibroblásticas, células neurales, queratinocitos, células hematopoyéticas, melanocitos, condrocitos, linfocitos (B y T), macrófagos, monocitos, células mononucleares, células de músculo cardíaco, otras células musculares, células de la granulosa, células del cumulus, células epidérmicas, células endoteliales, células de los islotes de Langerhans, células secretoras de insulina pancreáticas, células pancreáticas alfa-2, células pancreáticas beta, células pancreáticas alfa-1, células sanguíneas, células precursoras sanguíneas, células óseas, células precursoras óseas, células madre neuronales, células madre primordiales, hepatocitos, queratinocitos, células endoteliales de la vena umbilical, células endoteliales aórticas, células endoteliales microvasculares, fibroblastos, células estrelladas hepáticas, células del músculo liso aórtico, miocitos cardíacos, neuronas, células de Kupffer, células de músculo liso, células de Schwann, y células epiteliales, eritrocitos, plaquetas, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos, adipocitos, condrocitos, células del islote pancreático, células tiroideas, células paratiroideas, células parótidas, células tumorales, células gliales, astrocitos, glóbulos rojos, glóbulos blancos, macrófagos, células epiteliales, células somáticas, células de la pituitaria, células suprarrenales, células pilosas, células de la vejiga, células renales, células retinianas, bastones retinianos, conos retinianos, células cardíacas, células del marcapasos, células esplénicas, células presentadoras de antígeno, células de memoria, células T, células B, células plasmáticas, células musculares, células del ovario, células del útero, células de la próstata, células epiteliales vaginales, células espermáticas, células testiculares, células germinales, óvulos, células de leydig, células peritubulares, células de Sertoli, células luteínicas, células cervicales, células del endometrio, células mamarias, células foliculares, células mucosas, células ciliadas, células epiteliales no queratinizadas, células epiteliales queratinizadas, células pulmonares, células calciformes, células epiteliales columnares, células dopaminérgicas, células epiteliales escamosas, osteocitos, osteoblastos, osteoclastos, dopaminérgicas, células madre embrionarias (no humanas), fibroblastos y fibroblastos fetales. En una realización específica, se proporcionan células pancreáticas, incluyendo, aunque sin limitación, células de los islotes de Langerhans, células secretoras de insulina, células alfa-2, células beta, células alfa-1 de cerdos que carecen de la expresión de alfa-1,3-GT funcional.

Los derivados no viables incluyen tejidos separados de células viables por tratamiento enzimático o químico, estos derivados tisulares pueden procesarse adicionalmente mediante reticulación u otros tratamientos químicos antes de su uso en trasplante. En una realización preferida, los derivados incluyen matriz extracelular obtenida de una diversidad de tejidos, incluyendo piel, de las vías urinarias, vejiga o tejidos submucosos de los órganos. Además, se proporcionan tendones, articulaciones y huesos separados de tejido viable para incluir las válvulas cardíacas y otros tejidos no viables como dispositivos médicos.

Usos terapéuticos

Las células pueden administrarse en un hospedador a petición en una amplia diversidad de modos. Los modos preferidos de administración son parenteral, intraperitoneal, intravenoso, intradérmico, epidural, intraespinal, intrasternal, intra-articular, intra-sinovial, intratecal, intra-arterial, intracardiaco, intramuscular, intranasal, subcutáneo, intraorbital, intracapsular, tópico, por parche transdérmico, por administración rectal, vaginal o uretral incluyendo mediante supositorio, percutáneo, por pulverización nasal, por implante quirúrgico, parche quirúrgico interno, bomba de infusión, o mediante catéter. En un ejemplo, el agente y el vehículo se administran en una formulación de liberación lenta tal como una inyección directa al tejido o en embolada, implante, micropartícula, microesfera, nanopartícula o nanoesfera.

Los trastornos que pueden tratarse por infusión de las células descritas incluyen, aunque sin limitación, enfermedades resultantes de un fallo o una disfunción de la producción y maduración normal de células sanguíneas (es decir, anemia aplásica y trastornos hiperproliferativos de células madre); enfermedades neoplásicas, malignas en los órganos hematopoyéticos (por ejemplo, leucemia y linfomas); tumores sólidos malignos de amplio espectro de origen no hematopoyético; afecciones autoinmunes; y trastornos genéticos. Dichos trastornos incluyen, aunque sin limitación, enfermedades resultantes de un fallo o disfunción de la producción y maduración normal de células sanguíneas, trastornos hiperproliferativos de células madre, incluyendo anemia aplásica, pancitopenia, agranulocitosis, trombocitopenia, aplasia de glóbulos rojos, síndrome de Blackfan-Diamond, debido a fármacos, radiación, o infección idiopática; malignidades hematopoyéticas incluyendo leucemia linfoblástica (linfocítica) aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielogénica aguda, leucemia mielogénica crónica, mieloesclerosis maligna aguda, mieloma múltiples, policitemia vera, mielometaplasia agnógena, macroglobulinemia de Waldenström, linfoma de Hodgkin, linfoma no Hodgkin; inmunosupresión en pacientes con tumores sólidos malignos incluyendo melanoma maligno, carcinoma del estómago, carcinoma de ovario, carcinoma de mama, carcinoma pulmonar microcítico, retinoblastoma, carcinoma testicular, glioblastoma, rhabdomyosarcoma, neuroblastoma, sarcoma de Ewing, linfoma; enfermedades autoinmunes incluyendo artritis reumatoide, diabetes tipo I, hepatitis

crónica, esclerosis múltiples, lupus sistémico eritematoso; trastornos genéticos (congénitos) incluyendo anemias, aplásica familiar, síndrome de Fanconi, deficiencias de la dihidrofolato reductasa, deficiencia de la formamino transferasa, síndrome de Lesch-Nyhan, síndrome diseritropoyético congénito I-IV, síndrome de Chwachmann-Diamond, deficiencias de la dihidrofolato reductasa, deficiencia de la formamino transferasa, síndrome de Lesch-Nyhan, esferocitosis congénita, eliptocitosis congénita, estomatocitosis congénita, enfermedad de Rh nulo congénita, hemoglobinuria paroxística nocturna, variantes 1, 2, 3 de la G6PD (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), deficiencia de la piruvato quinasa, sensibilidad congénita a eritropoyetina, deficiencia, enfermedad y rasgos falciformes, talasemia alfa, beta, gamma, metahemoglobinemia, trastornos congénitos de inmunidad, enfermedad de inmunodeficiencia combinada severa (SCID), síndrome del linfocito desnudo, inmunodeficiencia combinada sensible a ionóforos, inmunodeficiencia combinada con una anomalía de recubrimiento, deficiencia de la nucleósido fosforilasa, deficiencia en la actina de granulocitos, agranulocitosis infantil, enfermedad de Gaucher, deficiencia en la adenosina desaminasa, síndrome de Kostmann, disgenesia reticular, síndromes congénitos de disfunción leucocitaria; y otros tales como osteoporosis, mieloesclerosis, anemias hemolíticas adquiridas, inmunodeficiencias adquiridas, trastornos infecciosos que causan inmunodeficiencias primarias o secundarias, infecciones bacterianas (por ejemplo, Brucelosis, Listeriosis, tuberculosis, lepra), infecciones parasitarias (por ejemplo, malaria, Leishmaniasis), infecciones fúngicas, trastornos que implican desproporción en series de células linfoides y funciones inmunes alteradas debido a la edad, trastornos fagocitarios, agranulocitosis de Kostmann, enfermedad granulomatosa crónica, síndrome de Chediak-Higachi, deficiencia de la actina de neutrófilos, deficiencia de GP-180 de la membrana de neutrófilos, enfermedades de almacenamiento metabólico, mucopolisacaridosis, mucopolipidosis, trastornos diversos que implican mecanismos inmunes, síndrome de Wiskott-Aldrich, deficiencia de alfa 1-antitripsina, etc.

Las enfermedades o patologías incluyen enfermedades neurodegenerativas, enfermedades hepatodegenerativas, enfermedades nefrodegenerativas, lesión de médula espinal, traumatismo o cirugía craneal, infecciones víricas que provocan degeneración de tejidos, órganos, o glándulas, y similares. Dichas enfermedades neurodegenerativas incluyen aunque sin limitación, complejo de demencia del SIDA; enfermedades desmielinizantes, tales como esclerosis múltiples y mielitis transversa aguda; trastornos extrapiramidales y cerebelares, tales como lesiones del sistema corticoespinal; trastornos de los ganglios basales o trastornos cerebelares; trastornos de movimiento hipercinético, tales como corea de Huntington y corea senil; trastornos del movimiento inducidos por fármacos, tales como los inducidos por fármacos que bloquean los receptores de dopamina del SNC; trastornos de movimiento hipocinético, tales como enfermedad de Parkinson; parálisis supranuclear progresiva; lesiones estructurales del cerebelo; degeneraciones espinocerebelares, tales como ataxia espinal, ataxia de Friedreich, degeneraciones corticales cerebelares, degeneraciones de sistemas múltiples (Mencel, Dejerine Thomas, Shi-Drager, y Machado-Joseph), trastornos sistémicos, tales como enfermedad de Rufsum', abetalipoproteinemia, ataxia, telangiectasia; y trastorno mitocondrial multi-sistema; trastornos centrales desmielinizantes, tales como esclerosis múltiples, mielitis transversa aguda; y trastornos de la unidad motora, tales como atrofia muscular neurogénica (degeneración celular del cuerno anterior, tales como esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal infantil y atrofia muscular espinal juvenil); enfermedad de Alzheimer; síndrome de Down a edad intermedia; enfermedad con cuerpos de Lewy difusos; demencia senil de tipo cuerpos de Lewy; enfermedad de Parkinson, síndrome de Wernicke-Korsakoff; alcoholismo crónico; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; panencefalitis esclerosante subaguda, enfermedad de Hallervorden-Spatz; y demencia pugilística. Véase, por ejemplo, Berkow et al., (eds.) (1987), The Merck Manual, (15a ed.), Merck and Co., Rahway, NJ.

La presente invención se describe con detalle adicional en los siguientes ejemplos. Se pretende que los ejemplos proporcionados a continuación sean solamente ilustrativos, y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1:

Producción de Células Porcinas Heterocigóticas para el gen de la alfa-1,3-GT

Aislamiento y transfección de fibroblastos fetales porcinos primarios. Se aislaron células fibroblásticas fetales (PCFF4-1 a PCFF4-10) de 10 fetos de la misma preñez en el día 33 de gestación. Después de eliminar la cabeza y las vísceras, los fetos se lavaron con solución salina equilibrada de Hank (HBSS; Gibco-BRL, Rockville, MD), se colocaron en 20 ml de HBSS, y se trocearon con pequeñas tijeras quirúrgicas. El tejido se sedimentó y se resuspendió en tubos de 50 ml con 40 ml de DMEM y 100 U/ml colagenasa (Gibco-BRL) por feto. Los tubos se incubaron durante 40 min. en un baño de agua en agitación a 37°C. El tejido digerido se dejó reposar durante 3-4 min. y el sobrenadante rico en células se transfirió a un nuevo tubo de 50 ml y se sedimentó. Las células después se resuspendieron en 40 ml de DMEM que contenía suero de ternera fetal al 10% (FCS), 1X aminoácidos no esenciales, piruvato sódico 1 mM y 2 ng/ml de bFGF, y se sembraron en placas de 10 cm. Todas las células se crioconservaron después de alcanzar la confluencia. Se aislaron células SLA-1 a SLA-10 de 10 fetos en el día 28 de preñez. Los fetos se machacaron a través de un tamiz metálico de malla 60 usando fórceps quirúrgicos curvados lentamente para no generar calor excesivo. La suspensión celular después se sedimentó y se resuspendió en 30 ml de DMEM que contenía FCS al 10%, 1X aminoácidos no esenciales, 2 ng/ml de bFGF, y 10 µg/ml de gentamicina. Las células se sembraron en placas de 10 cm, se cultivaron de uno a tres días, y se crioconservaron. Para las

transfecciones, se introdujeron 10 µg de ADN del vector linealizado en 2 millones de células por electroporación. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células transfectadas se sembraron en placas de 48 pocillos a una densidad de 2.000 células por pocillo y se seleccionaron con 250 µg/ml de G418.

Construcción del vector knockout. Se construyeron dos vectores knockout para alfa-1,3-GT, pPL654 y pPL657, a partir de ADN isogénico de dos fibroblastos fetales porcinos primarios, células SLA1-10 y PCFF4-2. Se generó un fragmento genómico de 6,8 kb de alfa-1,3-GT, que incluye la mayor parte del intrón 8 y el exón 9, por PCR a partir de ADN purificado de células SLA1-10 y células PCFF4-2, respectivamente. El sitio EcoRV único en el extremo 5' del exón 9 se convirtió en un sitio Sall y se insertó un fragmento de 1,8 kb IRES-neo-poli A en el sitio Sall. IRES (sitio de entrada interno de ribosomas) funciona como sitio de inicio de la traducción para la proteína neo. Por tanto, ambos vectores tienen un brazo de recombinación 5' de 4,9 kb y un brazo de recombinación 3' de 1,9 kb (Figura 6).

PCR 3' y PCR de largo alcance. Se resuspendieron aproximadamente 1.000 células en 5 µl de tampón de lisis de embriones (ELB) (Tris 40 mM, pH 8,9, Triton X-100 al 0,9%, NP40 al 0,9%, 0,4 mg/ml de proteinasa K), se incubaron a 65°C durante 15 min. para lisar las células y se calentaron hasta 95°C durante 10 min. para inactivar la proteinasa K. Para el análisis de PCR 3', los fragmentos se amplificaron usando el sistema de PCR de elevada fidelidad de expansión (Roche Molecular Biochemicals) en 25 µl de volumen de reacción con los siguientes parámetros: 35 ciclos de 1 min. a 94°C, 1 min. a 60°C, y 2 min. a 72°C. Para la LR-PCR, los fragmentos se amplificaron usando el sistema TAKARA LA (Panvera/Takara) en 50 µl de volumen de reacción con los siguientes parámetros: 30 ciclos de 10 s a 94°C, 30 s a 65°C, 10 min. + 20 s aumento/ciclo a 68°C, seguido de un ciclo final de 7 min. a 68°C. Las condiciones de PCR 3' y LR-PCR para el ADN purificado fueron las mismas que para las células excepto en que se mezcló 1 µl de ADN purificado (30 µg/ml) con 4 µl de ELB.

Análisis de transferencia de Southern de muestras celulares. Se lisaron aproximadamente 10⁶ células durante una noche a 60°C en tampón de lisis (Tris 10 mM, pH 7,5, EDTA 10 mM, NaCl 10 mM, Sarcosil al 0,5% (p/v), 1 mg/ml de proteinasa K) y el ADN se precipitó con etanol. El ADN después se digirió con BstEII y se separó en un gel de agarosa al 1%. Después de la electroforesis, el ADN se transfirió a una membrana de nylon y se sondeó con la sonda marcada con digoxigenina en el extremo 3'. Las bandas se detectaron usando un sistema de sustrato quimioluminiscente (Roche Molecular Biochemicals).

Resultados. Las colonias resistentes a antibiótico (G418) se exploraron por PCR 3' con neo442S y αGTE9A2 como cebadores directo e inverso. Neo442S está en el extremo 3' del gen neo y αGTE9A2 está en el extremo 3' del exón 9 en secuencias localizadas fuera del brazo de recombinación 3' (Figura 6). Por lo tanto, solamente a través de modificación dirigida satisfactoria en el locus α1,3GT se obtendría el producto de PCR de 2,4 kb esperado. De un total de siete transfecciones en cuatro líneas celulares diferentes, se recogieron 1105 colonias resistentes a G418, de las cuales 100 (9%) eran positivas para la alteración del gen α1,3 GT en la exploración por PCR 3' inicial (intervalo 2,5-12%). Las colonias 657A-A8, 657A-I6, y 657A-I11 mostraron la banda de 2,4 kb esperada, mientras que las células PCFF4-6 de control, y otra colonia resiste a G418, 657A-P6, fueron negativas. Se congeló una parte de cada colonia positiva a PCR 3' inmediatamente, en varias alícuotas pequeñas, para su uso futuro en experimentos de TN, mientras que el resto de las células se expandieron para PCR de largo alcance (LR-PCR) y transferencia de Southern.

Como el análisis de PCR para detectar uniones de recombinación, o el análisis de ARNm (RT-PCR) pueden generar resultados falsos positivos, se realizó una PCR de largo alcance, que abarcaría la región modificada de forma dirigida completa. La LR-PCR cubre la secuencia genómica de 7,4 kb de α1,3GT desde el exón 8 hasta el extremo del exón 9, con los dos cebadores (αGTE8S y αGTE9A2) localizados fuera de la región de recombinación (Figura 2). Las células PCFF4-6 de control, y la colonia negativa a la PCR 3', 657A-P6, mostraron solamente la banda de 7,4 kb endógena del locus α1,3GT de tipo silvestre. En contraste, tres de las colonias positivas a PCR 3', 657A-A8, 657A-I6 y 657A-I11, mostraron tanto la banda endógena de 7,4 kb como una nueva banda de 9,2 kb, del tamaño esperado para la inserción dirigida del casete IRES-neo de 1,8 kb en el locus α1,3GT.

Aproximadamente la mitad (17/30) de las colonias positivas a LR-PCR se expandieron satisfactoriamente para producir suficientes números de células (1 x 10⁶ células) para análisis de Southern. Se preveía que las colonias serían heterocigóticas para el knockout en el locus α1,3 GT, y por tanto deben tener una copia del gen normal sin modificar, y una copia alterada del gen α1,3 GT. Con digestión con BstEII, las células knockout para α1,3 GT deben mostrar dos bandas: una banda de 7 kb del tamaño esperado para el alelo α1,3 GT endógeno, y una banda de 9 kb característica de la inserción de secuencias IRES-neo en el locus α1,3 GT (Figura 2). Las 17 colonias positivas a LR-PCR se confirmaron por análisis de Southern para el knockout. Las mismas membranas se volvieron a sondear con secuencias específicas para neo y la banda de 9 kb se detectó con la sonda neo, conformando de este modo la inserción dirigida del casete IRES-neo en el locus α1,3GT alterado.

EJEMPLO 2:**Producción de Células Porcinas Homocigóticas para el gen de la alfa-1,3-GT**

Se aislaron fibroblastos fetales knockout para alfa-1,3-GT heterocigóticos, células (657A-I11 1-6), de una preñez en el día 32 como se ha descrito anteriormente (Véase también Dai et al. Nature Biotechnology 20:451 (2002)). Se construyó un vector knockout para alfa-1,3-GT dirigido al ATG (codón de inicio) (pPL680), que también contenía un gen neo, para eliminar el segundo alelo del gen de la alfa-1,3-GT. Estas células se transfectaron por electroporación con pPL680 y se seleccionaron para el fenotipo alfa1,3Gal-negativo con toxina A de *C. difficile* purificada (descrito a continuación).

EJEMPLO 3:**Selección con Toxina A de *C. difficile* de Células Porcinas Homocigóticas para el gen de la alfa-1,3-GT***Curva de citotoxicidad de toxina A*

Las células porcinas (PCFF4-6) se expusieron durante 1 hora o durante una noche a diluciones en serie de factor diez de toxina A (0,00001 µg/ml a 10 µg/ml). Las células se cultivaron en placas de 24 pocillos y se incubaron con la toxina durante 1 hora o durante una noche a 37°C. Los resultados de esta exposición se detallan en la Tabla 2. Claramente, una exposición de 1 hora a toxina A a >1 µg/ml provocaba un efecto citotóxico en >90% de las células. Por lo tanto se eligió una concentración de toxina A a o ligeramente por encima de 1 µg/ml para la selección de células alteradas genéticamente.

Tabla 2. Toxicidad de toxina A a exposición de 1 hora y durante una noche

[Toxina A], µg/ml	Incubación de 1 hora	Incubación de una noche
0	100% confluencia	100% confluencia
0,00001	100% confluencia	100% confluencia
0,0001	100% confluencia	100% confluencia
0,001	100% confluencia	100% confluencia
0,01	100% confluencia	50% confluencia, 50% redondeadas
0,1	90% confluencia	Igual que 10 µg/ml
1	>90% redondeadas	Igual que 10 µg/ml
10	Todas las células redondeadas	Todas las células redondeadas, algunas levantadas

Las células disgregadas de un embrión porcino (I-11:1-6) que contenía un knockout dirigido previamente identificado en un alelo del gen de la gal alfa-1,3-GT (Dai et al.) se transfectaron con 10 µg de ADN del vector linealizado (captura de promotor) por electroporación. Después de 48 horas, las células se sembraron en placas de 48 pocillos a una densidad de 2000 células por pocillo y se seleccionaron con 250 µg/ml de G418. Cinco días después de la transfección, se extrajo el medio de los pocillos, y se reemplazó con 2 µg/ml de toxina A en medio de cultivo (DMEM de alto contenido en glucosa con 2,8 µg/ml de bFGF y FCS al 20%). Las células se expusieron al efecto selectivo de la toxina A durante 2 horas a 37°C. Se extrajo el medio que contenía toxina A, junto con cualquier célula afectada que se hubiera liberada de la superficie de la placa, las células restantes se lavaron con medio fresco, y se reemplazó el medio sin toxina A. Diez días después, las células se expusieron de nuevo a toxina A a 1,3 µg/ml en medio durante 2 horas a 37°C. El medio, la toxina A, y cualquier célula en solución se retiraron, las células restantes se lavaron, y se reemplazó el medio.

Dieciséis días después de la transfección, se recogió una única colonia que mostraba insensibilidad a toxina A, denominada 680B1, y una parte se envió para análisis de ADN y tinción con lectina. El análisis de ADN indicó que la insensibilidad a toxina A no se debía a la integración del segundo vector diana; sin embargo, las células no se teñían con lectina GSL IB-4, lo que indica que había sucedido un knockout funcional del locus. Las células knockout doble 680B1 se usaron para transferencia nuclear en 5 receptores y se produjeron tres preñeces. Dos de estas preñeces sufrieron un aborto espontáneamente en el primer mes; los cuatro fetos de la preñez restante se recogieron en el día 39 de la preñez y las células se disgregaron y sembraron en cultivo tisular. Estas células fetales (680B1-1, 680B1-2, 680B1-3, 680B1-4) se expusieron a toxina A a 1 µg/ml durante 1 hora a 37°C, seguido de eliminación del medio, lavado celular, y reemplazo del medio sin toxina A. Los fetos 1, 2, y 4 no se vieron afectados por la toxina A, mientras que la mayor parte de las células del feto 3 se redondearon, lo que indica que este embrión era sensible a los efectos citotóxicos de la toxina A.

Los fetos 1, 2, y 4 no se unían a lectina GS IB4, como se indica por el análisis FACS (véase la Tabla 3), mientras que el 3 se unía a lectina. Esto sugiere que los fetos 1, 2, y 4 no portan el epítipo alfa 1,3 gal para el que

esta lectina particular es específica.

Tabla 3. Resultados de FACS de células 680B1-1 a 680B1-4 con lectina GS-IB4

Células positivas a lectina GS IB4 (%)

Célula	Sin tinción	50 µg/ml lectina IB4	100 µg/ml lectina IB4
Células HeLa (CTL negativas)	1%	2%	2,8%
Células PCFF4-6 (CTL positivas)	0,2%	76%	91%
Células PFF4 (CTL positivas)	1,5%	82%	94%
Células 680B 1-1	0,6%	0,8%	0,9%
Células 680B 1-2	1,2%	1,2%	1,1%
Células 680B 1-3	8%	35%	62%
Células 680B 1-4	0,6%	0,8%	0,9%

Se realizó un ensayo de fijación del complemento sobre células de los cuatro fetos. El ensayo de lisis del complemento se desarrolló como un bioensayo para la ausencia de expresión de alfa gal. El suero humano contiene elevados niveles de anticuerpos preformados contra alfa gal así como el repertorio completo de proteínas reguladoras del complemento (la vía C3). La presencia de alfa gal sobre la superficie de una célula, después de la unión del anticuerpo anti-alfa gal, activa la cascada del complemento, y provoca lisis celular mediada por el complemento. Las células alfa-gal negativas serían resistentes a la lisis mediada por el complemento. En tres ensayos diferentes, se expusieron células de cerdo B1 y de control a suero humano más el complemento, y se realizaron ensayos para evaluar la sensibilidad o resistencia a la lisis celular mediada por el complemento inducida por alfa-gal. El ensayo se realizó con células B1-1, B1-2, y B1-4, así como células GT KO heterocigóticas (B1-3, gal positivas), y con células de cerdo PCFF4-6 alfa-gal (+) de tipo silvestre como control. Las células se expusieron a uno de tres tratamientos; dos controles negativos, albúmina sérica bovina (BSA), y suero humano inactivado por calor (HIA-HS) no contienen ninguna proteína del complemento funcional y por tanto no se esperaba que causaran ninguna lisis celular significativa; el tercer tratamiento, suero humano no inactivado por calor (NHS) contiene el complemento humano funcional así como anticuerpos específicos anti-gal, y por tanto se esperaba que lisara células que tiene galactosa alfa 1,3 galactosa sobre su superficie celular.

Los resultados mostrados en la Figura 1 demuestran claramente que las células B1-1, B-2 y B1-4 son resistentes a la lisis mediada por el complemento humano mientras que las células B1-3, que son α 1,3 Gal positivas, son aún tan sensibles a plasma humano como las células PCFF4-6 de tipo silvestre.

Los resultados de secuenciación del ADNc de todos los fetos indicaron que los fetos 1, 2 y 4 contienen una mutación puntual en el segundo alelo alfa 1,3 GT, un cambio que podría producir una enzima disfuncional (véase la figura 2). Esta mutación sucedía en el pb 424 de la región codificante, significativamente, el segundo par de bases del exón 9, del gen de la alfa-1,3-GT (GGTA1) (Nº de acceso a GenBank L36152) como una conversión de un resto de timina a guanina, que provoca una sustitución aminoacídica de tirosina en el aa 142 en un ácido aspártico.

Esto es una conversión significativa, ya que la tirosina, un aminoácido hidrófilo, es un componente crítico del sitio de unión a UDP de alfa 1,3GT (véase la Fig. 3). El análisis de la estructura cristalina de la proteína alfa-1,3-GT bovina mostró que esta tirosina es el centro del dominio catalítico de la enzima, y está implicada en la unión UDP-Gal (Gastinel et al., EMBO Journal 20(4): 638-649, 2001). Por lo tanto, se esperaba que un cambio de tirosina (un aminoácido hidrófobo) en ácido aspártico (un aminoácido hidrófilo) causara la alteración de la función α GT (como se observa).

Para confirmar que el ADNc mutado no creará proteína α GT funcional, se clonaron los ADNc del segundo alelos de las 4 células en un vector de expresión y este vector de expresión de GT se introdujo por transfección en células fibroblásticas humanas (células HeLa) así como en células primarias de mono Rhesus. Como los seres humanos y los monos del viejo mundo carecen del gen de la alfa 1,3 GT funcional, las células HeLa no tendrían una alfa 1,3 galactosa sobre su superficie celular (como se ensayó por experimentos de unión a lectina). Los resultados mostraron que las células HeLa y de mono, cuando se transfectaban con ADNc obtenido de células B1-1, B1-2 y B1-4, aún eran α 1,3 Gal negativas por tinción con IB4-lectina, mientras células HeLa y de mono Rhesus transfectadas con ADNc de la célula B1-3, creaban un transcrito funcional de alfa 1,3 GT y posteriormente eran α 1,3Gal positivas. Claramente, las células con la mutación aspartato (en lugar de tirosina) no pueden crear alfa 1,3 galactosiltransferasa funcional.

EJEMPLO 4:

Generación de Cerdos Clonados Usando Fibroblastos Fetales Deficientes en Alfa 1,3 GT Homocigóticos como Donantes Nucleares

Preparación de células para transferencia nuclear. Las células donantes se manipularon genéticamente para producir células homocigóticas para la deficiencia de alfa 1,3 GT como se ha descrito en líneas generales anteriormente. La transferencia nuclear se realizó por métodos que son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Dai et al., Nature Biotechnology 20: 251-255, 2002; y Polejaeva et al., Nature 407:86-90, 2000), usando fibroblastos porcinos seleccionados con toxina A como donantes nucleares que se produjeron como se ha descrito en detalle anteriormente en este documento.

Transferencia de embriones y nacimientos vivos resultantes. En el intento inicial de producir cerdos vivos alfa-1,3-GT dKO por transferencia nuclear, se realizó un total de 16 transferencias de embriones con células donantes manipuladas genéticamente. Se establecieron nueve preñeces iniciales pero solamente dos llegaron más allá del día 75 de gestación. Cinco lechones nacieron el 25 de julio de 2002. Un lechón murió inmediatamente después del nacimiento y otros cuatro nacieron vivos y parecían normales (Figura 4).

EJEMPLO 5:

Análisis de cerdos knockout para alfa 1,3 GT homocigóticos

Se obtuvieron células fibroblásticas del rabo y secciones de tejido umbilical de los 5 lechones knockout doble y se tiñeron usando la lectina GS-IB4 como se ha descrito previamente. No se observó tinción, lo que indicia una ausencia completa del epítipo galactosa alfa 1,3 galactosa sobre la superficie de los tejidos de estos animales (datos no mostrados). Células endoteliales de la aorta y fibroblastos musculares y del rabo del lechón muerto (761-1) eran negativos con tinción con lectina GS-IB4. El análisis de FACS de fibroblastos musculares del lechón 761-1 también mostró un resultado negativo para la unión a GS-IB4. Secciones tisulares de hígado, riñón, bazo, piel, intestino, músculo, cerebro, corazón, páncreas, pulmón, aorta, lengua, ombligo, y rabo obtenidas del lechón 761-1 eran todas negativas con tinción con GS-IB4, lo que indica una ausencia completa de epítipos alfa 1,3Gal de superficie celular detectables (Phelps et al., Science 299: 411-414, 2003 incluyendo la figura S3).

Se realizó un ensayo de inmunogenicidad in vivo con ratones knockout para alfa 1,3GT. Se inyectaron grupos celulares tipo islote (ICC) aislados del páncreas del lechón 761-1 por vía intraperitoneal en ratones knockout para alfa 1,3GT. Se usaron ICC de un lechón tipo silvestre neonato como control. Como se muestra en la fig. 5, no se observó aumento en el título de inmunoglobulina M (IgM) contra alfa 1,3 gal en ratones knockout para alfa 1,3GT después de la inyección con ICC del lechón alfa 1,3GT DKO, en contraste con los aumentos significativos del título de IgM observados en aquellos ratones inyectados con ICC de lechón de tipo silvestre (Phelps et al., Science 299: 411-414, 2003 incluyendo la figura S4). Este resultado demuestra claramente que las células de lechón DKO no crean ningún epítipo alfa 1,3Gal.

La secuenciación del ADN obtenido de los cinco lechones confirmó la presencia de la mutación en el pb 424 del gen GGTA1, como se observa en las células 680B1-2 usadas para clonar estos animales (Figura 2).

Desde esta primera producción satisfactoria de una camada de cerdos alfa-GT dKO, se han producido dos camadas posteriores de lechones dKO por transferencia nuclear, en un caso (camada 662) usando los fibroblastos fetales dKO como células donantes nucleares. La camada 660 se produjo por transferencia nuclear usando células fibroblásticas del rabo de un miembro de la camada 761 como donante nuclear. Estos nacimientos se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4: Resumen de nacimientos knockout doble para alfa-GT producidos por transferencia nuclear

ID camada	Donante nuclear	Nº nacimientos	Nacimientos vivos
761	680B:1-2	5	4
662	680B:1-2	1	0
660	761-5	4	2

EJEMPLO 6:

Cruce de cerdos macho y hembra knockout simple (SKO) para alfa 1,3 GT heterocigóticos para establecer una minipira de cerdos knockout doble (DKO)

Se ha generado un total de 29 cerdos hembra GT-SKO clonados confirmados por transferencia de Southern y 25 cerdos macho GT-SKO clonados confirmados por transferencia de Southern hasta la fecha. Estos

machos y hembras heterocigóticos (cerdos knockout simple para el gen de la alfa1,3GT) se han cruzado por cruce natural y por inseminación artificial (IA), para generar una piara de cerdos DKO para su uso en estudios preclínicos y ensayos clínicos humanos. Se han producido 16 lechones alfa1,3-GT DKO de 13 camadas.

- 5 Esta invención se ha descrito con referencia a realizaciones ilustrativas. Otras realizaciones de la invención general descrita en este documento y modificaciones serán evidentes para los especialistas en la técnica y todas se consideran dentro del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un cerdo que carece de cualquier expresión de alfa 1,3 galactosiltransferasa funcional.
- 5 2. Un órgano de un cerdo que carece de cualquier expresión de alfa 1,3 galactosiltransferasa funcional.
3. El órgano de la reivindicación 2, en el que el órgano es un riñón, un hígado, un corazón, un pulmón o un páncreas.
- 10 4. Un tejido de un cerdo que carece de cualquier expresión de alfa 1,3 galactosiltransferasa funcional.
5. El tejido de la reivindicación 4, en el que el tejido es cartílago, hueso tejido adiposo o músculo.
- 15 6. Una célula o línea celular de un cerdo que carece de cualquier expresión de alfa 1,3 galactosiltransferasa funcional.
7. La célula de la reivindicación 6, en donde la célula se deriva del páncreas.
8. La célula de la reivindicación 7, en donde la célula es un islote de Langerhans o una célula que secreta insulina.
- 20 9. Una célula, tejido u órgano que se puede obtener de un cerdo de acuerdo con la reivindicación 1 para su uso en el xenotransplante como un suplemento o reemplazo in vivo o ex vivo para células recipientes, líneas celulares, tejido u órganos.
- 25 10. El cerdo, órgano, tejido o célula de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde ambos alelos están inactivados mediante un acontecimiento de modificación genética.
11. El cerdo, órgano, tejido o célula de la reivindicación 10, en donde el acontecimiento de modificación genética es recombinación homóloga.

Figura 1

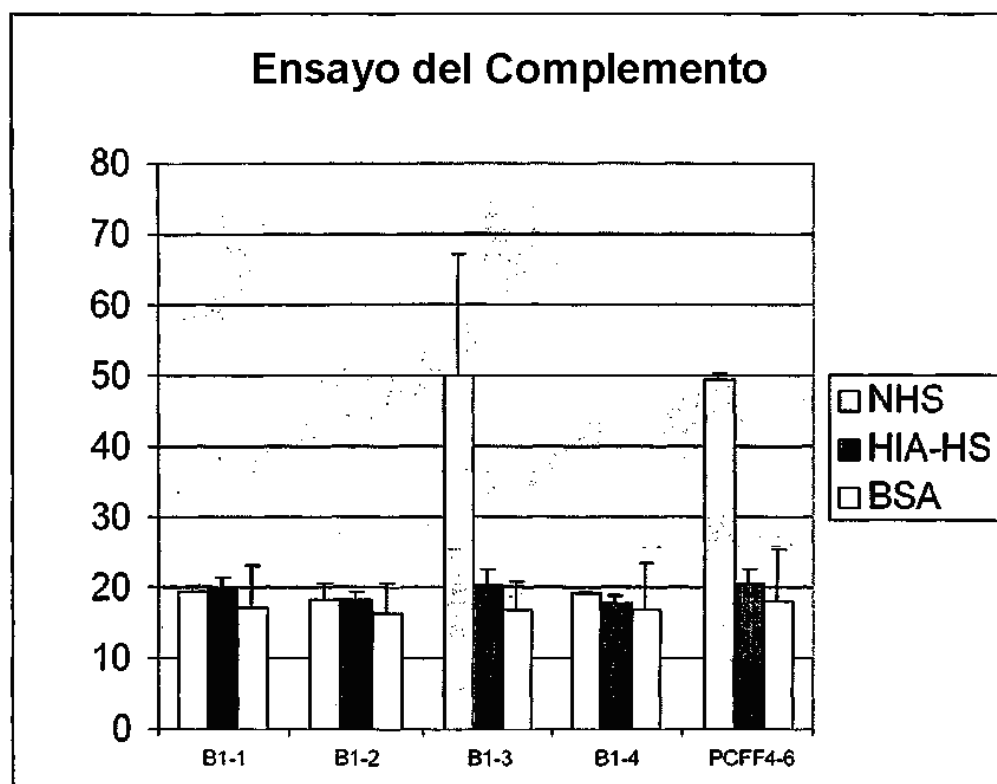


Figura 2

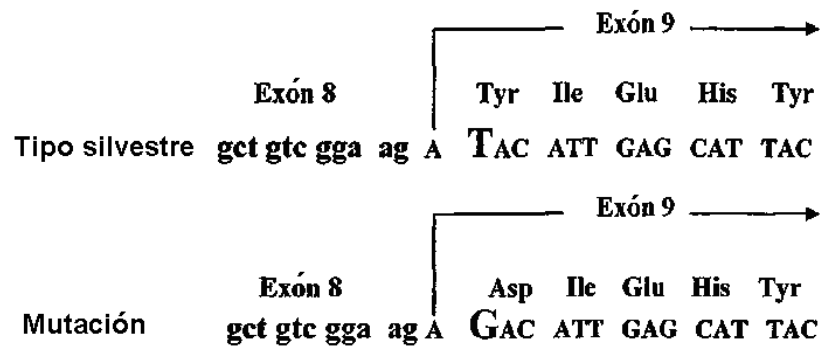


Figura 3

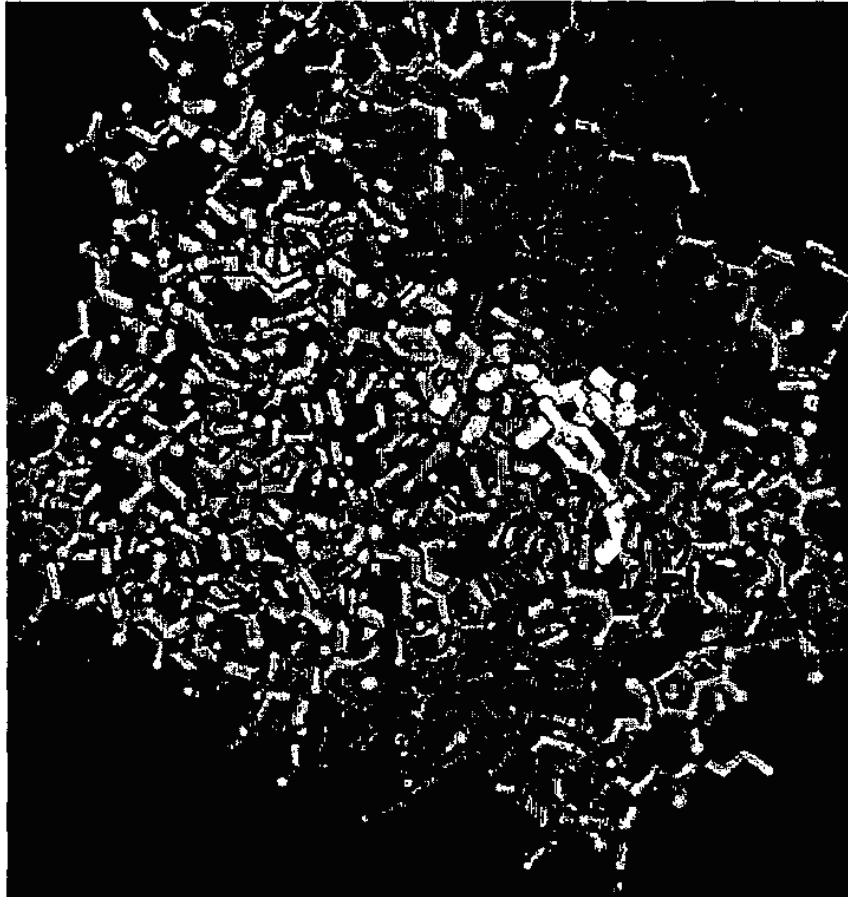


Figura 4

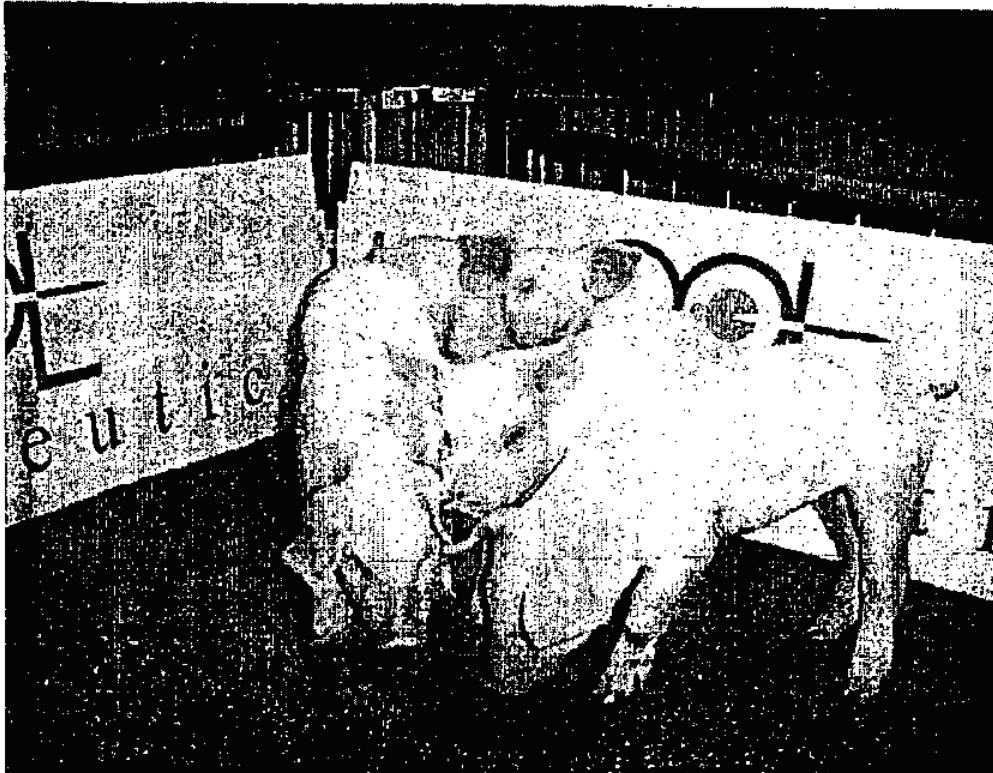


Figura 5

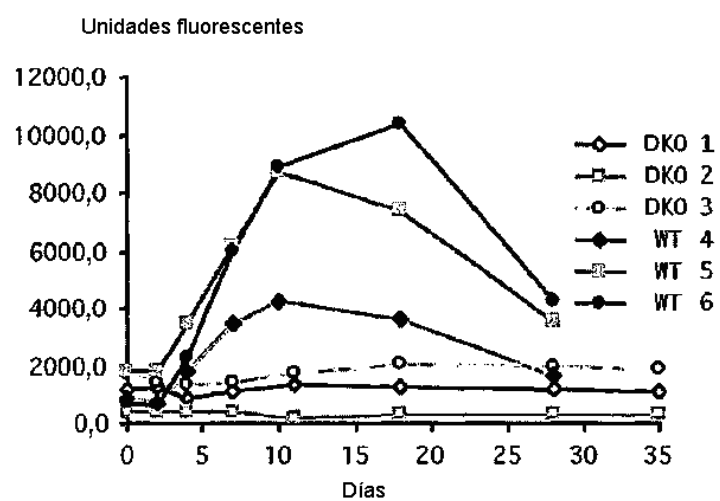


Figura 6

A

