

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 569**

51 Int. Cl.:

A01K 67/00	(2006.01)
A61F 2/02	(2006.01)
A61F 2/08	(2006.01)
A61F 2/10	(2006.01)
A61F 2/28	(2006.01)
A61L 27/36	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2005** **E 11186264 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018** **EP 2433492**

54 Título: **Productos de tejidos derivados de animales que carecen de cualquier expresión de alfa-1,3-galactosiltransferasa funcional**

30 Prioridad:

17.03.2004 US 553895 P
06.04.2004 US 559816 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.09.2018

73 Titular/es:

REVIVICOR INC. (100.0%)
1700 Kraft Drive Suite 2400
Blacksburg, VA 24060, US

72 Inventor/es:

AYARES, DAVID y
ROHRICHT, PAUL

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 680 569 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).

DESCRIPCION

Productos de tejidos derivados de animales que carecen de cualquier expresión de alfa-1,3-galactosiltransferasa funcional

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una prótesis como se define en la reivindicación 1. En el presente documento se divulgan tejidos derivados de animales que carecen de cualquier expresión de alfa-1,3-galactosiltransferasa (alfa, 3GT) funcional. Tales tejidos pueden usarse en el campo de xenotrasplantes, tales como reconstrucción y reparación ortopédica, reparación de la piel y reparación de tejido interno, o como dispositivos médicos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los animales rumiantes, tales como porcinos, ovinos y bovinos, se consideran fuentes probables de órganos y tejidos de xenoinjerto. A los xenoinjertos porcinos se les ha prestado la mayor atención ya que el abastecimiento de cerdos es abundante, los programas de cría están bien establecidos y su tamaño y fisiología son compatibles con los seres humanos. Otras fuentes de rumiantes, tales como bovinos u ovinos, también se han sugerido como fuente para xenoinjertos de tejido duro y blando. Sin embargo, hay varios obstáculos que deben vencerse antes de que la transferencia de estos órganos o tejidos a seres humanos pueda ser satisfactoria. El más significativo es el rechazo inmunitario. El primer obstáculo inmunológico es el "rechazo hiperagudo" (HAR). El HAR se define por la presencia ubicua de altos títulos de anticuerpos naturales previamente formados que se unen al tejido extraño. Se cree que la unión de estos anticuerpos naturales a epítopes diana sobre el endotelio de tejido del donante es el evento iniciador en HAR. Esta unión, en el plazo de minutos desde la perfusión del tejido del donante con la sangre del receptor, va seguida de activación del complemento, deposición de plaquetas y de fibrina y, por último lugar, por edema intersticial y hemorragia en el órgano del donante, todos los cuales producen rechazo del tejido en el receptor (Strahan y col. (1996) *Frontiers in Bioscience* 1, e34-41).

15

20

25

30

El tejido más frecuentemente trasplantado en seres humanos es el hueso (J. M. Lane y col., *Current Approaches to Experimental Bone Grafting*, 18 *Orthopedic Clinics of North America* (2) 213 (1987)). En los Estados Unidos solo se realizan cada año más de 100.000 procedimientos de injerto o implante de hueso para la reparación o sustitución de defectos óseos resultantes de traumatismo, infección, malformación congénita o tumor maligno. El hueso humano es un tejido conjuntivo duro que consiste en células incorporadas en una matriz extracelular de sustancia fundamental mineralizada y fibras de colágeno (Stedman's Medical Dictionary, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1995)).

35

40

Los injertos e implantes de hueso se forman frecuentemente de hueso autólogo. Sin embargo, frecuentemente no está disponible tejido de hueso autólogo trasplantable para grandes defectos, particularmente en niños. Además, el trasplante de hueso autólogo puede producir morbilidad posoperatoria tal como dolor, hemorragia, problemas de heridas, incapacidad cosmética, infección o daño al nervio en el sitio del donante. Además, dificultades en la fabricación de la forma funcional deseada del tejido de hueso autólogo trasplantado pueden producir menos llenado óptimo del defecto óseo.

45

Los tejidos blandos, tales como tendones, ligamentos, cartílago, piel, tejido del corazón y válvulas, y tejidos submucosos, también se trasplantan comúnmente en seres humanos. Gran parte de la estructura y muchas de las propiedades del tejido original pueden ser retenidas en trasplantes mediante el uso de materiales de xenoinjerto. El tejido de xenoinjerto representa un suministro ilimitado de material disponible si puede procesarse para ser seguro para el trasplante en un ser humano.

50

Una vez implantado en un individuo, un xenoinjerto provoca reacciones inmunogénicas tales como rechazo crónico e hiperagudo del xenoinjerto. Debido a este rechazo, los xenoinjertos de hueso presentan elevadas tasas de fractura, resorción y pseudoarticulación. El principal obstáculo inmunológico para el uso de tejidos animales, tales como porcinos, bovinos u ovinos, como implantes en seres humanos es el anticuerpo anti-galactosa-alfa-1,3-galactosa natural, que comprende aproximadamente el 1 % de los anticuerpos en seres humanos y monos.

55

60

Excepto los monos del viejo mundo, los simios superiores y los seres humanos, la mayoría de los mamíferos llevan glucoproteínas sobre sus superficies celulares que contienen el epítipo galactosa-alfa-1,3-galactosa (Galili y col., *J. Biol. Chem.* 263: 17755-17762, 1988). A diferencia, las glucoproteínas que contienen galactosa-alfa-1,3-galactosa se encuentran en grandes cantidades sobre células de otros mamíferos, tales como cerdos. Seres humanos, simios superiores y monos del viejo mundo no tienen una galactosa-alfa-1,3-galactosa y tienen un anticuerpo anti-galactosa-alfa-1,3-galactosa que se produce naturalmente que se produce en alta cantidad (Cooper y col., *Lancet* 342:682-683, 1993). Se une específicamente a glucoproteínas y glucolípidos que llevan galactosa-alfa-1,3Galactosa.

65

Esta distribución diferencial del "epítipo alfa-1,3-GT" y anticuerpos anti-Gal (es decir, anticuerpos que se unen a glucoproteínas y glucolípidos que llevan galactosa-alfa-1,3-galactosa) en mamíferos es el resultado de un proceso evolutivo que seleccionó especies con alfa-1,3-galactosiltransferasa inactivada (es decir, mutada) en primates del

viejo mundo ancestrales y seres humanos. Así, los seres humanos son “naturalmente defectuosos” en alfa-1,3-GT. Un resultado directo de este evento es el rechazo de xenoinjertos, tales como el rechazo de órganos de cerdo trasplantados en seres humanos inicialmente mediante HAR.

5 Se ha implementado una variedad de estrategias para eliminar o modular la respuesta humoral anti-Gal producida por xenotrasplante porcino, que incluye la eliminación enzimática del epítipo con alfa-galactosidasas (Stone y col., Transplantation 63: 640-645, 1997), eliminación de anticuerpo anti-Gal específico (Ye y col., Transplantation 58: 330-337, 1994), encapuchado del epítipo con otros restos de hidrato de carbono, que dejaron de eliminar la expresión de alfa-1,3-GT (Tanemura y col., J. Biol. Chem. 27321: 16421-16425, 1998 y Koike y col., Xenotransplantation 4: 147-153, 1997) y la introducción de proteínas inhibitoras del complemento (Dalmasso y col., Clin. Exp. Immunol. 86: 31-35, 1991, Dalmasso y col., Transplantation 52:530-533 (1991)). Costa y col. (FASEB J 13, 1762 (1999)) informaron que la inhibición competitiva de alfa-1,3-GT en cerdos transgénicos para H-transferasa produce solo la reducción parcial en el número de epítipes. Similarmente, Miyagawa y col. (J Biol. Chem 276, 39310 (2001)) informaron que los intentos por bloquear la expresión de epítipes de gal en cerdos transgénicos para N-acetilglucosaminiltransferasa III también produjeron solo reducción parcial de los número de epítipes de gal y dejaron de prolongar significativamente la supervivencia del injerto en receptores de primate.

20 Badylak y col. desarrollaron un proceso para aislar tejido submucoso del intestino delgado de cerdos para su uso en una variedad de injertos de tejido que incluyen injertos de tejido conjuntivo para la reparación de ligamentos de la rodilla (ligamento cruzado anterior) y reparación del manguito de los rotadores del hombro. El material de la submucosa del intestino delgado (SIS) se trata usando etapas químicas y enzimáticas para desnudar el tejido de células viables, dejando una matriz extracelular acelular que estimula el crecimiento hacia adentro de células huésped y la regeneración de tejido (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 4.902.508, 4.956.178 y 5.372.821). Este proceso se utiliza actualmente para injertos de tejido humano. Sin embargo, a pesar de las etapas de tratamiento químico, los residuos de azúcar de galactosa-alfa-1,3-galactosa siguen incorporados en el injerto y producen activación inmunitaria e inflamación en pacientes humanos (Allman y col., 2001, Transplantation 71, 1631-1640; Mcpherson y col., 2000, Tissue Engineering 6(3), 233-239).

30 Stone y col. desarrollaron un proceso para tratar tejido blando y tejido de hueso porcino para eliminar material celular seguido de tratamiento con alfa-galactosilidasa para eliminar la galactosa-alfa-1,3-galactosa del tejido antes del trasplante (Stone y col., Transplantation 1997: 63: 646-651; Stone y col., Transplantation 1998: 65:1577-83). Este proceso ha sido objeto de numerosas publicaciones de patente, que tratan el uso de tal tejido para una variedad de aplicaciones, tales como reparación del ligamento cruzado anterior, reparación de menisco, xenoinjertos de cartílago articular, xenoinjertos de submucosa, xenoinjertos de hueso y de matriz ósea, sustitución de las válvulas del corazón y xenoinjertos de tejido blando, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 5.865.849, 5.913.900, 5.984.858, 6.093.204, 6.267.786, 6.455.309, 6.683.732, 5.944.755, 6.110.206, 6.402.783 y 5.902.338; solicitudes de patente de EE.UU. n° 2002/0087211, 2001/0051828, 2001/0039459, 2003/0039678, 2003/0023304 y 2003/0097179; y publicaciones PCT n° WO 00/47131, WO 00/47132, WO 99/44533, WO 02/076337, WO 99/51170, WO 99/47080, WO 03/097809, WO 02/089711, WO 01/91671 y WO 03/105737.

40 Así, hay una necesidad en la materia de proporcionar injertos de tejido que no produzcan efectos perjudiciales en los seres humanos.

45 Costa y col. (FASEB (2003) 17: 109-111) informaron que el rechazo retrasado de cartílago porcino trasplantado en ratones no mutados y deficientes en α -1,3-galactosiltransferasa se reduce por la expresión transgénica de α 1,2-fucosiltransferasa (transgénica para HT) en el cartílago.

50 Se ha informado de deficiencias de un único alelo del sitio de alfa-1,3-GT en células porcinas y animales vivos. Denning y col. (Nature Biotechnology 19: 559-562, 2001) informaron de la delección del gen elegido como diana de un alelo del gen alfa-1,3-GT en ovejas. Harrison y col. (Transgenics Research 11: 143-150, 2002) informaron de la producción de células de fibroblastos fetales porcinos somáticos deficientes en alfa-1,3-GT heterocigóticas. En 2002, Lai y col. (Science 295: 1089-1092, 2002) y Dai y col. (Nature Biotechnology 20: 251-255, 2002) informaron de la producción de cerdos, en los que un alelo del gen alfa-1,3-GT se inactivó satisfactoriamente. Ramsoondar y col. (Biol of Reproduc 69, 437-445 (2003)) informó de la generación de cerdos deficientes en alfa-1,3-GT heterocigóticos que también expresaban alfa-1,2-fucosiltransferasa (HT) humana, que expresaron tanto epítipes de HT como de alfa-1,3-GT.

60 La publicación PCT n° WO 94/21799 y la patente de EE.UU. n° 5.821.117 concedida a Austin Research Institute; publicación PCT n° WO 95/20661 concedida a Bresatec; y la publicación PCT n° WO 95/28412, la patente de EE.UU. n° 6.153.428, la patente de EE.UU. n° 6.413.769 y la publicación de EE.UU. n° 2003/0014770 concedida a BioTransplant, Inc. y The General Hospital Corporation proporcionan una discusión de la producción de células porcinas negativas para alfa-1,3-GT basándose en el conocimiento del ADNc del gen alfa-1,3-GT (y sin conocimiento de la organización genómica o secuencia). Sin embargo, no hubo evidencia de que tales células se produjeran en realidad antes de la fecha de presentación de estas solicitudes y los ejemplos fueron todos proféticos.

65

- 5 La primera divulgación pública de la producción satisfactoria de una célula porcina negativa para alfa-1,3-GT heterocigótica se produjo en julio de 1999 en la Conferencia sobre Animales Transgénicos del Lago Tahoe (David Ayares, PPL Therapeutics, Inc., "Gene Targeting in Livestock", Transgenic Animal Research Conference, julio de 1999, resumen, p. 20; Ayares, IBS News Report, Nov. 1999: 5-6). Hasta recientemente, nadie había publicado o desvelado públicamente la producción de una célula porcina negativa para alfa-1,3-GT homocigótica. Además, como los embriocitoblastos porcinos no han estado disponibles hasta la fecha, no hubo forma y todavía no la hay de usar un embriocitoblasto homocigótico para alfa-1,3-GT para intentar preparar un cerdo deficiente en alfa-1,3-GT homocigótico vivo.
- 10 El 27 de febrero de 2003, Sharma y col. (Transplantation 75:430-436 (2003)) publicaron un informe que demostró una producción satisfactoria de células de fibroblastos de cerdo fetal homocigóticas para la inactivación del gen alfa-1,3-GT.
- 15 La publicación PCT nº WO 00/51424 concedida a PPL Therapeutics describe la modificación genética de células somáticas para la transferencia nuclear. La presente solicitud de patente desvela la rotura genética del gen 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 alfa-1,3-GT para la transferencia nuclear.
- 20 La patente de EE.UU. nº 6.331.658 concedida a Cooper & Koren reivindica, pero no confirma, ninguna producción real de mamíferos genéticamente manipulados que expresen una proteína sialiltransferasa o fucosiltransferasa. La patente asegura que los mamíferos genéticamente manipulados presentarían una reducción de epítopes de proteínas galactosiladas sobre la superficie celular del mamífero.
- 25 La publicación PCT nº WO 03/055302 concedida a The Curators de la Universidad de Missouri confirma la producción de cerdo en miniatura deficiente en alfa-1,3-GT heterocigótico para su uso en xenotrasplante. La presente solicitud se refiere generalmente a un cerdo deficiente que incluye un gen alfa-1,3-GT alterado, en el que la expresión de alfa-1,3-GT funcional en el cerdo deficiente *disminuye* en comparación con el no mutante. La presente solicitud no proporciona ninguna orientación en cuanto al grado que debe *disminuirse* alfa-1,3-GT de forma que el cerdo sea útil para el xenotrasplante. Además, la presente solicitud no proporciona ninguna prueba de que los cerdos heterocigóticos que se produjeron presentaron una expresión *reducida* de alfa-1,3-GT funcional. Además, aunque la solicitud se refiere a cerdo deficiente en alfa-1,3-GT homocigótico, no hay evidencia en la solicitud de que fuera en realidad producido o producible, mucho menos si la descendencia resultante sería viable o fenotípicamente útil para xenotrasplante.
- 30 El agotamiento total de las glucoproteínas que contienen galactosa-alfa-1,3-galactosa es claramente el mejor enfoque para la producción de animales porcinos para xenotrasplante. Es teóricamente posible que las inactivaciones dobles, o la rotura de ambas copias del gen alfa-1,3-GT, pudieran producirse por dos métodos: 1) cría de dos animales deficientes en un único alelo para producir progenie, en cuyo caso, se predeciría basándose en la genética mendeliana que uno de cada cuatro debería tener inactivaciones dobles o 2) modificación genética del segundo alelo en una célula con una única inactivación preexistente. En realidad, esto ha sido bastante difícil como se ilustra por el hecho de que mientras que la primera solicitud de patente sobre células porcinas deficientes se presentó en 1993, el primer cerdo deficiente en alfa-1,3-GT homocigótico no se produjo hasta julio de 2002 (descrito en el presente documento).
- 35 Los ratones transgénicos (no cerdos) han sido históricamente el modelo preferido para estudiar los efectos de las modificaciones genéticas sobre la fisiología del mamífero, por varios motivos, entre ellos que los embriocitoblastos de ratón han estado disponibles mientras que los embriocitoblastos porcinos no han estado disponibles. Los ratones son animales ideales para aplicaciones de investigación básica debido a que son relativamente fáciles de manipular, se reproducen rápidamente y pueden manipularse genéticamente al nivel molecular. Los científicos usan los modelos de ratón para estudiar las patologías moleculares de una variedad de enfermedades genéticamente basadas, de cáncer de colon a retraso mental. Miles de ratones genéticamente modificados se han creado hasta la fecha. Se ha creado una "Base de datos de inactivaciones y mutaciones de ratones" por BioMedNet para proporcionar una completa base de datos de información fenotípica y genotípica de inactivaciones de ratones y mutaciones clásicas (<http://research.bmn.com/mkmd>; Brandon y col., Current Biology 5[7]:758-765(1995); Brandon y col., Current Biology 5[8]:873-881(1995)), esta base de datos proporciona información sobre más de 3.000 genes únicos, que han sido elegidos como diana en el genoma del ratón hasta la fecha.
- 40 Basándose en esta amplia experiencia con ratones, se ha aprendido que la tecnología transgénica tiene algunas limitaciones significativas. Debido a los defectos del desarrollo, muchos ratones genéticamente modificados, especialmente ratones nulos creados por la tecnología de inactivación de genes, mueren de embriones antes de que el investigador tenga la oportunidad de usar el modelo para la experimentación. Incluso si los ratones sobreviven, pueden desarrollar fenotipos significativamente alterados, que pueden convertirlos en gravemente inválidos, deformes o debilitados (Pray, Leslie, The Scientist 16 [13]: 34 (2002); Smith, The Scientist 14[15]:32, (2000); Brandon y col., Current Biology 5[6]:625-634(1995); Brandon y col., Current Biology 5[7]:758-765(1995); Brandon y col., Current Biology 5[8]:873-881(1995); <http://research.bmn.com/mkmd>). Además, se ha aprendido que no es
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

posible predecir si un gen dado desempeña o no una función crítica en el desarrollo del organismo, y, así, si la eliminación del gen producirá o no un fenotipo letal o alterado, hasta que la inactivación se haya creado satisfactoriamente y se produzca descendencia viable.

5 Se han modificado genéticamente ratones para eliminar la expresión de alfa-1,3-GT funcional. Se han producido ratones doblemente deficientes en alfa-1,3-GT. Son viables en el desarrollo y tienen órganos normales (Thall y col., J Biol Chem 270:21437-40(1995); Tearle y col., Transplantation 61:13-19 (1996), véase también la patente de EE.UU. nº 5.849.991). Sin embargo, fueron evidentes dos anomalías fenotípicas en estos ratones. Primera, todos los ratones desarrollan cataratas corticales densas. Segunda, la eliminación de ambos alelos del gen alfa-1,3-GT afectó significativamente el desarrollo de los ratones. El cruce de ratones heterocigóticos para el gen alfa-1,3-GT produjo relaciones de genotipo que se desviaron significativamente de la relación 1:2:1 mendeliana predicha (Tearle y col., Transplantation 61:13-19 (1996)).

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

20 A pesar de las predicciones y exposiciones proféticas, nadie sabía si la alteración de ambos alelos del gen alfa-1,3-GT sería letal o afectaría el desarrollo porcino o produciría un fenotipo alterado (Ayares y col., Graft 4(1)80-85 (2001); Sharma y col., Transplantation 75:430-436 (2003); Porter & Dallman Transplantation 64:1227-1235 (1997); Galili, U. Biochimie 83:557-563 (2001)). De hecho, muchos expertos en el campo expresaron serias dudas en cuanto a si los cerdos deficientes en alfa-1,3-GT homocigóticos serían en absoluto viables, mucho menos si se desarrollarían normalmente. Así, hasta que no se produjo un cerdo doblemente deficiente en alfa-1,3-GT viable, según aquellos expertos en la materia en el momento, no fue posible determinar (i) si la descendencia sería viable o (ii) si la descendencia mostraría un fenotipo que permitiera el uso de los órganos para el trasplante en seres humanos.

30 Tales cuestiones se expresaron hasta que se produjo un cerdo doblemente deficiente. En 2003, Phelps y col. (Science 299:411-414 (2003)) informaron de la producción de los primeros cerdos vivos que carecían de cualquier expresión funcional de alfa-1,3-galactosiltransferasa, que representó un importante descubrimiento en el xenotrasplante.

35 La publicación PCT nº WO 04/028243 presentada por Revivicor, Inc. describe la producción satisfactoria de cerdos viables, además de órganos, células y tejidos derivados de los mismos, que carecían de cualquier expresión funcional de alfa-1,3-galactosiltransferasa. La publicación PCT nº WO 04/016742 presentada por Immerge Biotherapeutics, Inc. también describe la producción de cerdos deficientes en alfa-1,3-galactosiltransferasa.

40 Adicionalmente, el documento US2012/115208 divulga constructos de tejido desceluralizado de tejidos blandos y duros que son útiles como andamiajes. Estos tejidos se usan en trasplante humano

Es, por tanto, un objetivo de la presente invención proporcionar productos de tejidos que puedan trasplantarse en seres humanos sin causar rechazo significativo.

45 Es otro objetivo de la presente invención proporcionar tejidos de animales para su uso en reconstrucción y reparación ortopédica, reparación de la piel y reparación de tejido interno en seres humanos.

RESUMEN DE LA INVENCION

50 La presente invención proporciona una prótesis que comprende un producto de tejido de acuerdo con la reivindicación 1. El producto de tejido se deriva de un animal porcino que carece de cualquier expresión funcional de alfa-1,3-galactosiltransferasa y en donde el producto de tejido es un andamiaje. La prótesis puede ser para su uso como xenoinjerto. El tejido puede ser tejido duro, como hueso, o tejido blando, como dérmico. Este tejido duro y blando puede usarse, por ejemplo, en la reconstrucción y reparación ortopédica, reparación de la piel y/o reparación de tejido interno. En una realización específica, el animal es un cerdo. Los tejidos de animales que carecen de cualquier expresión funcional del gen alfa-1,3-GT pueden obtenerse de un animal porcino prenatal, neonatal, inmaduro o completamente maduro. Los tejidos pueden prepararse de acuerdo con los métodos descritos en este documento para su uso en la reparación de tejidos animales, como humanos.

60 En realizaciones de la presente invención, se usan tejidos en los que los alelos del gen alfa-1,3-GT se inactivan, de forma que la enzima alfa-1,3-GT resultante puede ya no generar galactosa-alfa-1,3-galactosa sobre la superficie celular. En una realización, el gen alfa-1,3-GT puede transcribirse en ARN, pero no se traduce en proteína. En otra realización, el gen alfa-1,3-GT puede transcribirse en una forma truncada inactiva. Un ARN truncado tal puede tanto no traducirse como puede traducirse en una proteína no funcional. En una realización alternativa, el gen alfa-1,3-GT puede inactivarse de tal forma que no se produzca transcripción del gen.

En un aspecto de la presente invención, se usan tejidos en los que al menos un alelo del gen alfa-1,3-GT se inactiva mediante un evento de elección de diana genética. En otro aspecto de la presente invención, se usan tejidos de animales en los que ambos alelos del gen alfa-1,3-GT se inactivan mediante un evento de elección de diana genética. El gen puede ser elegido como diana mediante recombinación homóloga. En otras realizaciones, el gen puede alterarse, es decir, puede alterarse una porción del código genético, afectando así la transcripción y/o traducción de ese segmento del gen. Por ejemplo, la alteración de un gen puede producirse mediante técnicas de sustitución, delección ("inactivación") o inserción ("activación"). También pueden insertarse genes adicionales para una proteína deseada o secuencia reguladora que modulan la transcripción de una secuencia existente.

Como un aspecto de la invención, se usan tejidos de animales que llevan al menos una mutación puntual en el gen alfa-1,3-GT. Tales animales están libres de genes de resistencia a antibióticos y así tienen el potencial de producir un producto más seguro para uso humano. Así, otro aspecto de la invención usa tejido de una inactivación de alfa-1,3-GT homocigótica que no tiene genes resistentes a antibióticos u otros genes marcadores de selección, tales como neomicina, puromicina, higromicina, zeocina, hisD o blasticidina. En una realización, esta mutación puntual puede producirse mediante un evento de elección de diana genética. En otra realización, esta mutación puntual puede producirse naturalmente. En otra realización, pueden inducirse mutaciones en el gen alfa-1,3-GT mediante un agente mutagénico. En una realización específica, la mutación puntual puede ser una mutación de T a G en la segunda base del exón 9 del gen alfa-1,3-GT (véase la Figura 2; Phelps y col., Science 299:411-414 (2003)). 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 inactivar el gen alfa-1,3-GT. En otras realizaciones, se usan tejidos en los que ambos alelos del gen alfa-1,3-GT contienen mutaciones puntuales que previenen cualquier expresión de alfa-1,3-GT funcional. En una realización específica, se usan tejidos que contienen la mutación de T a G en la segunda base del exón 9 en ambos alelos del gen alfa-1,3-GT. En otra realización, un alelo se inactiva por un evento de elección de diana genética y el otro alelo se inactiva debido a la presencia de una mutación puntual de T a G en la segunda base del exón 9 del gen alfa-1,3-GT. En una realización específica, se usan tejidos de animales en los que un alelo se inactiva mediante una construcción que elige diana dirigida al exón 9 y el otro alelo se inactiva debido a la presencia de una mutación puntual de T a G en la segunda base del exón 9 del gen alfa-1,3-GT (véase la Figura 2; Phelps y col., Science 299:411-414 (2003)).

En una realización adicional, puede obtenerse tejido duro o blando de animales que carecen de cualquier expresión funcional del gen alfa-1,3-GT que también puede contener modificaciones genéticas adicionales. Tales modificaciones genéticas pueden incluir adiciones y/o delecciones de otros genes para prevenir el rechazo, promover la cicatrización, y/o minimizar o eliminar patógenos no deseados (tales como, por ejemplo, priones o retrovirus).

En el presente documento se divulgan productos de tejido en los que el tejido se usa en su forma "nativa" (retirado directamente del animal). El tejido divulgado puede someterse a tratamiento o modificación adicional. Se divulgan tejidos descelularizados que se derivan de los animales o tejidos descritos en el presente documento. También se divulgan en el presente documento métodos y procesos para preparar y obtener el tejido de un animal que carece de cualquier expresión de alfa-1,3-galactosiltransferasa funcional.

En ciertas realización, procesos para preparar tejido pueden incluir las etapas de quitar o destruir todas las células viables (descelularización), dejando atrás solo una matriz acelular o andamiaje para su uso en reparación y remodelación de tejido, además de, opcionalmente, tratamientos para la reticulación y esterilización. En una realización particular, se proporciona cualquier tejido duro o blando descelularizado que se derive de los animales desvelados en el presente documento. En una realización, se proporciona tejido dérmico blando descelularizado. En otra realización, se proporciona tejido submucoso descelularizado. En otras realización, tal material descelularizado puede ser menos inmunogénico. En otras realizaciones, tales tejidos descelularizados pueden usarse como andamiaje o matriz para la reparación y/o reconstrucción de partes particulares del cuerpo humano. En una realización, el tejido descelularizado puede usarse para la reparación de los siguientes, que incluyen, pero no se limitan a, hernia, pared abdominal, manguito de los rotadores, cirugía cosmética o cualquier otro defecto del tejido blando conocido para un experto en la materia o desvelado en el presente documento. En realizaciones particulares, se proporciona material submucoso y o descelularizado dérmico.

Los tejidos y la fuente animal de los tejidos pueden modificarse adicionalmente o tratarse para promover la cicatrización; minimizar o eliminar patógenos no deseados, tales como transmisión de enfermedades infecciosas (tal como priones y retrovirus); añadir factores de crecimiento para promover la remodelación de tejido, esterilizar el tejido y/o mejorar las propiedades biomecánicas o físicas del tejido. Tales tratamientos pueden ser químicos, tales como tratamiento con alcohol o peróxido, mecánicos o físicos, tal como enzimático y/o exposición a un gas, radiación ultravioleta o irradiación gamma.

En otra realización, los tejidos de animales que carecen de cualquier expresión funcional del gen alfa-1,3-GT pueden combinarse con otros materiales inertes tales como plásticos, metales (que incluyen, pero no se limitan a, acero inoxidable y titanio) con el fin de proporcionar resistencia mecánica adicional o para otros beneficios al paciente receptor.

Los tejidos de animal que carecen de cualquier expresión funcional del gen alfa-1,3-GT se usan como un andamiaje, que sirve para reclutar las células del recipiente en el sitio del material trasplantado. Este andamiaje también puede contener componentes de la matriz extracelular (ECM), tales componentes de ECM pueden derivarse opcionalmente de un animal que carece de cualquier expresión funcional del gen alfa-1,3-GT. También se divulgan en el presente documento productos de tejido en lo que el tejido puede usarse como un reemplazo de tejido completo, de tal manera que, por ejemplo, el tejido trasplantado realiza la misma funcionalidad biomecánica del tejido que se está reemplazando o reparando. En una realización adicional, el tejido puede acondicionarse previamente (químicamente y/o mecánicamente) antes del trasplante para permitir el intervalo óptimo de movimiento del tejido tras el trasplante, o para permitir un "ajuste a medida" para el receptor, o para proporcionar de otro modo propiedades biológicas o biomecánicas óptimas.

En una realización de la presente invención, el tejido duro y blando de animales que carecen de cualquier expresión de alfa-1,3-galactosiltransferasa funcional puede usarse en reconstrucción y reparación ortopédica. Tales tejidos incluyen tejido conjuntivo, tendones, ligamentos, músculo, cartílago, hueso y derivados de hueso. En una realización, el tejido puede usarse para la reparación de rodilla, tal como la sustitución del ligamento cruzado anterior (ACL) o ligamento cruzado posterior (PCL). En otra realización, el tejido puede usarse para injertos de hueso-tendón-hueso, reparación del manguito de los rotadores o como tapones de sutura. Puede usarse tejido óseo como sustitución de hueso completa o parcial, tapones de hueso, tornillos de hueso o astillas de hueso (incluyendo preparaciones en las que las astillas de hueso pueden prepararse como una pasta). El tejido de hueso también puede usarse para aplicaciones periodontales o como separadores espinales.

En otra realización, el tejido duro y blando de animales que carecen de cualquier expresión de alfa-1,3-galactosiltransferasa funcional puede usarse en reparación de la piel, por ejemplo, para la reparación de quemaduras de tejido profundo de la piel. Los tejidos de la piel incluyen, pero no se limitan a, tejido dérmico o epidérmico o derivados de los mismos.

En otro aspecto de la presente invención, el tejido duro y blando de animales que carecen de cualquier expresión de alfa-1,3-galactosiltransferasa funcional puede usarse en la reparación de tejido interno, tal como reparación de la pared abdominal, reparación de hernia, reparación o sustitución de las válvulas del corazón, cirugía/reparación cosmética, reparación maxilofacial, para la reparación de tejidos ginecológicos o urológicos, y reparación de la duramadre. Los tejidos internos incluyen tejido pericárdico, válvulas del corazón y tejido submucoso. En una realización, el tejido submucoso puede usarse para la reparación o sustitución de tejido conjuntivo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

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

La **Figura 2** representa un segmento corto de la región codificante del gen alfa-1,3-GT (véase acceso GenBank nº L36152) en el que se produce la mutación puntual seleccionada por la toxina A. La secuencia superior se produce en no mutante; 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 alfa-1,3-GT bovina. El anillo aromático del residuo de tirosina (primer plano, blanco) puede observarse en estrecha proximidad a la base de uracilo de 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 divulgación, nacidos en julio de 2002.

La **Figura 5** es una gráfica que representa niveles de IgM anti-alfa-1,3-gal antes y después de inyecciones de agrupaciones de células similares a islotes de lechones (ICC) en ratones deficientes en alfa-1,3-GT. Cada ratón recibió tres inyecciones de ICC en serie i.p. (200-500 ICC por inyección) durante 4 días. Los tres receptores de ICC de lechones no mutantes (WT) mostraron una elevación significativa del título de IgM anti-alfa-1,3-Gal y posterior regreso al nivel inicial 4 semanas después de los implantes de ICC. Los sueros de tres ratones inyectados con ICC de lechones alfa-1,3-GT DKO mantuvieron bajos valores iniciales del título de IgM anti-alfa-1,3-gal durante el tiempo de observación de 35 días (Phelps y col., Science 299:411-414, 2003, Figura S4).

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

La **Figura 7** proporciona una visión general de la anatomía de la rodilla. Muestra una vista frontal de la rodilla derecha en una posición flexionada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención son productos de tejido de animales porcinos que carecen de cualquier expresión funcional de alfa-1,3-galactosiltransferasa para su uso como xenoinjertos. El tejido puede ser tejido duro, tal como hueso, o tejido blando, tal como dérmico. Este tejido duro y blando puede usarse para xenotrasplante, tal como reconstrucción y reparación ortopédica, reparación de la piel y reparación de tejido interno. El animal puede ser un rumiante o un ungulado, tal como un bovino, porcino o ovino. En una realización específica, el animal es un cerdo. Los tejidos de animales que carecen de cualquier expresión funcional del gen alfa-1,3-GT pueden obtenerse de un animal porcino prenatal, neonatal, inmaduro, o completamente maduro.

En realizaciones de la presente invención, los alelos del gen alfa-1,3-GT se vuelven inactivos, de forma que la enzima alfa-1,3-GT resultante ya no puede generar galactosa alfa1,3-galactosa sobre la superficie celular.

En el presente documento se divulgan productos de tejido en los que el tejido se usa en su forma "nativa" (retirado directamente del animal).

El tejido divulgado en el presente documento puede someterse a tratamiento o modificación adicional.

En una realización de la presente invención, el tejido duro y blando de animales que carecen de cualquier expresión de alfa-1,3-galactosiltransferasa funcional puede usarse en reconstrucción y reparación ortopédica. En otra realización, el tejido duro y blando de animales que carecen de cualquier expresión de alfa-1,3-galactosiltransferasa funcional puede usarse en reparación de la piel. En otro aspecto de la presente divulgación, el tejido duro y blando de animales que carecen de cualquier expresión de alfa-1,3-galactosiltransferasa funcional puede usarse en reparación de tejido interno.

Definiciones

Como se usa en el presente documento, el término "animal" (como en "animal genéticamente modificado (o alterado)") se pretende que incluya cualquier animal no humano, particularmente cualquier mamífero no humano, que incluye, pero no se limita a cerdos, ovejas, cabras, ganado vacuno (bovino), venado, mulas, caballos, monos, perros, gatos, ratas, ratones, aves, pollos, reptiles, peces e insectos. En una realización de la divulgación, se proporcionan cerdos genéticamente alterados y métodos de producción de los mismos.

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

Como se usa en el presente documento, un "tejido" es una estructura organizada que comprende células y las sustancias intracelulares que las rodean. El "tejido" solo o conjuntamente con otras células o tejidos puede desempeñar una o más funciones biológicas. El tejido puede ser tejido duro o blando. Un "producto de tejido" incluye un tejido y/o un fragmento de tejido o tejido derivado del mismo como se describe en el presente documento. Este "producto de tejido" puede usarse para la sustitución o reparación de un tejido humano. Tales "productos de tejidos" pueden modificarse, tal como, pero no se limitan a, descelularizarse, según los métodos descritos en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, los términos "porcino", "animal porcino" y "cerdo" son términos genéricos con referencia al mismo tipo de animal sin considerar el sexo, tamaño o raza.

Como se usa en el presente documento, el término prótesis o dispositivo protésico se refiere a un tejido duro o blando que se ha confeccionado en una forma apropiada para la reparación del cuerpo. En una realización, el cuerpo que se repara puede ser un cuerpo humano. En otras realizaciones, las partes del cuerpo de mamífero pueden repararse, por ejemplo, caballos, perros, gatos u otros animales domésticos.

TIPOS Y PREPARACIÓN DE TEJIDO

Los tejidos de animal que carecen de cualquier expresión funcional del gen alfa-1,3-GT pueden obtenerse de un animal porcino prenatal, neonatal, inmaduro, o completamente maduro.

También se divulgan en la presente productos de tejido en los que el tejido se usa en su forma "nativa" (retirado directamente del animal).

El tejido divulgado en el presente documento puede someterse a tratamiento o modificación adicional. Los tejidos y la fuente animal de los tejidos pueden modificarse o tratarse adicionalmente para promover la cicatrización; minimizar o eliminar patógenos no deseados, tales como transmisión de enfermedad infecciosa (tal como priones y retrovirus); añadir factores de crecimiento para promover la remodelación de tejido, esterilizar el tejido y/o mejorar las propiedades biomecánicas o físicas del tejido.

En una realización, el tipo de tratamiento puede ser químico, mecánico o físico, tal como enzimático y/o exposición a

un gas, tratamiento con óxido de etileno, tratamiento con óxido de propileno, esterilización con plasma gaseoso, esterilización con ácido peracético, radiación ultravioleta o irradiación gamma. Los métodos de la invención incluyen, solos o en combinación, tratamiento con radiación, uno o más ciclos de congelación y descongelación, tratamiento con un agente de reticulación químico, tratamiento con alcohol u ozonación. Cuando más de uno de estos tratamientos se aplica al xenoinjerto, los tratamientos pueden producirse en cualquier orden.

En una realización, el tejido de xenoinjerto puede tratarse por exposición a radiación ultravioleta, por ejemplo, exposición a radiación ultravioleta durante aproximadamente quince minutos. En otra realización, el tejido puede exponerse a radiación gamma. El tejido puede exponerse a radiación gamma en una cantidad de 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 7,0, 10, 15 ó 20 MegaRad, o entre aproximadamente 0,5 a 3 ó 1,5 a 2,0 MegaRad. En otra realización, el xenoinjerto puede someterse a ozonación. En otras realizaciones, el tejido puede tratarse según patrones aceptados para la esterilización, véase, por ejemplo, American National Standard, ANSI/AAMI/ISO 11137-1994, Sterilization of health care products - Requirements for validation and routine control - Radiation sterilization, 1994, American National Standard, ANSI/AAMI ST32-1991, Guidelines for Gamma Radiation Sterilization, 1991, Scholla, M.H. y Wells, M.E. "Tracking Trends in Industrial Sterilization". Medical Device and Diagnostic Industry, September 1997, pp. 92-95, AAMI Recommended Practice - "Process Control Guidelines for Gamma Radiation Sterilization of Medical Devices", ISBN No. 0-910275-38-6, pp. 7-21, 1984, American National Standard, ANSI/AAMI/ISO 11137 - 1994, Sterilization of health care products-Requirements for validation and routine control- Radiation sterilization, 1994, American National Standard, ANSI/AAMI ST32-1991, Guideline for Gamma Radiation Sterilization, 1991, American National Standard, ANSI/AAMI ST31-1990, Guideline for Electron Beam Radiation Sterilization of Medical Devices, 1990, Genova, Hollis, Crowell y Schady, "A Procedure for Validating the Sterility of an Individual Gamma Radiation Sterilized Production Batch", Journal of Parenteral Science and Technology, Volume. 41, No. 1, pp. 33-36, Jan 1987, y Gaughran y Morrissey, "Sterilization of Medical Products", Volume 2, ISBN-0-919868-14-2, pp. 35-39, 1980.

En otra realización, el tejido de xenoinjerto puede tratarse por inmersión en una disolución de alcohol. Puede usarse cualquier disolución de alcohol para realizar este tratamiento, que incluye, pero no se limita a, alcoholes primarios, alcoholes secundarios, alcoholes terciarios, polioles, alcoholes de orden superior, alcoholes aromáticos, tales como fenol, alcoholes heteroaromáticos, etanol, metanol, propanol, metil-propanol, alcohol isopropílico, 2-propanol, ciclobutanol, 1,2-etanodiol 4,4-dimetil-2-pentanol, 4-penten-2-ol, 4-amino-3-isopropilhexanol, 5-mercapto-2,4-ciclohexadienol. Las disoluciones de alcohol pueden ser alcohol al 10, 20, 30, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 ó 99 %. Por ejemplo, una disolución al 70 % de isopropanol. La disolución de alcohol puede usarse a temperatura ambiente (tal como aproximadamente 20-30 °C, o 25 °C) o a bajas temperaturas (tales como aproximadamente 0-20 °C).

En otra realización, el tejido de xenoinjerto puede tratarse por ciclos de congelación/descongelación. Por ejemplo, el tejido de xenoinjerto puede congelarse usando cualquier método de congelación. En una realización, el tejido está completamente congelado, de forma que no queda ningún punto caliente interior que contenga tejido descongelado. En una realización, el tejido de xenoinjerto puede sumergirse en nitrógeno líquido durante un periodo de tiempo. El tejido puede sumergirse durante aproximadamente al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ó 15 minutos. En otra realización, el xenoinjerto puede congelarse. Por ejemplo, el tejido puede ponerse en un congelador o exponiendo el tejido a temperaturas a o por debajo de 0 °C. Entonces, en la siguiente etapa del tratamiento del ciclo de congelación/descongelación, el tejido de xenoinjerto puede descongelarse por inmersión en una disolución adecuada, por ejemplo, un baño de solución salina isotónica. La temperatura del baño puede ser aproximadamente a temperatura ambiente, tal como aproximadamente 25 °C. El tejido puede sumergirse en el baño de solución salina durante un periodo de tiempo que permite la descongelación, por ejemplo, al menos 5, al menos 10 o al menos 15 minutos. En otras realizaciones, el tejido puede tratarse con crioprotectores antes de o durante el tratamiento de congelación-descongelación.

En todavía otra realización, el xenoinjerto puede exponerse a un agente químico para curtir o reticular las proteínas dentro de la matriz extracelular. Puede usarse cualquier agente curtierte o reticulante para este tratamiento, y puede realizarse más de una etapa de reticulación o puede usarse más de un agente de reticulación para lograr un alto grado de reticulación. Los agentes reticulantes pueden actuar, por ejemplo, del siguiente modo: acoplando un grupo amina sobre una biomolécula a un grupo tiol sobre una segunda biomolécula, formando enlaces cruzados entre aminas de biopolímeros, reticulando aminas y tioles, formando enlaces cruzados entre aminas y ácidos carboxílicos o tioles y ácidos carboxílicos.

En una realización, pueden usarse aldehídos, tales como glutaraldehído, formaldehído, paraformaldehído, formalina, aldehídos, dialdehído adípico, curtido a pH ácido y similares, para reticular el colágeno dentro de la matriz extracelular del tejido. En otra realización, pueden usarse diaminas alifáticas y aromáticas, carbodiimidias, diisocianatos, y otros materiales conocidos por un experto en la materia, como agentes reticulantes. En una realización, el tejido de xenoinjerto puede tratarse con glutaraldehído. Por ejemplo, el tejido puede ponerse en una disolución tamponada que puede contener al menos el 0,25, 0,5, 1, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o el 20 % o aproximadamente del 0,05 a aproximadamente al 5,0%; aproximadamente el 1-3 % o aproximadamente el 2-7 % de glutaraldehído. Esta disolución puede tener un pH de aproximadamente 7,4, 7,5 ó 7,6. Puede usarse

cualquier tampón adecuado, tal como solución salina tamponada con fosfato o tris(hidroximetil)aminometano. En una realización alternativa, el tejido de xenoinjerto puede tratarse con un agente reticulante en una forma de vapor. En una realización, el agente reticulante puede ser un agente reticulante de aldehído vaporizado tal como, por ejemplo, formaldehído vaporizado. En una realización, el tejido puede exponerse a un agente reticulado vaporizado a una concentración de al menos el 0,25, 0,5, 1, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 o el 20% o aproximadamente el 0,05 a aproximadamente el 5,0 %; aproximadamente el 1-3 % o aproximadamente el 2-7 %. En otra realización, el pH del agente reticulante vaporizado puede ser aproximadamente 7,4, 7,5 ó 7,6. En otra realización, el tejido puede tratarse con un agente reticulante durante al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13, al menos 14, al menos 15 o al menos 16 días. En realizaciones específicas, el tejido puede tratarse con un agente reticulante durante 3, 4 ó 5 días.

También pueden seleccionarse agentes reticulantes del grupo que incluye, pero no se limitan a: ditiotreitolo (DTT, D-1532), tris-(2-carboxietil)fosfina (TCEP, T-2556) tris-(2-cianoetil)fosfina (T-6052), 3-(2-piridilditio)propionato de succinimidilo (SPDP, S-1531), acetiltioacetato de succinimidilo (SATA, S-1553), mercaptotriptófano, SPDP/DTT en combinación, SPDP/TCEP en combinación, dibromobimano (D-1379), BODIPY FL bis-(metileno)acetamida (D-10620), bis-((N-yodoacetil)piperazinil)sulfonrodamina (B-10621), bis(imido ésteres); bis(succinimidil ésteres), diisocianatos, dicloruros de ácido, bis-(4-carboxipiperidinil)sulfonrodamina, di(succinimidil éster) (B-10622), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC, E-2247), éster succinimidílico de ácido 6-((acrililo)amino)hexanoico (acrililo-X, SE; A-20770) y estreptavidina-acrilamida (S-21379, Sección 7.5).

En otra realización, los tejidos de animales que carecen de cualquier expresión funcional del gen alfa-1,3-GT pueden combinarse con otros materiales inertes tales como plásticos, biopolímeros y metales (que incluyen, pero no se limitan a, acero inoxidable y titanio) con el fin de proporcionar resistencia mecánica adicional o para otros beneficios de aplicación para el paciente receptor. Los biopolímeros incluyen, pero no se limitan a, celulosa, ácido alginico, quitosano, colágeno, elastina, y reticulina y análogos de los mismos, y mezclas de los mismos.

En otras realizaciones, las prótesis pueden incluir adicionalmente materiales sintéticos, tales como polímeros y cerámicas. Cerámicas apropiadas incluyen, por ejemplo, hidroxiapatita, alúmina, grafito y carbono pirrolítico. Materiales sintéticos apropiados incluyen hidrogeles y otros materiales sintéticos que no pueden resistir una deshidratación grave. Los xenoinjertos también pueden contener polímeros sintéticos, además de polímeros biológicos purificados. Estos polímeros sintéticos pueden estar tejidos planos o tricotados en una malla para formar una matriz o estructura similar. Alternativamente, los materiales de polímero sintético pueden moldearse o colarse en formas apropiadas.

Polímeros sintéticos apropiados incluyen sin limitación poliamidas (por ejemplo, nailon), poliésteres, poliestirenos, poliácridatos, polímeros de vinilo (por ejemplo, polietileno, politetrafluoroetileno, polipropileno y poli(cloruro de vinilo)), policarbonatos, poliuretanos, polidimetilsiloxanos, acetatos de celulosa, poli(metacrilatos de metilo), etileno-acetatos de vinilo, polisulfonas, nitrocelulosas y copolímeros similares. También pueden usarse polímeros biorresorbibles tales como dextrano, hidroxietilalmidón, gelatina, derivados de gelatina, polivinilpirrolidona, poli(alcohol vinílico), poli[N-(2-hidroxipropil)metacrilamida], poli(hidroxiácidos), poli(épsilon-caprolactona), ácido poliláctico, ácido poliglicólico, poli(ácido dimetilglicólico), poli(hidroxibuterato), y copolímeros similares. Estos materiales poliméricos sintéticos pueden estar tejidos planos o tricotados en una malla para formar una matriz o sustrato. Alternativamente, los materiales de polímero sintético pueden moldearse o colarse en formas apropiadas.

Los polímeros biológicos pueden producirse naturalmente o producirse *in vitro* por fermentación y similares o por ingeniería genética recombinante. Puede usarse tecnología de ADN recombinante para manipular prácticamente cualquier secuencia de polipéptidos y a continuación amplificar y expresar la proteína en tanto células bacterianas como de mamífero. Los polímeros biológicos purificados pueden formarse apropiadamente en un sustrato por técnicas tales como tejeduría en plano, tejeduría de punto, colada, moldeo, extrusión, alineamiento celular y alineamiento magnético. Polímeros biológicos adecuados incluyen, sin limitación, colágeno, elastina, seda, queratina, gelatina, poliaminoácidos, polisacáridos (por ejemplo, celulosa y almidón) y copolímeros de los mismos.

También se divulgan en el presente documento productos de tejido en los que el tejido puede usarse como un reemplazo de tejido completo, de tal manera que, por ejemplo, el tejido trasplantado realiza la misma funcionalidad biomecánica del tejido que está reemplazando o reparando. En otra realización de la invención, el tejido puede acondicionarse previamente (químicamente y/o mecánicamente) antes del trasplante para permitir el intervalo óptimo de movimiento del tejido tras el trasplante, o para permitir un "ajuste a medida" para el receptor.

El tejido divulgado en el presente documento puede tratarse y/o procesarse adicionalmente como se describe más adelante para formar productos descelularizados, que pueden usarse, como andamiaje, una vez implantados.

A. RECONSTRUCCIÓN, REPARACIÓN Y/O SUSTITUCIÓN DE TEJIDO

En una realización de la presente divulgación, el tejido duro y blando de animales que carecen de cualquier

expresión de alfa-1,3-galactosiltransferasa funcional puede usarse para aplicaciones quirúrgicas. En una realización, el tejido puede usarse en reconstrucción y reparación ortopédica. Tales tejidos incluyen tejido blando, tal como tejido conjuntivo, tendones, ligamentos, músculo y cartílago, además de tejido duro, tal como hueso y derivados de hueso. En una realización, el tejido puede usarse para la reparación de rodilla, tal como la sustitución del ligamento cruzado anterior (ACL) o el ligamento cruzado posterior (PCL). En otra realización, el tejido puede usarse para injertos de hueso-tendón-hueso, reparación del manguito de los rotadores o como tapones de sutura. El tejido de hueso puede usarse como sustitución de hueso completa o parcial, tapones de hueso, tornillos de hueso o astillas de hueso (que incluyen preparaciones en las que las astillas de hueso pueden prepararse como una pasta). El tejido de hueso también puede usarse para aplicaciones periodontales, reconstrucción cosmética y/o maxilofacial. El tejido también puede usarse como separadores espinales para la reparación de vértebras. El tejido también puede usarse para sustituir tejido de la oreja, tal como osículos, membranas timpánicas, membranas timpánicas con martillos unidos, tapones de hueso del oído, huesos temporales, cartílago costal y duramadre), que pueden usarse opcionalmente para la reconstrucción del oído interno. Sólo los productos de tejido que forman un andamiaje son parte de la invención.

1. Tejido de hueso

En el presente documento se divulga un método de preparación de un xenoinjerto de hueso para la implantación o injerto en un ser humano, que incluye extraer al menos una porción de un hueso o una pieza entera de hueso de un animal para proporcionar un xenoinjerto.

El hueso se obtiene de animales porcinos. En una realización, el hueso se obtiene de cerdos inmaduros. El hueso de animales más jóvenes consiste en hueso más esponjoso y es generalmente menos frágil que el de animales mayores. En otra realización, el hueso se obtiene de un animal de entre seis y dieciocho meses de edad.

Puede sacarse una porción de hueso intacto de un hueso del animal. El hueso puede recogerse de animales recién sacrificados. Alternativamente, el hueso puede extraerse quirúrgicamente de animales viables. Los huesos que se extraen pueden incluir, pero no se limitan a, hueso del cráneo, tal como anterior, lateral o posterior; vertebras, tales como cervicales (atlas, axis, típicas), torácicas (superior, inferior), lumbar (superior, inferior, lateral), sacro, pelvis, tórax, esternón, costilla, hueso de extremidad superior, omóplato, ventral, dorsal, clavícula, húmero (anterior o posterior), radio-cúbito (anterior o posterior), mano (dorsal o palmar), fémur (anterior o posterior), tibia-peroné (anterior o posterior) y/o pie (dorsal o lateral). En una realización, después de extraer el hueso puede ponerse en una disolución isotónica estéril adecuada u otra disolución conservante de tejido. La recogida de las porciones de hueso después del sacrificio del animal puede hacerse tan pronto como sea posible después del sacrificio y puede realizarse a temperatura fría. Por ejemplo, entre aproximadamente 5 °C y aproximadamente 20 °C, aproximadamente 0 °C y aproximadamente 20 °C, aproximadamente 0 °C y aproximadamente 10 °C, o aproximadamente 0 °C y aproximadamente 25 °C.

El tejido de xenoinjerto puede entonces lavarse en agua estéril, opcionalmente fría, para eliminar proteínas de la sangre residuales y materiales solubles en agua. En una realización, el tejido de xenoinjerto puede entonces sumergirse en alcohol en condiciones tales como aquellas descritas anteriormente. El xenoinjerto puede someterse a tratamientos químicos, mecánicos o biológicos, tales como aquellos descritos anteriormente.

En una realización, la porción de hueso recogida puede cortarse en tiras o bloques. En otra realización, el hueso recogido puede prepararse en cualquier configuración útil de un injerto de hueso, que incluye, pero no se limita a, clavijas de hueso, separadores espinales, tapones de hueso, astillas de hueso, tornillos de hueso, cemento óseo, separadores en forma de D y anillos corticales. Pueden crearse tiras, bloques u otros injertos de hueso de forma que el hueso esponjoso se una al hueso cortical. Alternativamente, pueden crearse tiras, bloques u otros injertos de hueso de forma que el hueso esponjoso no se una al hueso cortical.

Cemento óseo y tapones de hueso

En el presente documento se divulgan cemento óseo y tapones de hueso derivados de animales que carecen de cualquier expresión de alfa-1,3-GT funcional.

Las composiciones de cemento óseo son útiles en la unión o fijación de un material de implante, además de en el fortalecimiento de hueso natural dañado. Tales aplicaciones son útiles en las áreas de, por ejemplo, ortopédica, odontología y disciplinas médicas relacionadas. El campo de la ortopédica trata defectos del hueso debidos a fractura, tumores de hueso y otras enfermedades del hueso. El tratamiento puede requerir resección quirúrgica de todo, o parte, de un hueso. En aplicaciones de odontología, una mandíbula defectuosa puede resultar de la extracción de un diente, cáncer u otras enfermedades. Un material de implante es útil en la reparación o reconstrucción del hueso que queda después de la resección de tales defectos del hueso. Los materiales de implante usados durante tales procedimientos pueden ser metal, cerámica y polímeros. Puede usarse cemento óseo, además de otro material de implante, para conectar y fijar el implante al hueso vivo restante. Por ejemplo, se ha usado ampliamente poli(metacrilato de metilo) (PMMA) con instrumentación de ferretería en ortopédica.

Aunque se ha usado cemento óseo de PMMA convencional en cirugía ortopédica durante más de 40 años, dista de lo ideal debido a que 1) no fomenta el crecimiento hacia adentro del hueso, 2) es un utensilio más débil que la corteza del hueso, y 3) tiene una alta exotermia y toxicidad monomérica. Así, la presente invención proporciona materiales de matriz, tales como aquellos descritos en el presente documento, que pueden formularse en cemento óseo. Tal cemento óseo puede presentar un tiempo de endurecimiento rápido y/o se une químicamente, para fijar un biomaterial artificial (por ejemplo, material de implante). Este cemento puede mostrar bioactividad *in vivo*, mantener la resistencia mecánica, caracterizarse por rigidez y módulo adecuados y/o mejorar la masa ósea mediante sus efectos físicos y químicos. El cemento óseo puede incluir un polvo y componente líquido. En una realización, el cemento óseo bioactivo se proporciona en una fase de polvo-líquido, que comprende un material en fase de polvo y un material en fase líquida. En otra realización, el cemento óseo bioactivo se proporciona en una fase de pasta-pasta, que comprende dos materiales de pasta separados. Adicionalmente, los materiales de cemento óseo proporcionados en el presente documento pueden combinarse con otros tipos de componentes de cemento óseo, tales como cemento óseo de PMMA. El cemento óseo puede usarse de cualquier manera convencional, tal como mediante inyección mediante una jeringa. El cemento óseo de la presente invención puede usarse, por ejemplo, en cirugía espinal mediante inyección con una jeringa. La inyección con jeringa proporciona una técnica de administración mínimamente invasiva mediante el uso de una jeringa y una aguja de perforación grande. También permite que el cemento se ajuste con precisión a su área de colocación. Adicionalmente, el cemento óseo o pasta puede combinarse con factores de crecimiento o citocinas, que incluyen, pero no se limitan a, proteínas morfogénicas óseas (BMP).

Pueden usarse tapones de hueso para el bloqueo permanente o temporal de un canal en un hueso largo. Para la fijación de una endoprótesis o articulación artificial, por ejemplo, una prótesis de cadera artificial, en un hueso, un eje de la prótesis se inserta en el canal intramedular de un hueso largo que está lleno de cemento óseo. Con el fin de prevenir que el cemento óseo sobresalga en el canal más de lo necesario para la fijación del vástago y para asegurar que el cemento óseo esté solo presente entre el vástago y la pared endóstica del hueso y para prevenir la fuga de cemento óseo más allá dentro del canal intramedular, el canal debajo del vástago se bloquea con un tapón de hueso (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 6.669.733, 6.494.883).

Los tapones de hueso pueden moldearse en una amplia variedad de tamaños y tener diversas relaciones de altura con respecto a diámetro con el fin de acomodar una amplia variedad de situaciones de sustitución de cartílago. El tapón de hueso puede tener una sección transversal poligonal o circular. Por ejemplo, el tapón puede ser un dispositivo redondo que tiene una forma que oscila de discos planos a cilindros. Pueden tenerse en cuenta una variedad de factores para cada aplicación particular, tal como la localización en la que el tapón o tapones de sustitución de hueso van a implantarse, el tamaño del defecto óseo que va a repararse y el tamaño y la forma de la cavidad vacía, bien como se forma inicialmente por resección del defecto, o bien por cualquier contorneado quirúrgico posterior de la cavidad, en la que va a implantarse el tapón de sustitución de cartílago.

También pueden usarse tapones de cemento óseo, tales dispositivos son muy conocidos en la técnica. Pueden usarse tapones de cemento óseo conjuntamente con dispensadores de cemento óseo para compactar el cemento óseo en un canal de hueso antes de fijar un dispositivo protésico en ese canal de hueso. A modo de ejemplo, pueden usarse tapones de cemento óseo conjuntamente con dispensadores de cemento óseo para compactar el cemento óseo en el canal intramedular del fémur antes de fijar el vástago femoral de una cadera artificial en ese canal. Más particularmente, en cirugías de artroplastia total, tales como artroplastia de cadera y de hombro, puede usarse cemento óseo para fijar los vástagos de los dispositivos protésicos en los canales medulares de los huesos de la articulación. En ese respecto, se ha encontrado generalmente que un dispositivo protésico se fijará de forma más segura en un canal de hueso si el cemento óseo puede compactarse bien en el canal del hueso antes de que el vástago del dispositivo protésico se posicione en el canal del hueso. En un ejemplo, después de la preparación y limpieza inicial del canal del hueso, la porción distal del canal puede ocluirse generalmente con un tapón. El tapón de cemento óseo puede servir para limitar el flujo incontrolado de cemento óseo en la porción distal del canal del hueso. En una realización específica, el tapón de cemento óseo puede limitar la columna de cemento óseo a aproximadamente 1 a 2 cm más allá de la punta distal del vástago de la prótesis. Después de que el tapón se haya fijado en la porción distal del canal del hueso, el cemento óseo puede inyectarse en la parte más distal del canal del hueso ocluido, adyacente al tapón, usando un dispensador de cemento óseo que tiene una boquilla larga. El canal del hueso puede entonces llenarse con cemento óseo de un modo retrógrado, sacando la boquilla del dispensador de cemento óseo del extremo distal del canal del hueso hacia el extremo proximal del canal del hueso, a medida que el cemento sale de la boquilla. Tal llenado retrógrado puede ayudar a evitar el atrapamiento de aire en la parte más distal del canal del hueso. Después de llenarse el canal del hueso con cemento óseo, un presurizador del canal del hueso puede entonces conectarse al dispensador de cemento óseo. El presurizador puede presionarse contra el extremo abierto del hueso de manera que bloquee el extremo proximal del canal del hueso. Entonces puede inyectarse más cemento en el canal del hueso mediante el presurizador y bajo presión. Bajo tal presurización, el cemento en el canal del hueso se mete en los intersticios de la superficie interna de la pared del hueso que define el canal del hueso. Cuando el cemento óseo fragua después, puede establecerse una micro-conexión entre el cemento y las irregularidades de la superficie interna de la pared del hueso. Esto puede potenciar significativamente la fijación del dispositivo protésico en el canal del hueso.

En una realización, el tapón de cemento óseo puede ser fácil de utilizar a la profundidad deseada en el canal del hueso, eficaz en cerrar ese canal del hueso y, en el supuesto caso de que el tapón de cemento óseo necesite sacarse posteriormente, fácil de recuperar del extremo distal del canal del hueso.

5 Se conocen una variedad de tapones de cemento óseo en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.245.359; 4.276.659; 4.293.962; 4.302.855; 4.344.190; 4.447.915; 4.627.434; 4.686.973; 4.697.584; 4.745.914; 4.936.859; 4.950.295; 4.994.085; 5.061.287; 5.078.746; 5.092.891; 5.376.120; 4.011.602; 4.523.587; 4.904.267, 6.299.642, 6.306.142 y 5.383.932, y el documento WO 94/15544.

10 Técnicas quirúrgicas para trasplantar tapones de hueso pueden implicar eliminar el tejido de hueso dañado taladrando o cortando un orificio en el sitio del daño, y taponando este orificio con un tapón de hueso. Pueden usarse instrumentos quirúrgicos para recoger o extraer un tapón de hueso de un sitio del donante de un animal que carece de cualquier expresión de alfa-1,3-GT funcional. El tapón de hueso puede entonces implantarse en un orificio previamente formado en un sitio del receptor. Un instrumento de recogida convencional puede incluir un tubo que
15 tiene un borde cortante en el extremo distal. Para extraer el tapón, el instrumento puede entrarse en el hueso en el sitio del donante y entonces sacarse, llevando con él un tapón de tejido de hueso.

Tornillos de hueso

20 En el presente documento se divulgan tornillos de hueso derivados de animales que carecen de cualquier expresión de alfa-1,3-GT funcional.

Un método de reducción de las fracturas de hueso puede ser usar dispositivos de fijación externa que permitan consolidar las fracturas en áreas altamente críticas, como pueden ser especialmente aquellas próximas a articulaciones, o fracturas que implican un daño grave al tejido cutáneo que va a tratarse, es decir, en cualquier parte
25 en la que el escayolado tradicional puede demostrar ser inapropiado o impracticable. Tales dispositivos, normalmente de construcción compleja y suministrados en configuraciones variables para la adaptación a las situaciones más impredecibles o contingentes, tienen extremos opuestos que se aseguran a porciones sin dañar respectivas del hueso roto, usando tornillos firmemente fijados en el material de hueso de estas porciones. Así, por
30 ejemplo en el caso de una fractura de tibia, los extremos opuestos de un dispositivo de fijación (tibial) correspondiente se aseguran a través de la región fracturada. En otros casos, en los que la fractura implica una articulación tal como un tobillo, los tornillos de hueso de un dispositivo de fijación externa correspondiente están fijos en la tibia y el astrágalo.

35 Los tornillos de hueso para asegurar el dispositivo de fijación externo, y así asegurar la eficacia del dispositivo, pueden incluir una cabeza de tornillo diseñada para la colocación por un destornillador adecuados, y un fuste del tornillo que tiene una porción roscada que normalmente decrece hacia una punta del tornillo en el extremo opuesto de dicha cabeza. La cabeza del tornillo puede estar formada con un plano que se extiende paralelo al eje del tornillo, fresado en un lado del fuste del tornillo. Los tornillos de hueso pueden ser de longitudes variables de forma que el
40 tornillo sea adecuado para el tamaño y forma particular del hueso en el que puede insertarse.

Separadores espinales

45 En el presente documento se divulgan componentes de la espina dorsal de animales que carecen de cualquier expresión de alfa-1,3-GT funcional. Tales componentes incluyen, pero no se limitan a, separadores espinales, discos intervertebrales, el núcleo pulposo y/o el anillo fibroso.

La fusión espinal se indica para proporcionar estabilización de la columna espinal para movimiento espinal doloroso y trastornos tales como deformidad estructural, inestabilidad traumática, inestabilidad degenerativa e inestabilidad
50 iatrogénica post-resección. La fusión, o artrodesis, se logra por la formación de un puente óseo entre segmentos de movimiento adyacentes. Esto puede llevarse a cabo dentro del espacio del disco, anteriormente entre cuerpos vertebrales contiguos o posteriormente entre procesos transversos consecutivos, láminas u otros aspectos posteriores de las vértebras. Una fusión satisfactoria requiere la presencia de células osteogénicas u osteopotenciales, riego sanguíneo adecuado, respuesta inflamatoria suficiente y preparación apropiada de hueso
55 local.

Puede realizarse un procedimiento de fusión o artrodesis para tratar una anomalía que implica un disco intervertebral. Los discos intervertebrales, localizados entre las placas terminales de vértebras adyacentes, estabilizan la columna espinal, distribuyen fuerzas entre las vértebras y amortiguan los cuerpos vertebrales. Un disco
60 intervertebral normal incluye un componente semi-gelatinoso, el núcleo pulposo, que está rodeado y confinado por un anillo fibroso externo llamado el anillo fibroso. En una columna espinal sin dañar sana, el anillo fibroso previene que el núcleo pulposo sobresalga fuera del espacio del disco.

Los discos espinales pueden desplazarse o dañarse debido a traumatismo, enfermedad o envejecimiento. La rotura
65 del anillo fibroso permite que el núcleo pulposo sobresalga en el canal vertebral, una condición comúnmente

denominada un disco herniado o hernia de disco. El núcleo pulposo de prolapso completo puede comprimir el nervio espinal, que puede producir daño del nervio, dolor, insensibilidad, debilidad muscular y parálisis. Los discos intervertebrales también pueden deteriorarse debido al proceso de envejecimiento normal o enfermedad. A medida que un disco se deshidrata y endurece, la altura del espacio del disco se reducirá, conduciendo a inestabilidad de la columna espinal, movilidad reducida y dolor. Un tratamiento para estas afecciones es una discectomía, o eliminación quirúrgica de una porción o todo un disco intervertebral, seguido de fusión de las vértebras adyacentes. La eliminación del disco dañado o no sano puede permitir que el espacio del disco colapse. El colapso del espacio del disco puede producir inestabilidad de la columna espinal, mecánica de articulaciones anormal, desarrollo prematuro de artritis o daño del nervio, además de dolor intenso. El alivio del dolor mediante discectomía y artrodesis requiere la preservación del espacio discal y la eventual fusión de los segmentos de movimiento afectados.

Pueden usarse injertos de hueso o separadores espinales para llenar el espacio intervertebral para prevenir el colapso del espacio discal y promover la fusión de las vértebras adyacentes a través del espacio discal. Muchos intentos por restaurar el espacio discal intervertebral después de eliminar el disco se han basado en dispositivos metálicos (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 4.878.915, 5.044.104; 5.026.373, 4.961.740; 5.015.247, 5.147.402 y 5.192.327)

Pueden prepararse componentes espinales de animales que carecen de expresión de alfa-1,3-GT funcional según métodos convencionales. El hueso puede obtenerse del animal y a continuación limpiarse para eliminar tejido y sangre. El hueso puede tratarse con agentes, tales como alcohol y peróxidos u otros agentes como se ha descrito anteriormente, para eliminar material celular, grasas y proteínas no colagenosas. El material de hueso puede tratarse para eliminar colágeno libre, dejando colágeno unido o estructural. Un agente para eliminar colágeno libre y cualquier grasa restante es dodecilsulfato de sodio (SDS).

2. Tejido blando

El tejido blando conecta, soporta o rodea otras estructuras y órganos del cuerpo. El tejido blando incluye, por ejemplo, músculos, tendones, grasa, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervios, tejido alrededor de las articulaciones, piel o cualquier otro tejido distinto de hueso.

Los tejidos blandos, tales como tejido conjuntivo, tendones, menisco, ligamentos, músculo y cartílago, pueden extraerse de una articulación de un animal. La fuente del tejido puede recogerse de animales recientemente sacrificados. Alternativamente, el tejido puede extraerse quirúrgicamente de animales viables. Cualquier articulación puede servir de fuente del tejido blando. En realizaciones de la invención, puede usarse tejido de una articulación del donante correspondiente para preparar el tejido de xenoinjerto. Por ejemplo, puede usarse cartílago de una articulación femuro-tibial (rodilla) para preparar un xenoinjerto de cartílago para la implantación en una rodilla. En otro ejemplo, puede usarse cartílago de una articulación de la cadera de animal donante para preparar xenoinjerto de cartílago para una articulación de la cadera humana.

En una realización, el tejido blando puede extraerse de la articulación de la rodilla. La rodilla es una articulación compleja que contiene huesos espacialmente interrelacionados, ligamentos y estructuras cartilaginosas que interaccionan para crear una variedad de movimientos. Específicamente, los cóndilos femorales se articulan con la meseta superficial de la tibia, mediante los meniscos mediales y laterales, y todas estas estructuras se mantienen en su sitio por diversos ligamentos. Hay esencialmente cuatro ligamentos separados que estabilizan la articulación de la rodilla (véase, por ejemplo, la Figura 7). En los lados de la articulación se encuentran el ligamento colateral medial (MCL) y el ligamento colateral lateral (LCL) que sirven de estabilizadores para la estabilidad latero-lateral de la articulación. El MCL es un ligamento más ancho que está en realidad constituido de dos estructuras de ligamento, los componentes profundo y superficial, mientras que el LCL es una estructura similar a cuerda distinta. En la parte delantera del centro de la articulación está el ligamento cruzado anterior (ACL). Este ligamento es un estabilizador muy importante del fémur sobre la tibia y sirve para prevenir que la tibia gire y se deslice hacia adelante durante las actividades de agilidad, salto y deceleración. Directamente detrás del ACL está su opuesto, el ligamento cruzado posterior (PCL). El PCL previene que la tibia se deslice a la parte posterior.

Los meniscos medial y lateral son estructuras comprendidas de células llamadas fibrocondrocitos, una matriz intersticial de fibras de la proteína colágeno, y dentro de una sustancia fundamental formada de proteoglicanos. Los meniscos sin dañar proporcionan la absorción de choques para la rodilla, asegurando la apropiada distribución de fuerzas, estabilización y lubricación para las superficies de huesos que interaccionan dentro de la articulación de la rodilla, que se exponen rutinariamente a carga de compresión repetida durante la actividad normal. Gran parte de la función de absorción de choques de los meniscos medial y lateral se deriva de las propiedades elásticas inherentes al cartílago. Cuando los meniscos se dañan mediante lesión, enfermedad o inflamación, se producen cambios artríticos en la articulación de la rodilla, con la consecuente pérdida de función.

El ligamento cruzado anterior de la rodilla (el ACL) funciona soportando el desplazamiento anterior de la tibia desde el fémur en todas las posiciones de flexión. El ACL también soporta la hiperextensión y contribuye a la estabilidad rotacional de la rodilla completamente extendida durante la rotación de la tibia interna y externa. El ACL puede

desempeñar una función en la propiocepción. El ACL está constituido de estructuras de tejido conjuntivo compuestas de células, agua, colágeno, proteoglicanos, fibronectina, elastina y otras glucoproteínas (véase, por ejemplo, Cyril Frank, M.D. y col., Normal Ligament: Structure, Function, and Composition. Injury and Repair of the Musculoskeletal Soft Tissues, 2:45-101). Estructuralmente, el ACL se une a una depresión en la parte delantera de la eminencia intercondílea de la tibia que se extiende postero-superiormente a la pared medial del cóndilo femoral lateral. Los desgarros parciales o completos del ACL son muy comunes, comprendiendo aproximadamente 30.000 procedimientos ambulatorios en los EE.UU. cada año.

El cartílago articular cubre los extremos de todos los huesos que forman las articulaciones articulares en seres humanos y animales. El cartílago está hecho de células llamadas fibrocondrocitos y una matriz extracelular de fibras de colágeno, además de una variedad de proteoglicanos. El cartílago actúa en la articulación como un mecanismo para la distribución de fuerza y como lubricante en el área de contacto entre los huesos. Sin cartílago articular, se produciría concentración de tensión y fricción al grado que la articulación no permitiría la facilidad de movimiento. La pérdida del cartílago articular normalmente conduce a artritis dolorosa y reducido movimiento de la articulación. Como el cartílago de la articulación en adultos no se regenera naturalmente a un grado significativo una vez se ha destruido, el cartílago articular adulto dañado se ha tratado históricamente mediante una variedad de intervenciones quirúrgicas que incluyen reparación, sustitución, o por escisión.

En una realización, puede extraerse tejido blando meniscal de una articulación cortando transversalmente primero el tendón patelar, las astas de los meniscos pueden entonces diseccionarse libres de tejido adherente. Opcionalmente, una pequeña cantidad de hueso puede seguir unida a las astas, por ejemplo, un tapón sustancialmente cilíndrico de hueso, tal como un tapón de hueso. En un ejemplo específico, el tapón de hueso puede tener aproximadamente cinco milímetros de diámetro por cinco milímetros de profundidad. En una realización, la unión sinovial meniscal puede entonces identificarse y liberarse del propio tejido del menisco, para formar un material de matriz. En otra realización, puede usarse tejido blando meniscal intacto para el trasplante.

En otra realización, puede extraerse tejido blando del cartílago articular de una articulación. En una realización puede identificarse una fina piel de cartílago articular con una capa pequeña de hueso subcondral y rasurarse de la articulación del donante, esto puede formar material de matriz. En otra realización, el tejido blando de cartílago articular intacto puede usarse para el trasplante.

En otra realización, puede extraerse tejido blando de ligamento de una articulación, tal como el ligamento cruzado anterior, ligamento cruzado posterior, ligamento colateral lateral o el ligamento colateral medial. Para eliminar el ligamento, la articulación puede abrirse usando técnicas quirúrgicas estándar. En una realización, el ligamento puede recogerse con un bloque de hueso unido a uno o ambos extremos. En un ejemplo, un bloque de hueso que representa un tapón sustancialmente cilíndrico puede extraerse con el ligamento, el tapón de hueso puede tener aproximadamente 9-10 mm de diámetro por aproximadamente 20-40 mm de longitud. En otra realización, el ligamento se recoge sin hueso. En otra realización, el ligamento puede recogerse sin hueso y a continuación diseccionarse libre de tejido adherente para obtener un material de matriz. En otra realización de la divulgación, el tejido blando de ligamento intacto puede usarse para el trasplante.

Después de eliminar el tejido puede ponerse en una disolución isotónica estéril adecuada u otra disolución de preservación de tejido. La recogida de tejido después del sacrificio del animal puede hacerse tan pronto como sea posible después del sacrificio y puede realizarse a temperatura fría. Por ejemplo, entre aproximadamente 5 °C y aproximadamente 20 °C, aproximadamente 0 °C y aproximadamente 20 °C, aproximadamente 0 °C y aproximadamente 10 °C, o aproximadamente 0 °C y aproximadamente 25 °C.

Colágeno

En otra realización, puede usarse tejido de colágeno de la presente invención para tratar trastornos del colágeno. Las alteraciones en la estructura del colágeno resultantes de genes anormales o procesamiento anormal de proteínas del colágeno produce numerosas enfermedades, tales como síndrome de Larsen, escorbuto, osteogénesis imperfecta y síndrome de Ehlers-Danlos. El síndrome de Ehlers-Danlos es en realidad el nombre asociado a al menos diez trastornos distintos que son bioquímicamente y clínicamente distintos, pero que todos manifiestan debilidad estructural en el tejido conjuntivo como resultado de defectos en la estructura de los colágenos. La osteogénesis imperfecta también engloba más de un trastorno. Se han identificado al menos cuatro trastornos bioquímicamente y clínicamente distinguibles, todos los cuales se caracterizan por múltiples fracturas y deformidades del hueso resultantes. El síndrome de Marfan se manifiesta por sí mismo como un trastorno del tejido conjuntivo y se creyó que era el resultado de colágenos anormales. Sin embargo, pruebas evidentes han mostrado que Marfan resulta de mutaciones en la proteína extracelular, fibrilina, que es un constituyente integral de las microfibrillas no colágenas de la matriz extracelular.

Tabla 3: Trastornos del colágeno

Transtorno	Defecto colágeno	Sintomatología
5 Ehlers-Danlos IV	Disminución en tipo III	ruptura arterial, intestinal y uterina, piel fina fácilmente propensa a moretones
Ehlers-Danlos IV	Disminución en entrecruzamiento	Hiperextensibilidad de piel y cartílagos
10 Ehlers-Danlos IV	Disminución en hidroxilina	mala cicatrización de heridas, deformidades musculoesqueléticas, hiperextensibilidad de piel y cartílagos
Ehlers-Danlos IV	Pro –péptido Terminal-N no eliminado	piel propensa a moretones, dislocaciones de cadera, hiperextensibilidad
Osteogenesis imperfecta	Disminución en tipo I	Escleróticas azules, deformidades de huesos
15 Escorbuto	Disminución en hidroxilina	mala cicatrización de heridas, crecimiento deficiente, debilidad capilar

15 Tapones de cartílago

En otras realizaciones, se proporcionan tapones de colágeno que se obtienen de animales que carecen de la expresión de alfa-1,3-GT funcional. Los tapones de colágeno pueden usarse para llenar un hueco en el cartílago natural. Los huecos en el cartílago natural pueden ser debidos a lesión traumática o enfermedad crónica. Alternativamente, el tapón puede usarse para anclar un polímero fluido al hueso subcondral. El tapón puede hacerse de cualquier tamaño, forma y contorno que sea apropiado para el trasplante deseado. Los tapones pueden utilizarse tanto individualmente como en una pluralidad para llenar cualquier tamaño de hueco para cualquier aplicación. El tapón puede estar formado de o también incluir una estructura laminada para corresponderse a los requisitos fisiológicos del sitio de reparación. Adicionalmente, pueden formarse rugosidades alrededor de la periferia de cada tapón para facilitar su anclaje a cartílago, hueso y/o tapones adyacentes de alrededor (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 6.632.246).

El tapón de cartílago puede ser una sección transversal poligonal o circular. La sección transversal poligonal o circular puede englobar una relación de altura con respecto a diámetro de aproximadamente inferior a una con respecto a una a aproximadamente 20:1, aproximadamente 30:1 o aproximadamente 40:1. Los tapones pueden moldearse en un amplio intervalo de tamaños y tener diversas relaciones de altura con respecto a diámetro con el fin de acomodar una amplia variedad de situaciones de sustitución de cartílago. Por ejemplo, el tapón puede ser un dispositivo redondo que tiene una forma que oscila de discos planos a cilindros. Pueden tenerse en consideración una variedad de factores para cada aplicación particular, tal como la localización en la que va a implantarse el tapón o los tapones de sustitución de cartílago, el tamaño del defecto de cartílago que va a repararse y el tamaño y forma de la cavidad hueca, bien como se formó inicialmente por resección del defecto, o por cualquier contorneado quirúrgico posterior de la cavidad, en la que va a implantarse el tapón de sustitución de cartílago. Por ejemplo, los dispositivos de tapón de sustitución de cartílago que tienen una forma de disco aplanado son los más adecuados para defectos más amplios, pero más superficiales, mientras que los dispositivos que tienen una gran relación de altura con respecto a diámetro son adecuados para defectos que tienen un área superficial más pequeña, pero que se extienden más profundos en el cartílago y/o la capa de hueso subcondral.

Las superficies de los tapones de colágeno de la presente invención pueden tratarse de manera que expongan una superficie porosa o rugosa. Tratando la superficie del tapón de forma que se vuelva rugosa o texturizada, puede potenciarse la unión de células y permitir la migración de células y el crecimiento en exceso de una capa de tejido. Con aspereza superficial apropiada, las células resultantes pueden adherirse mediante el crecimiento por aposición y el crecimiento hacia adentro en la superficie del tapón que potencia la fijación. Tal crecimiento hacia adentro de células puede transformarse por último lugar en una interfase ósea con el tapón y se considera una característica deseable. Es importante en esta transformación cómo la carga se transfiera del dispositivo al tejido de alrededor. Una gran discordancia en la deformación entre el tapón y el tejido de alrededor puede conducir a una capa de tejido fibrosa alrededor del tapón que, aunque sea flexible, no proporciona la fijación deseada. La porosidad, al igual que la rugosidad, puede ser importante y beneficiosa cuando se considera la fijación biológica.

55 Anclajes de sutura

El tejido blando proporcionado en la presente invención puede usarse para formar anclajes de sutura, que pueden usarse para asegurar las suturas dentro de orificios formados en huesos durante la cirugía reconstructiva de articulaciones y procedimientos quirúrgicos artroscópicos. El anclaje puede colocarse en un hueso y conectarse a una sutura que podría de otro modo no asegurarse a material óseo denso. Tales anclajes de sutura pueden usarse, por ejemplo, para anclar ligamentos o tendones a huesos en las operaciones de reconstrucción y reparación de rodilla, hombro y codo. Atributos importantes de los anclajes del hueso son que son fáciles de insertar y proporcionan un anclaje firme. El desplazamiento no intencionado del anclaje después de la cirugía puede tener graves consecuencias adversas, por tanto se da mucha importancia a que la capacidad de un anclaje resista a las fuerzas de extracción o retirada ejercidas por la sutura unida (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n°

4.738.255, 4.013.071, 4.409.974, 4.454.875 y 5.236.445)

En el presente documento se divulgan métodos de anclaje de una sutura a un hueso. Primero, puede perforarse un orificio de taladro en el hueso. El anclaje del hueso puede entonces insertarse, el extremo distal primero, en el orificio del taladro. Un instrumento de expansión, tal como una varilla con un sección transversal oblonga u ovalada, puede insertarse en la cámara de expansión a través del extremo proximal abierto del anclaje. Entonces, el extremo proximal ranurado del anclaje de hueso se expande girando el instrumento para poner el instrumento en contacto con las paredes a medida que el instrumento gira. La sección transversal oblonga u ovalada del instrumento le permite girar a través de al menos una porción de una revolución antes poner en contacto las paredes, de forma que es menos probable que el anclaje del hueso gire con el instrumento. En una realización, la punta distal del instrumento se asienta en un entrante correspondiente en el extremo distal de la cámara de expansión. El entrante proporciona un punto de giro fijo alrededor del cual la varilla gira para expandir el anclaje.

3. Andamiajes

Los procesos para preparar tejido pueden incluir las etapas de eliminar o destruir todas las células viables (descelularización) dejando atrás solo una matriz acelular o andamiaje para su uso en la reparación y remodelación de tejido, además de, opcionalmente, tratamientos para la reticularización y esterilización. En una realización particular se proporciona cualquier tejido duro o blando descclularizado que se deriva de los animales desvelados en el presente documento. En una realización se proporciona tejido dérmico blando descclularizado. En otra realización se proporciona tejido submucoso descclularizado. En otra realización, tal material descclularizado puede ser menos inmunogénico. En otras realizaciones, tales tejidos descclularizados pueden usarse como andamiaje o matriz para la reparación y/o reconstrucción de partes particulares del cuerpo humano. En una realización, el tejido descclularizado puede usarse para la reparación de los siguientes, que incluyen, pero no se limitan a, hernia, pared abdominal, manguito de los rotadores, cirugía cosmética o cualquier otro defecto de tejido blando conocido para un experto en la materia o desvelado en el presente documento. En realizaciones particulares, se proporciona material descclularizado submucoso y o dérmico.

En un aspecto de la presente invención, pueden obtenerse (recogerse) tejidos derivados de estos animales alfa-1,3-GT y a continuación procesarse adicionalmente para formar tejido descclularizado, por ejemplo, para su uso como andamiajes. En una realización, el tejido puede someterse a un proceso de múltiples etapas que incluye, pero no se limita a, tratar el tejido con una disolución estabilizante, un proceso de descclularización para eliminar células y cualquier componente de tejido antigénico restante, tratamiento enzimático, reticulación para mejorar la integridad estructural del tejido o para eliminar cualquier componente de tejido antigénico restante, esterilización para eliminar y/o inactivar virus nativo y/o métodos de preservación a largo plazo. En una realización, la disolución estabilizante puede contener un tampón apropiado, uno o más antioxidantes, uno o más agentes oncóticos, un antibiótico, y puede incluir uno o más inhibidores de la proteasa.

En otras realizaciones, el procesamiento de tejido para producir tejido descclularizado puede incluir, por ejemplo, eliminación de células que pueden conducir a rechazo de tejido y fracaso del injerto, sin dañar la matriz. El proceso de descclularización tiene la ventaja de hacer el tejido tan fuerte como el sintético, incluso más flexible, reteniendo características de tracción y funcionales, ayudando a prevenir adhesiones, reducida infección y rechazo del injerto, y promoviendo la remodelación del tejido del huésped de alrededor. En otras realizaciones, la descclularización puede llevarse a cabo usando varios tratamientos químicos, que incluyen incubación en ciertas sales, detergentes o enzimas, y/o proceso a vacío/presión. En una realización, el detergente puede ser Triton X-100 (Rohm and Haas Company of Philadelphia, Pa.). En una cierta realización, Triton X-100 elimina membranas celulares, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4.801.299. Otros detergentes descclularizantes incluyen, pero no se limitan a, mono-oleato de polioxietileno (20) sorbitano y mono-oleato de polioxietileno (80) sorbitano (Tween 20 y 80), desoxicolato de sodio, 3-[(3-cloramidopropil)-dimetilamino]-1-propano-sulfonato, octil-glucósido y/o dodecilsulfato de sodio, o cualquier otro detergente conocido para un experto en la materia. En otra realización, pueden usarse enzimas para realizar la descclularización. En ciertas realizaciones, las enzimas pueden seleccionarse del grupo que incluye, pero no se limita a, dispasa II, tripsina y/o termolisina, o cualquier otra enzima conocida para un experto en la materia. Estas enzimas pueden reaccionar con diferentes componentes de colágeno y conexiones intercelulares. Por ejemplo, la dispasa II puede atacar el colágeno tipo IV, que es un componente de la lámina densa y anclar fibrillas de la membrana basal. En otro ejemplo, la termolisina puede atacar el antígeno del penfigoide ampolloso en el hemidesmosoma de la capa basal de queratinocitos. En otro ejemplo, la tripsina puede atacar el complejo de desmosoma entre células.

En realizaciones adicionales o alternativas, el xenoinjerto descclularizado puede exponerse a un agente químico para curar o reticular las proteínas dentro de las proteínas extracelulares, para disminuir o reducir adicionalmente los determinantes inmunogénicos presentes en el xenoinjerto. Puede usarse cualquier agente de curado o reticulación para este tratamiento, y puede realizarse más de una etapa de reticulación o puede usarse más de un agente de reticulación con el fin de garantizar la reticulación completa y así reducir óptimamente la inmunogenicidad del xenoinjerto. Por ejemplo, pueden usarse aldehídos tales como glutaraldehído, formaldehído, dialdehído adípico y similares para reticular el colágeno extracelular. Otros agentes de reticulación adecuados incluyen diaminas

5 alifáticas y aromáticas, carbodiimidias, diisocianatos y similares. Alternativamente, el xenoinjerto puede exponerse a un agente de reticulación en una forma de vapor, que incluye, pero no se limita a, un agente de reticulación de aldehído vaporizado, tal como, por ejemplo, formaldehído vaporizado. La reacción de reticulación debe continuar hasta que los determinantes inmunogénicos se eliminen sustancialmente del tejido xenógeno, pero la reacción debe terminarse antes de las alteraciones significativas de las propiedades mecánicas del xenoinjerto. Los agentes de reticulación pueden ser cualquier agente conocido para un experto en la materia o descrito en el presente documento.

10 En ciertas realizaciones, el material de matriz derivado de tal tejido blando puede usarse para formar un andamiaje o dispositivo protésico. El material de matriz puede convertirse en una matriz de volumen poroso seca, una porción de la cual puede estar opcionalmente reticulada. La matriz porosa del dispositivo protésico fomenta el crecimiento hacia adentro de células, tales como fibrocondrocitos meniscales, células endoteliales, fibroblastos y otras células que normalmente ocupan la matriz extracelular, además de sintetizar y depositar componentes de la matriz extracelular. Las fibras de la matriz extracelular, tales como colágeno, elastina, reticulina, análogos de los mismos y mezclas de los mismos, pueden añadirse al material de matriz. Estas fibras también pueden obtenerse de animales que carecen de cualquier expresión funcional de alfa-1,3-gal. En una realización, las fibras pueden orientarse aleatoriamente en toda la matriz. Alternativamente, las fibras pueden adoptar la orientación que se extiende sustancialmente circunferencialmente o que se extiende sustancialmente radialmente a través de la matriz. La densidad de las fibras de la matriz puede ser uniforme o no uniforme. En configuraciones no uniformes, pueden establecerse densidades de fibras relativamente altas en los puntos previstos de alta tensión.

20 Los materiales de la matriz también pueden contener otros tipos de materiales, tales como biopolímeros como se ha descrito anteriormente. El material de matriz puede contener moléculas de glucosaminoglicano (GAG), tales como, pero no se limitan a, 4-sulfato de condroitina, 6-sulfato de condroitina, sulfato de queratán, sulfato de dermatán, sulfato de heparán, ácido hialurónico, y mezclas de los mismos pueden ser componentes del material de matriz. Además, el material de matriz puede contener GAG intercalados a través de las fibras. Los GAG pueden dispersarse uniformemente a través de la matriz como moléculas individuales, o pueden estar presentes en cantidades variables en diferentes regiones del dispositivo.

30 En otra realización, los andamiajes formados a partir de tejidos de animal que carecen de cualquier expresión funcional del gen alfa-1,3-GT como se describe en el presente documento contienen componentes de la matriz extracelular (ECM). Tales componentes de la ECM se derivan de un animal que carece de cualquier expresión funcional del gen alfa-1,3-GT. Los materiales de la matriz extracelular pueden derivarse de cualquier tejido, que incluye, pero no se limita a, tejidos de piel, urinarios, de vejiga o submucosos de órganos. El andamiaje funciona como un dispositivo protésico. El andamiaje puede sintetizarse a partir de componentes de ECM fragmentados, o en una realización preferida, se deriva mediante descelerización o procesamiento de tejido nativo, eliminando así células vivas y dejando atrás la ECM como un andamiaje preformado con una estructura 3-D y configuración de fibra similar a la del tejido natural. El andamiaje o dispositivo puede derivarse de material de matriz obtenido de tejido blando de un animal que carece de cualquier expresión funcional de alfa-1,3-Gal. El tejido blando puede incluir, pero no se limita a, dermis, submucosa de órgano (es decir, intestino delgado submucoso (SIS)), el menisco lateral extraído de una articulación de la rodilla, cartílago articular extraído de cualquier articulación, ligamentos y/o tendones, tales como el tendón de Aquiles. El tejido puede procesarse entonces como se describe más adelante para obtener un material de matriz, tal como fibras biocompatibles y biorresorbibles.

45 La matriz extracelular (ECM) es una entidad estructural compleja que rodea y soporta las células que se encuentran dentro de los tejidos de mamífero. La ECM también puede denominarse tejido conjuntivo. La ECM está compuesta por proteínas estructurales, tales como colágeno y elastina, proteínas especializadas tales como fibrilina, fibronectina y laminina, y proteoglicanos. Los glucosaminoglicanos (GAG) son cadenas largas de unidades de repetición de disacáridos que forman componentes de alto peso molecular extremadamente complejos de la ECM. Estas unidades de disacárido contienen una hexosamina N-acetilada y proporcionan lubricación y reticulaciones. Ejemplos de GAG incluyen, pero no se limitan a, 4-sulfato de condroitina, 6-sulfato de condroitina, sulfato de queratán, sulfato de dermatán, sulfato de heparán y ácido hialurónico.

55

60

65

Tabla 1: Tipos de matrices representativas producidas por células de vertebrados

Colágeno	Ancla	Proteoglicanos	Protector de superficie celular	Células
I	fibronectina	Sulfatos de coindritina y dermatán	Integrina	Fibroblastos
II	fibronectina	Sulfato de coindritina	Integrina	Condrocitos
III	fibronectina	Sulfatos de heparan y heparin	Integrina	hepatocitos quiescentes, epiteliales; Assoc, fibroblastos
IV	laminina	Sulfatos de heparan y heparin	Receptores de laminina	todas las células epiteliales, células endoteliales, hepatocitos regenerados
V	fibronectina	Sulfatos de heparan y heparin	Integrina	Fibroblastos quiescentes
VI	fibronectina	Sulfato de heparan	Integrina	Fibroblastos quiescentes

Los colágenos son las proteínas más abundantes encontradas en el reino animal. Es la principal proteína que comprende la ECM. Hay al menos 12 tipos de colágeno. Los tipos I, II y III son los más abundantes y forman fibrillas de estructura similar. El colágeno de tipo IV forma un retículo bidimensional y es un componente importante de la lámina basal. Los colágenos se sintetizan predominantemente por fibroblastos, pero las células epiteliales también sintetizan estas proteínas. La estructura de mayor orden fundamental de los colágenos es una proteína similar a bacilo larga y de diámetro estrecho. El colágeno tipo I, por ejemplo, tiene aproximadamente 300 nm de longitud, 1,5 nm de diámetro y consiste en 3 subunidades enrolladas compuestas de dos cadenas $\alpha 1(I)$ y una cadena $\alpha 2(I)$. Cada cadena consiste en 1050 aminoácidos enrollados alrededor de cada uno en una hélice triple diestra característica. Hay 3 aminoácidos por giro de la hélice y cada tercer aminoácido es una guanina. Los colágenos también son ricos en prolina e hidroxiprolina. Los anillos de pirrolidona voluminosos de la prolina residen en el exterior de la hélice triple. Las interacciones laterales de hélices triples de colágenos producen la formación de fibrillas de aproximadamente 50 nm de diámetro. El empaquetamiento del colágeno es tal que moléculas adyacentes estén desplazadas aproximadamente 1/4 de su longitud (67 nm). Esta matriz escalonada produce un efecto estriado que puede observarse en el microscopio electrónico.

Los colágenos se sintetizan como proteínas precursoras más largas llamadas procolágenos. El procolágeno de tipo I contiene 150 aminoácidos adicionales en el extremo N y 250 en el extremo C. Estos pro-dominios son globulares y forman múltiples enlaces disulfuro entre las cadenas. Los disulfuros estabilizan la proproteína permitiendo que se forme la triple sección helicoidal. Las fibras de colágeno empiezan pareciéndose en el retículo endoplásmico (ER) y los complejos de Golgi. Se elimina la secuencia señal y tienen lugar numerosas modificaciones en las cadenas de colágeno. Pueden hidroxilarse residuos de prolina específicos por prolil 4-hidroxilasa y prolil 3-hidroxilasa. Residuos de lisina específicos también están hidroxilados por lisil hidroxilasa. Las prolil hidroxilasas dependen de la vitamina C como co-factor. Las glucosilaciones del tipo enlazadas en O también se producen durante el tránsito de Golgi. Tras completarse el procesamiento, los procolágenos son secretados en el espacio extracelular en el que las enzimas extracelulares eliminan los pro-dominios. Entonces, las moléculas de colágeno se polimerizan para formar fibrillas de colágeno. La formación de fibrillas concomitante es la oxidación de ciertos residuos de lisina por la enzima extracelular *lisil oxidasa* que forma aldehídos reactivos. Estos aldehídos reactivos forman reticulaciones específicas entre dos cadenas, estabilizando así la matriz escalonada de los colágenos en la fibrilla.

Tabla 2: Tipos de colágeno

Tipos	Cadena de composición	Detalles estructurales	Localización
I	$[\alpha 1(I)]_2[\alpha 2(I)]$	300nm, 67nm fibrillas en bandas	Piel, tendón, hueso etc.
II	$[\alpha 1(II)]_3$	300nm, 67nm pequeñas fibrillas	Cartilago, humor vítreo
III	$[\alpha 1(III)]_3$	300nm, 67nm pequeñas fibrillas	Piel, músculo, frecuentemente con tipo I
IV	$[\alpha 1(IV)]_2[\alpha 2(IV)]$	390nm C-termino de dominio globular, no-fibrilar	Toda lámina basal
V	$[\alpha 1(V)][\alpha 2(V)][\alpha 3(V)]$	390nm N-termino de dominio globular, pequeñas fibras	Mayor tejido intersticial asociado. Con tipo I
VI	$[\alpha 1(VI)][\alpha 2(VI)][\alpha 3(VI)]$	150nm, N+C terminos. dominios globulares, microfibrillas, 100nm fibrillas en bandas	Mayor tejido intersticial asociado. Con tipo I
VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	450nm, dímero	Epidelia
VIII	$[\alpha 1(VIII)]_3$	-----	Algunas células endoteliales
IX	$[\alpha 1(IX)][\alpha 2(IX)][\alpha 3(IX)]$	200nm, N-termino. Dominio globular, Proteoglicano ligado	Cartilago asociado. Con tipo I
X	$[\alpha 1(X)]_3$	150nm, C-termino. Dominio globular	Cartilago hipertóxico y mineralizado
XI	$[\alpha 1(XI)][\alpha 2(XI)][\alpha 3(XI)]$	300nm, pequeñas fibras	Cartilago
XII	$\alpha 1(XII)$	-----	Interactúa con tipos I y II

La función de las fibronectinas es unir las células a una variedad de matrices extracelulares. La fibronectina une células a todas las matrices, excepto al tipo IV, que implica la laminina como la molécula adhesiva. Las fibronectinas son dímeros de 2 péptidos similares. Cada cadena tiene aproximadamente 60-70 nm de longitud y 2-3 nm de espesor. Se han identificado al menos 20 cadenas de fibronectina diferentes que se producen por corte y empalme de ADN alternativo del transcrito primario a partir de un único gen de fibronectina. Las fibronectinas contienen al menos 6 dominios estrechamente plegados cada uno con una alta afinidad por un sustrato diferente tal como sulfato de heparán, colágeno (dominios separados para los tipos I, II y III), fibrina y receptores de la superficie celular. El dominio de unión a receptores de la superficie celular contiene una secuencia de aminoácidos consenso, RGDS.

Todas las láminas basales contienen un conjunto común de proteínas y GAG. Éstas son colágeno de tipo IV, proteoglicanos de sulfato de heparano, entactina y laminina. La lámina basal se denomina frecuentemente la matriz de tipo IV. Cada uno de los componentes de la lámina basal se sintetiza por las células que descansan sobre ella. La laminina ancla superficies celulares a la lámina basal.

En una realización, cualquiera de los componentes de la ECM o combinaciones de los mismos descritos anteriormente puede usarse para formar un andamiaje, que puede usarse como dispositivo protésico. El andamiaje derivado de la ECM puede producirse alternativamente por tratamiento mecánico, químico o enzimático de tejido de cerdos deficientes en alfa-1,3-gal, de forma que todas las células y residuos se eliminen dejando atrás la ECM en un patrón de fibra muy apto para el reclutamiento de células huésped y la regeneración de tejido. El andamiaje o dispositivo protésico fabricado de fibras biocompatibles y biorresorbibles puede implantarse quirúrgicamente en una región dispuesta entre y que conecta dos de los huesos del sujeto, de manera que se proporcione movimiento normal y resistencia (para la implantación quirúrgica, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 6.042.610, 5.735.903, 5.479.033, 5.624.463, 5.306.311, 5.108.438, 5.007.934 y 4.880.429). El dispositivo protésico puede actuar de andamiaje para regenerar tejido, ya que las características físicas del andamiaje fomentan el crecimiento hacia adentro del nuevo tejido. Esto puede producir un material compuesto de la región del cuerpo del huésped objeto y el dispositivo protésico que tiene un contorno de la superficie externa *in vivo* que es sustancialmente igual que una región del cuerpo natural.

El dispositivo puede implantarse en una región entre y/o que conecta dos de los huesos del sujeto, el material compuesto formado por la región del cuerpo del sujeto y el dispositivo pueden tener un contorno de la superficie externa *in vivo* sustancialmente igual que una región natural que es la que está tratándose. El dispositivo puede establecer un andamiaje biocompatible y parcialmente biorresorbible adaptado para el crecimiento hacia adentro de fibrocondrocitos, fibroblastos o condrocitos (tales como fibrocondrocitos meniscales, fibrocondrocitos vertebrales, etc.). El andamiaje, junto con las células que crecen hacia adentro, puede soportar fuerzas de carga natural en la región.

En otra realización, se proporcionan métodos para fabricar un dispositivo protésico que tiene *in vivo* la forma

deseada (tal como, por ejemplo, un defecto segmentario en un menisco). El método implica obtener un material de matriz de fibra de tejidos de un animal que carece de cualquier expresión funcional de alfa-1,3-gal y poner esta matriz de fibra biocompatible y parcialmente biorresorbible en un molde que define la forma deseada (el molde define la superficie externa del dispositivo para complementar la región del cuerpo deseada). Las fibras pueden entonces liofilizarse y/o ponerse en contacto con un agente de reticulación químico de forma que las fibras adopten la forma del molde. Alternativamente, después de completarse el moldeo, la estructura o matriz formada en el molde puede cortarse de manera que su superficie externa sea complementaria a un defecto segmentario. Este método puede dar una matriz adaptada para tener un contorno de la superficie externa complementario al del defecto segmentario en el menisco. Este tipo de matriz puede implantarse para corregir un defecto segmentario del menisco o como un dispositivo de aumento del menisco, la matriz puede establecer un andamiaje biocompatible y al menos parcialmente biorresorbible para el crecimiento hacia adentro de fibrocondrocitos meniscales y para soportar las fuerzas de carga meniscales naturales.

4. Injertos de tejido duro y blando

También se divulgan en el presente documento injertos de hueso-tendón-hueso que pueden ser útiles en cirugía ortopédica. Los injertos de hueso-tendón-hueso pueden contener uno o más bloques de hueso, y un tendón unido a los bloques de hueso. Los bloques de hueso pueden cortarse para proporcionar una muesca suficiente para acomodar un tornillo de fijación. Alternativamente, se proporciona un injerto de hueso-tendón-hueso que contiene uno o más bloques de hueso, en el que el bloque de hueso está previamente formado en una espiga, y un tendón unido a los bloques de hueso. También se proporciona un método para obtener injertos de hueso-tendón-hueso por el que un primer tapón de hueso que tiene unido al mismo un tendón o ligamento se escinde primero y a continuación un segundo tapón de hueso que tiene unido al mismo un tendón o ligamento se escinde; de forma que el primer tapón de hueso y el segundo tapón de hueso se deriven de existencias de hueso contiguo y se solapen de forma que la escisión del primer tapón de hueso o el segundo tapón de hueso forme una ranura en el tapón de hueso que se escinde posterior al otro.

En otras realizaciones se proporcionan injertos de hueso-tendón-hueso que contienen un tendón y un bloque de hueso. El tendón puede estar enrollado alrededor de un hueso para crear una capa de tendón, hueso, tendón que puede mantenerse en su sitio con suturas. Éste también puede contener dos porciones de seguimiento del tendón disponibles para la fijación para asegurar el trasplante. Este tipo de injerto puede aumentar la resistencia del tejido mientras que disminuye el cizallamiento que puede producir el fallo de tejido aprovechándose la fluencia cíclica natural asociada al movimiento del tendón para equilibrar fuerzas opuestas en un modo tipo polea.

5. REPARACIÓN DE LA PIEL

En otro aspecto de la presente invención, el tejido duro y blando de animales que carecen de cualquier expresión de alfa-1,3-galactosiltransferasa funcional puede usarse en la reparación de la piel.

La piel puede dividirse en tres capas: la epidermis, la dermis y la capa subcutánea. La epidermis se divide en cuatro capas, desde la parte inferior hasta la superior: la capa de células basales, el estrato espinoso, el estrato granuloso y el estrato córneo.

La capa de células basales de la epidermis contiene células basales que se dividen y se diferencian en otras células en la epidermis, y melanocitos, las células que hacen que la melanina le dé a la piel su color. El estrato espinoso se encuentra por encima de la capa de células basales y está hecha de queratinocitos, células que hacen la proteína queratina. La queratina es un componente importante del estrato córneo, además del pelo y las uñas. Las células en el estrato granuloso son aplanadas y contienen gránulos oscuros que son expulsados y proporcionan el "cemento" que mantiene las células juntas en el estrato córneo que se encuentra encima. La capa más alta de la epidermis está en realidad hecha de capas estrechamente empaquetadas de células muertas llenas de queratina que forman la principal barrera física para la piel. El estrato córneo es más grueso en áreas como las palmas y las plantas de los pies que soportan más desgaste y desgarro diario que otras partes del cuerpo. La epidermis también contiene células de Langerhans, que actúan como parte de la defensa de la piel contra la infección. La unión dérmica-epidérmica es donde la epidermis se encuentra con la dermis. La zona de la membrana basal sirve de "pegamento" entre estas dos capas.

La dermis se divide en la dermis papilar superior y la dermis reticular inferior. Los componentes estructurales de la dermis incluyen colágeno, fibras elásticas y sustancia fundamental. Los nervios y los vasos sanguíneos también fluyen a través de la dermis. Los anejos cutáneos son las glándulas sudoríparas ecrinas y apocrinas, folículos pilosos, glándulas sebáceas y uñas. Excepto por las uñas, todos los anejos cutáneos están localizados en la dermis.

La liberación de sudor de las glándulas ecrinas es el proceso de refrigeración del cuerpo. El sudor se produce en un túbulo enrollado en la dermis y se transporta por un conducto sudoríparo a través de la epidermis para secretarse. La superficie corporal entera tiene aproximadamente 2-3 millones de glándulas sudoríparas ecrinas y puede producir hasta 10 l de sudor por día.

En los seres humanos, las glándulas sudoríparas apocrinas no cumplen ninguna función conocida y se consideran glándulas vestigiales quizás útiles para nuestros antepasados. Están localizadas principalmente en la axila y las áreas genitales. Al igual que el sudor ecrino, el sudor apocrino también se produce en túbulos enrollados en la dermis, pero el conducto apocrino drena sudor en un folículo piloso del cual llega a la superficie de la piel.

El pelo está hecho de queratina, la misma sustancia que forma las uñas y la capa superior de la epidermis (estrato córneo). Diferentes células localizadas en la raíz del pelo constituyen la queratina y la melanina, que da al pelo su color. Los seres humanos tienen dos tipos de pelo: velloso (claro y fino) y terminal (oscuro y grueso). Una glándula sebácea secreta una sustancia aceitosa llamada seborrea que drena en el canal de un folículo piloso para alcanzar la superficie de la piel. Juntos, un folículo piloso y su glándula sebácea asociada, se llaman una unidad pilosebácea. Los folículos pilosos están distribuidos en cualquier parte sobre el cuerpo, excepto las palmas y las plantas. En seres humanos, el pelo es principalmente decorativo, pero también sirve de función protectora. Las cejas y las pestañas protegen los ojos del polvo y el sol, mientras que los pelos nasales bloquean a cuerpos extraños de la nariz. El cabello proporciona algún aislamiento de la temperatura.

Las glándulas sebáceas producen una sustancia aceitosa llamada seborrea. Son principalmente importantes en la piel del cuero cabelludo, cara y el tronco superior y están ausentes de las palmas y las plantas. Como parte de la unidad pilosebácea, las glándulas sebáceas secretan seborrea que drena en el canal folicular y con el tiempo sobre la superficie de la piel. Las glándulas sebáceas aumentan en tamaño y producen más seborrea en respuesta a elevados niveles de hormonas, específicamente andrógeno, durante la adolescencia. Desempeñan una función importante en el desarrollo del acné.

La capa subcutánea se encuentra entre la dermis y el músculo que cubre la fascia subyacente. Esta capa está hecha de grupos de adipocitos (células adiposas) que se separan por septos fibrosos. Cumple tres funciones principales: aislar el cuerpo del frío, absorber traumatismo y amortiguar tejidos más profundos y actuar de almacenamiento para el combustible de reserva del cuerpo.

Las uñas son los únicos anejos cutáneos que no están localizados en la dermis, sino que en su lugar están localizadas en los extremos de los dedos de las manos y de los pies. La placa de la uña está hecha de queratina muerta, que forma una estructura protectora dura de aproximadamente 0,3-0,65 mm de espesor. La queratina se forma en la matriz de la uña por células epidérmicas en división. El lecho de la uña es la capa epitelial que está estrechamente unida a la base de la placa de la uña. Los vasos sanguíneos del lecho de la uña dan a las uñas su color rosa. El pliegue proximal de la uña, o cutícula, protege la base de la uña de los organismos causantes de infección. Las uñas crecen a una velocidad promedio de 0,1 mm por día, y las uñas de los pies crecen más lentas que las uñas de las manos.

En otra realización, el tejido duro y blando de animales que carecen de cualquier expresión de alfa-1,3-galactosiltransferasa funcional puede usarse en la reparación de la piel. Puede usarse cualquier componente o combinación de los componentes de la piel derivados de tales animales, que incluyen, pero no se limitan a, el tejido epidérmico, capa de células basales, estrato espinoso, estrato granuloso, estrato córneo, tejido dérmico, tejido dérmico papilar superior, tejido dérmico reticular inferior, colágeno, fibras elásticas, sustancia fundamental, glándulas ecrinas, glándulas apocrinas, folículos pilosos, glándulas sebáceas, uñas, pelo y tejido subcutáneo. Tal tejido puede usarse para sustituir piel humana, por ejemplo, para la reparación de quemaduras de tejido profundo de la piel.

Los tejidos de la piel incluyen, pero no se limitan a, tejido dérmico o epidérmico o derivados de los mismos. Debajo de la piel está el tejido subcutáneo adiposo. En una realización, el xenoinjerto de piel puede incluir la epidermis. En otra realización, el xenoinjerto de piel puede incluir la epidermis y la dermis. La dermis puede proporcionarse en espesores variables, por ejemplo, 1,5, 10 ó 20 mm. Además, se proporcionan injertos de piel que contienen epidermis, dermis y tejido subcutáneo. En una realización, el injerto de piel que contiene epidermis, dermis y tejido subcutáneo puede usarse para sustituir piel que se encuentra encima de áreas óseas o sobre tendones.

En otra realización, se usa tejido de piel en una forma descelularizada, como un andamiaje para la reparación o sustitución del manguito de los rotadores, reparación de la pared intrabdominal, reparación de tejido ginecológico u urológico, como parte de un proceso para la reparación o sustitución de ligamentos o tendones, u otras aplicaciones de tejido blando (por ejemplo, como se describe en la Tabla 6). El xenoinjerto de tejido de piel puede ser una sustitución permanente o usarse como una sustitución temporal hasta que al paciente le pueda volver a crecer piel nueva. En una realización, el injerto de piel puede usarse como sustituto temporal. Los sustitutos de piel temporales pueden curar quemaduras de espesor parcial, promover la cicatrización y prevenir la infección, y pueden usarse si un paciente no está lo suficientemente sano para cirugía reconstructiva. En otra realización, se proporcionan injertos de piel permanentes.

En otras realizaciones, se proporcionan diferentes tipos de xenoinjertos de piel. En una realización, el injerto es un injerto de espesor parcial. Los injertos de espesor parcial pueden contener la dermis con solo una porción de la epidermis y pueden usarse sobre quemaduras o heridas grandes. En otra realización, el injerto es un injerto de espesor completo. Los injertos de espesor completo pueden incluir la epidermis y la dermis y pueden usarse para

cubrir áreas pequeñas. En otra realización, el injerto puede ser colgajos pediculados o injertos. Los colgajos pediculados o injertos pueden incluir la epidermis, la dermis y tejido subcutáneo. Los colgajos pediculados o injertos pueden usarse para cubrir heridas u otras áreas que puedan requerir operaciones adicionales para la reparación de hueso, tendón, o daño de nervio.

6. REPARACIÓN DE TEJIDO INTERNO

En otro aspecto de la presente divulgación, el tejido duro y blando de animales que carecen de cualquier expresión de alfa-1,3-galactosiltransferasa funcional puede usarse en la reparación de tejido interno, tal como reparación de hernia, poleas de los tendones, superficies de deslizamiento, anastomosis de vasos sanguíneos, reparación o sustitución de las válvulas del corazón y reparación de la duramadre. Los tejidos internos incluyen tejido pericárdico, válvulas del corazón y tejido submucoso. En una realización, el tejido submucoso puede usarse para la reparación o sustitución de tejido conjuntivo.

En otra realización, el tejido de xenoinjerto se prepara a partir de un segmento deslaminado derivado de submucosa de órganos de animal, preferentemente la submucosa de órganos de un cerdo deficiente en alfa-1,3-GT. En una realización preferida, la submucosa se deriva del tejido intestinal de un animal. El segmento puede incluir la túnica submucosa y el tejido basilar de la túnica mucosa, que generalmente incluye la mucosa muscular y el estrato compacto. La túnica submucosa y el tejido mucoso basilar pueden deslaminarse de la túnica muscular y la porción luminal de la túnica mucosa del segmento de tejido intestinal. Este procesamiento puede producir un segmento de tejido intestinal tri-capa que es material colagenoso tubular, muy duro, fibroso (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 4.902.508 y 4.956.178). En otra realización, este tejido se extrae de animales maduros, tales como cerdas que, por ejemplo, pesan entre 400 y 600 lbs. Los segmentos intestinales tri-capa pueden usarse para formar xenoinjertos o pueden cortarse longitudinalmente o lateralmente para formar segmentos de tejido alargado. En cualquier forma, tales segmentos tienen una porción intermedia y posiciones de extremo opuestas y porciones laterales opuestas que pueden formarse para la unión quirúrgica a estructuras fisiológicas existentes, usando técnicas quirúrgicamente aceptables (véase también la patente de EE.UU. n° 5.372.821). En una realización relacionada, el tejido blando se deriva de tejido dérmico o de piel, que también puede formarse o cortarse y usarse para la unión quirúrgica a estructuras fisiológicas existentes.

También se divulga en el presente documento un método para preparar o procesar un tejido blando para el injerto funcionante en seres humanos. Puede extraerse una porción intacta de tejido de cualquier tejido del animal. En una realización, puede extraerse un corazón intacto del animal y entonces pueden escindirse tejidos de la válvula del corazón, o puede recogerse pericardio. En otras realizaciones, los tejidos pueden incluir, pero no se limitan a, epitelio, tejido conjuntivo, sangre, hueso, cartílago, músculo, nervio, adenoide, adiposo, areolar, hueso, adiposo marrón, esponjoso, músculo, cartilaginoso, cavernoso, condroide, cromafín, dartoico, elástico, epitelial, adiposo, fibroialino, fibroso, Gamgee, gelatinoso, granulación, linfoide asociado al intestino, vascular de Haller, hemopoyético duro, indiferente, intersticial, de revestimiento, islote, linfático, linfoide, mesenquimatoso, mesonéfrico, conjuntivo mucoso, adiposo multilocular, mieloide, blando del nasión, nefrogénico, nodal, óseo, osteogénico, osteoide, periapical, reticular, retiforme, de caucho, músculo esquelético, músculo liso y tejido subcutáneo.

En una realización, el tejido puede recogerse de animales recién sacrificados. Alternativamente, el tejido puede extirparse quirúrgicamente de animales viables. En una realización, después de extraer el hueso puede colocarse en una disolución isotónica estéril adecuada u otra disolución conservante de tejido. La recogida del tejido después del sacrificio del animal puede hacerse tan pronto como sea posible después del sacrificio y puede realizarse a temperatura fría. Por ejemplo, entre aproximadamente 5 °C y aproximadamente 20 °C, aproximadamente 0 °C y aproximadamente 20 °C, aproximadamente 0 °C y aproximadamente 10 °C, o aproximadamente 0 °C y aproximadamente 25 °C. Los tejidos y válvulas recogidos pueden diseccionar libre de tejido adjunto. En una realización, un tejido o válvula del corazón o porción del mismo puede diseccionar libre de tejido adherente, placas, calcificaciones y similares. Alternativamente, un tejido o válvula puede diseccionar con porciones del tejido de alrededor.

En una realización específica, las válvulas tricúspides pueden escindirse como valvas separadas. En otra realización, las válvulas tricúspides pueden extraerse como una válvula intacta que incluye el anillo fibroso que rodea el orificio auriculo-ventricular y las cuerdas tendinosas. En otra realización, después de la disección de la válvula, la válvula o porciones de la válvula pueden soportarse con prótesis endovasculares, anillos y similares. En otra realización, puede recogerse peritoneo o pericardio para formar xenoinjertos de la válvula del corazón o material de matriz según procedimientos conocidos para aquellos expertos habituales en la materia (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 4.755.593 por Lauren).

Pueden usarse xenoinjertos de tejido blando en una variedad de aplicaciones para la reparación o reconstrucciones de partes del cuerpo humano, por ejemplo, las desveladas en la Tabla 6.

Válvulas del corazón

En una realización, las válvulas del corazón se extraen de animales que carecen de cualquier expresión de alfa-1,3-Gal. Corazones bovinos, ovinos o porcinos, y específicamente corazones porcinos, de animales que carecen de cualquier expresión funcional de alfa-1,3-Gal, pueden servir de fuentes de válvulas del corazón. Las válvulas del corazón están compuestas de fibrocondrocitos y una matriz extracelular de colágeno y fibras elásticas, además de una variedad de proteoglicanos. Tipos de válvulas del corazón incluyen, pero no se limitan a, la válvula mitral, la válvula auricular, la válvula aórtica, la válvula tricúspide, válvula pulmonar, parche pulmonico, aorta torácica descendente, conducto no de válvula aórtica, conducto no de válvula pulmonica con LPA y RPA, hemi-arteria pulmonar derecha o izquierda con o sin cúspide intacta, vena safena, aortoiliaca, vena femoral, arteria femoral y/o válvula semilunar. En ciertas realizaciones, pueden usarse herramientas para asegurar una prótesis de válvula del corazón a una pared aórtica. Las herramientas pueden incluir cierres y/o refuerzos. En realizaciones particulares, las prótesis de válvula del corazón pueden tener valvas flexibles. En una realización, la prótesis de válvula del corazón puede construirse de materiales naturales tales como tejido, materiales sintéticos tales como polímeros o una combinación de los mismos. En otra realización, la prótesis de válvula puede ser una válvula de tejido, y puede incluir adicionalmente una prótesis endovascular, o ser sin prótesis endovascular, y ser de fuente porcina, bovina, u otra fuente de tejido de animal. Un xenoinjerto de válvula de corazón preparado según la invención puede tener el aspecto general de un xenoinjerto de válvula del corazón nativo. El xenoinjerto de válvula del corazón también puede ser segmentos de válvula, tales como valvas individuales, cada una de las cuales puede implantarse en el corazón del receptor. Alternativamente, puede usarse pericardio porcino para formar los xenoinjertos de válvula del corazón de la presente invención.

El corazón es un órgano muscular hueco que circula sangre a lo largo del cuerpo de un animal contrayéndose rítmicamente. En mamíferos, el corazón tiene cuatro cámaras situadas de forma que la aurícula y el ventrículo derecho están completamente separados de la aurícula y el ventrículo izquierdo. Normalmente, la sangre circula de las venas sistémicas a la aurícula derecha, y luego al ventrículo derecho del que se conduce a los pulmones mediante la arteria pulmonar. Tras el retorno de los pulmones, la sangre entra en la aurícula izquierda, y a continuación circula al ventrículo izquierdo del que se conduce a las arterias sistémicas.

Cuatro válvulas principales del corazón previenen el retroflujo de la sangre durante las contracciones rítmicas: la válvula tricúspide, pulmonar, mitral y aórtica. La válvula tricúspide separa la aurícula derecha y el ventrículo derecho, la válvula pulmonar separa la aurícula derecha y la arteria pulmonar, la válvula mitral separa la aurícula izquierda y el ventrículo izquierdo, y la válvula aórtica separa el ventrículo izquierdo y la aorta. Generalmente, los pacientes que tienen una anomalía de una válvula del corazón se caracterizan por tener enfermedad cardíaca valvular.

Una válvula del corazón puede funcionar mal tanto dejando de abrirse apropiadamente (estenosis) como fugando (regurgitación). Por ejemplo, un paciente con un mal funcionamiento de la válvula aórtica puede diagnosticarse con tanto estenosis de la válvula aórtica como regurgitación de la válvula aórtica. En cualquier caso, la sustitución de la válvula por medios quirúrgicos es un tratamiento posible. Las válvulas de sustitución pueden ser autoinjertos, aloinjertos o xenoinjertos, además de válvulas mecánicas o válvulas hechas parcialmente de válvulas de cerdo. De forma interesante, aloinjertos criopreservados siguen siendo viables dentro del paciente receptor durante muchos años después del trasplante. Desafortunadamente, las válvulas de sustitución son susceptibles a problemas tales como degeneración, trombosis y calcificación.

El xenoinjerto de válvula de corazón de la invención, o un segmento del mismo, puede implantarse en corazones humanos o animales dañados por aquellos expertos en la materia usando técnicas quirúrgicas conocidas, por ejemplo, por cirugía de corazón abierto, o técnicas mínimamente invasivas tales como cirugía endoscópica e implantación transluminal. Instrumentos específicos para realizar tales técnicas quirúrgicas son conocidos para aquellos expertos en la materia, que garantizan la colocación precisa y reproducible de implantes de la válvula del corazón.

En una realización particular, las válvulas del corazón como prótesis pueden usarse para pacientes con diversas formas de enfermedad al corazón y/o válvula. Pueden obtenerse corazones porcinos de cerdos de peso para venta (por ejemplo, cerdos superiores a 120 kg). Después de aclarar en solución salina tamponada con fosfato estéril, los corazones pueden diseccionarse en el campo (eliminación de la punta) y transportarse a 4 °C en PBS estéril. Todos los corazones pueden llegar al centro de procesamiento, por ejemplo, en el plazo de 24 h desde el sacrificio del animal. Las válvulas aórtica y pulmonar pueden diseccionarse como raíces. En una realización específica, estos tejidos pueden someterse a una etapa de reducción de la biocarga de incubación en una mezcla de antibióticos y antimicóticos durante aproximadamente 48 h a aproximadamente 48 °C. Los tejidos desinfectados pueden tanto criopreservarse (por ejemplo en 10 % (v/v) de DMSO y 10% (v/v) de suero bovino fetal, -1 °C/min) como pueden descelerizarse mediante un procedimiento que implica el tratamiento con medio hipotónico, seguido de digestión con una mezcla de desoxirribonucleasa I y ribonucleasa A. Después de 12 días, las válvulas descelerizadas pueden tanto criopreservarse como fijarse químicamente, por ejemplo, en 0,35 % (peso/volumen) de glutaraldehído a 2 mm de Hg en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,4) durante un total de 7 días (la fijación a baja presión garantiza el mantenimiento del rizo natural de la matriz de colágeno). En una realización, los tejidos fijados no se criopreservan, pero pueden almacenarse en una disolución de fijación cruzada, tal como una disolución de glutaraldehído (tal como 0,35 % de glutaraldehído).

Una prótesis de válvula basada en tejido puede mantener elementos estructurales, tales como las valvas, de su forma nativa y/o pueden incorporarse elementos estructurales en la prótesis del ensamblaje de distintos trozos de tejido. Por ejemplo, la prótesis de válvula puede ensamblarse de una válvula de corazón porcina, de pericardio bovino o de una combinación de los mismos. Las válvulas de tejido porcino, por ejemplo, la válvula Toronto SPV™ comercializada por St. Jude Medical, Inc. St. Paul, Minn., puede implantarse en el paciente usando las herramientas descritas en el presente documento. La válvula Toronto SPV™ está diseñada para la implantación en una posición de la válvula aórtica del corazón, véase, por ejemplo, David y col., J. Heart Valve Dis.1:244-248 (1992). Las herramientas de la presente invención son aplicables a cualquier válvula, especialmente cualquier prótesis de válvula de tejido, que está adaptada para implantación en un paciente.

Las prótesis de válvula de corazón incluye una válvula de tejido recogido, tal como una válvula porcina reticulada. La prótesis puede incluir adicionalmente una cubierta de costura. La válvula pueden tener tres valvas, que pueden incluir una base generalmente cilíndrica y tres comisuras que soportan las valvas.

En otras realizaciones, pueden usarse cierres para asegurar una válvula del corazón, tal como una prótesis de válvula aórtica a la pared del vaso. Los cierres pueden asegurarse generalmente a la pared del vaso durante el procedimiento de implantación de la prótesis de válvula del corazón. Los cierres pueden tener una forma similar a una aguja o clavo, aunque el cierre puede tener alternativamente una pluralidad de puntas afiladas. Además, los cierres pueden tener una o más barbas cerca de las puntas de los cierres. El cierre puede incluir una porción alargada con un extremo de punta. El cierre también pueden tener una cabeza opcional en el extremo opuesto al extremo de punta. En otras realizaciones, una barba puede localizarse en o cerca del extremo de la punta. Los cierres puede incluir dos o más barbas que se extienden desde el mismo lado o desde lados diferentes del cierre. Los cierres pueden formarse de un material biocompatible. Materiales biocompatibles preferibles para los cierres dan las propiedades mecánicas deseadas con respecto a, por ejemplo, la durabilidad, resistencia mecánica y flexibilidad/rigidez. Los cierres pueden ser suficientemente rígidos para mantener su forma cuando se aplica presión por un médico para insertar el cierre. Un cierre que no es suficientemente rígido puede doblarse cuando se aplica para la inserción. Alguna flexión puede ser tolerable en tanto que el cierre pueda penetrar en los materiales. Un cierre sin rigidez suficiente puede no insertarse apropiadamente, aumentando así la propensión del daño a la prótesis, daño a la pared aórtica, unión inapropiada de la prótesis y/o elevados tiempos de pinzamiento transversal. Después de la implantación, los cierres pueden seguir en el paciente para asegurar la prótesis de válvula durante el periodo de vida de la prótesis o al menos hasta que el proceso de curación asegure la válvula al vaso mediante el crecimiento celular, si se usa un material biorresorbible para el cierre. Los cierres pueden estar hechos de, por ejemplo, metal, cerámica, polímeros o combinaciones de los mismos. Metales adecuados incluyen, por ejemplo, titanio y acero inoxidable. Cerámicas adecuadas incluyen, por ejemplo, hidroxiapatita, tal como fragmentos de hueso, materiales de carbono, tales como grafito, y alúmina. Polímeros adecuados incluyen polímeros suficientemente rígidos, tales como poliéter-éter-cetona (PEEK). Los cierres también puede formarse de polímeros biorresorbibles, como se ha descrito anteriormente, de forma que con el tiempo los cierres se resorban después de haberse generado tejido suficiente para asegurar la prótesis de válvula sin los cierres.

La longitud del cierre puede estar entre aproximadamente 2 milímetros (mm) y aproximadamente 8 mm, por ejemplo, aproximadamente 4 mm a aproximadamente 7 mm. En una realización, el diámetro de la porción alargada del cierre puede ser inferior a aproximadamente 2 mm, por ejemplo, entre aproximadamente 0,2 mm y aproximadamente 1,5 mm, o entre aproximadamente 0,2 mm y aproximadamente 1 mm.

En otras realizaciones, los métodos de unión de una prótesis de válvula de corazón a una pared del vaso pueden basarse en los cierres y los refuerzos descritos anteriormente. Los propios refuerzos pueden asegurarse tanto con el cierre como con otro dispositivo. Los cierres pueden utilizarse para asegurar todos los elementos simultáneamente o uno o más componentes pueden asociarse entre sí o la prótesis de válvula antes de la utilización final de los cierres.

En una realización, las válvulas del corazón pueden insertarse en el corazón, por ejemplo, durante un procedimiento a corazón abierto. En una realización, el proceso puede iniciarse poniendo el sujeto, tal como un paciente humano o primate u otro modelo animal grande, tal como una oveja, sobre soporte vital apropiado y abriendo la cavidad del pecho para hacer accesible el corazón. Entonces, puede realizarse una aortotomía transversa para hacer accesible la válvula natural a través del vaso, tal como la aorta. En una realización, el vaso es la aorta y la localización para abrir la aorta puede depender de la estructura precisa de la prótesis. Para prótesis típicas, la aorta generalmente puede cortarse aproximadamente 1 cm desde la unión sinotubular. La válvula natural dañada o enferma se extrae, preferentemente junto con todos los residuos de calcio y cálculos. La prótesis de válvula aórtica puede colocarse entre el anillo aórtico, un ligero estrechamiento en el que la aorta se une al corazón, y la unión sinotubular, un ligero estrechamiento de la aorta justo por debajo de la corriente de las arterias coronarias. Sin embargo, la prótesis puede extenderse más allá del anillo aórtico y/o la unión sinotubular. Para la colocación en el anillo aórtico, la prótesis puede lanzarse en la arteria amputada.

En realizaciones adicionales, la prótesis de válvula del corazón puede colocarse en el sitio de implantación, adyacente a la vasculatura apropiada, por ejemplo, la aorta. En una realización, el borde de entrada de la válvula puede suturarse o asegurarse de otro modo antes de asegurar el borde de salida con los cierres descritos en el

presente documento, aunque el borde de entrada puede asegurarse después del borde de salida. Además, puede desearse pegar las comisuras en su sitio antes de la aplicación de los cierres descritos en el presente documento. En una realización particular, los cierres, los refuerzos, si lo hay, y la prótesis pueden estar separados al inicio del procedimiento de implantación. Alternativamente, los elementos pueden estar pre-ensamblados. En otra realización, una vez se ha alineado apropiadamente la prótesis, puede colocarse un refuerzo en posición y los cierres pueden insertarse secuencialmente en una abertura en el refuerzo, a través de la prótesis y a través de la pared aórtica. Cuando todos los cierres se han insertado a través de un refuerzo, cualquier refuerzo adicional se asegura similarmente con cierres. Los cierres pueden insertarse usando presión del dedo, pinzas, una herramienta empujadora, un martillo o similares. Pueden usarse pinzas específicas que conectan específicamente con la cabeza de un cierre. Si no hay refuerzos, los cierres se colocan en una posición deseada y se insertan similarmente a través de la prótesis y la pared aórtica.

En algunas realizaciones, los cierres pueden insertarse en refuerzos antes del inicio del procedimiento de implantación. Los refuerzos pueden suministrarse al cirujano con los cierres insertados a través o parcialmente a través de aberturas en el refuerzo. En estas realizaciones, la cabeza o extremo romo de los cierres puede sobresalir de la superficie de los refuerzos. Así, el procedimiento puede simplificarse algo con respecto a un procedimiento en el que todos los componentes están separados antes de empezar el procedimiento. En estas realizaciones, una vez la prótesis se ha colocado correctamente en el vaso, puede alinearse un refuerzo con cierres en una localización deseada, y los cierres pueden utilizarse directamente empujando el cierre a través de la prótesis y a través de la pared de la aorta. Los cierres pueden insertarse secuencialmente, y una pluralidad de refuerzos puede asegurarse en este enfoque.

En realizaciones alternativas, uno o más refuerzos pueden unirse a la prótesis antes de empezar el procedimiento de implantación. Los refuerzos pueden asegurarse a la prótesis por el fabricante. Puede usarse sutura, adhesivo biocompatible u otro cierre adecuado para asegurar un refuerzo a la prótesis. Adhesivos biocompatibles adecuados incluyen, por ejemplo, pegamento de fibrina y otros pegamentos quirúrgicos. Una vez se ha posicionado correctamente la prótesis, los cierres pueden colocarse secuencialmente o simultáneamente dentro de una abertura en el refuerzo e insertarse a través de la prótesis y la pared de la aorta. Esto puede continuarse hasta que se utilicen todos los cierres.

En otras realizaciones más, las prótesis pueden suministrarse con refuerzos en su sitio y cierres insertados en los refuerzos. Los refuerzos pueden asegurarse a las prótesis usando el cierre insertado a través del refuerzo y, al menos, parcialmente a través de la prótesis. Alternativamente, el refuerzo puede asegurarse a la prótesis usando sutura, adhesivo u otro cierre. Una vez la prótesis está en su sitio dentro del animal o paciente, cada cierre puede empujarse a través de la pared del vaso para asegurar la prótesis. En otras realizaciones, como cierres pueden usarse suturas convencionales, aunque son eficaces y directas.

7. Aplicaciones adicionales de xenoinjertos

En otro aspecto de la presente invención, el dispositivo protésico según la reivindicación 1 derivado de animales que carecen de expresión de alfa-1,3-GT funcional puede usarse para la reconstrucción de partes del cuerpo de un ser humano. En ciertas realizaciones, puede usarse tejido dérmico descelularizado, hueso, ligamentos, tendones, válvulas del corazón, núcleo pulposo, cartílago, menisco, vasos sanguíneos, pericardio u otros tejidos descritos en el presente documento, por ejemplo, como se describe en la Tabla 6. En realizaciones particulares, el tejido puede usarse para la reconstrucción o reparación ortopédica humana, tal como la reparación del manguito de los rotadores, reparación de piel humana y/o reparación de tejido blando humano. Los xenoinjertos pueden probarse en una variedad de modelos animales, tales como modelos de primate o no primate, tal como oveja.

Pueden aplicarse xenoinjertos usando procedimientos quirúrgicos rutinarios comúnmente empleados para las aplicaciones de injerto de tejido. En una realización, por ejemplo, para su uso en aplicaciones de injerto de tejido no vascular, el material de injerto tubular puede cortarse longitudinalmente y estirarse para formar un "parche" de tejido. En otra realización, puede llevarse a cabo deslaminación de tejido sobre "parches" de tejido, tal como tejido intestinal, preparado cortando el segmento intestinal longitudinalmente y "desenrollándolo" para formar un parche de pre-injerto. Pueden utilizarse parches de tejido de injerto preparado, por ejemplo, como material de injerto de piel, para la reparación de duramadre, o para la reparación de otros defectos de tejido del cuerpo que se prestan a aplicación quirúrgica de un parche de injerto de tejido que tiene las características físicas y funcionales de la presente composición de injerto.

<p>Tabla 6: Aplicaciones / Usos de tejidos recolectados de animales que carecen de cualquier expresión de alfa-1,3-GT</p>
<p>Tejido dérmico, celularized o de-cellularized</p> <p>Aplicaciones: Hernia Reparación de la pared abdominal Reparación del manguito de los rotadores Eslingas para tratar la incontinencia urinaria La cirugía estética incluyendo la reconstrucción del seno, defectos faciales, labio reconstrucción del párpado injertos espaciadores, reparación cicatriz deprimida, Burns, el reemplazo de la piel injertos de mucosa pliegues nasolabiales repavimentación Oral parotidectomía Rinoplastia Reparación de una perforación septal Vendaje para heridas Temporal la cobertura de la herida Timpanoplastia vestibuloplastia Otros defectos de tejidos blandos</p> <p>Tejido dérmico se puede combinar con los siguientes materiales adicionales: Los factores de crecimiento para facilitar la curación más rápida, el reclutamiento de células (andamio), en combinación para promover la hemostasia Anti-cicatrización (fibrinógeno, fibrina 1)</p>
<p>Hueso</p> <p>Aplicaciones: El uso en la fractura y pequeña reparación de defectos del esqueleto óseo y defectos, lagunas en hueso, reparación de la médula, la reconstrucción maxilofacial, los implantes dentales pasta tapones óseos implantes de hueso patatas fritas Tornillos Anillos (húmero, peroné, cuña de mecanizado) Espigas (unicortical, clavija cortical roscada,) Blocks (bloques iliaca tricortical, bloque unicortical, bloque bicortical, bloque de esponjoso) Cuñas (cuña cortical, cuña cortical rotuliano) tiras moldeables los chips de esponjosa</p>
<p>polvo fusiones Vetebral ejes femorales Ejes femorales Hemi ejes del peroné ejes de húmero ejes tibiales</p>

(continúa)

<p>Hueso Ilión franja tricordical Tiras corticales esponjosos tiras corticales Injertos intercalares incluyendo cabeza femoral con o sin cartílago, total o parcial fémur, proximal o distal del fémur, proximal o distal tibia Los chips de esponjosa corticales El reemplazo total de la articulación La matriz ósea desmineralizada Bloque cortical lordotico</p> <p><u>El tejido óseo se puede combinar con ANV de los siguientes materiales adicionales:</u> Los factores de crecimiento (BMP) para la reparación de fracturas no sindicalizados Gelatina porcina como una matriz de suministro</p>
<p>Ligamentos / tendones <u>Aplicaciones:</u> Reparación del LCA / reemplazo Reparación PCL / reemplazo Tendón rotuliano incluyendo hueso Tendón tibial posterior Tendón tibial anterior Semitendonosis tendón gracilis tendón</p>
<p>Válvulas del corazón <u>Aplicaciones/Tipos:</u> Reparación / reemplazo válvula aórtica la válvula pulmonar Plumonicpatch Aorta torácica descendente Conducto no valvular aórtica Conducto no válvula pulmonar con LPA y el EPR / Pulmonar izquierda Hemi-arteria derecha con o sin cúspide intacta vena safena aortoiliaco vena femoral arteria femoral</p> <p><u>Las válvulas del corazón se pueden combinar con cualquiera de los siguientes materiales adicionales:</u> El uso de un material de anillo para la inserción quirúrgica</p>
<p>Núcleo pulposa <u>Aplicaciones</u> Reparación intervertebral / reemplazo</p> <p>El cartílago (células) <u>Aplicaciones</u> El cartílago de reemplazo (sustitución o como un andamio para promover nuevo crecimiento del cartílago).</p> <p><u>El cartílago se puede combinar con cualquiera de los siguientes materiales adicionales:</u> Los factores de crecimiento para promover la infiltración celular</p>

(continúa)

5	<p>Menisco <u>Aplicaciones:</u> Reparación / reemplazo Menisco lateral con el puente de hueso Medial del menisco con el puente de hueso</p> <p><u>Menisco se puede combinar con cualquiera de los siguientes materiales adicionales:</u> Plástico o metales para facilitar la implantación</p>
15	<p>Vasos sanguíneos <u>Aplicaciones:</u> Sustitución / reparación de los vasos sanguíneos, con exclusión de aquellos vasos sanguíneos asociado con, o una parte integral de, órganos enteros para el trasplante. La sustitución de la arteria carótida / reparación</p>
20	<p>Pericardio <u>Aplicaciones:</u> <input checked="" type="checkbox"/> Parche utilizado en procedimientos quirúrgicos cuando se necesita la regeneración de tejidos; funciona como una barrera de protección y estabilización en una combinación de sitio quirúrgico de otros materiales: Los factores de crecimiento para facilitar la curación más rápida, el reclutamiento de células (andamio), en combinación para promover la hemostasia Anti-cicatrización (fibrinógeno, fibrina 1)</p>
30	<p>Submucosa del intestino delgado <u>Aplicaciones:</u> reparación del manguito de los rotadores hernia reparación de la pared abdominal eslingas para tratar la incontinencia urinaria quemaduras reemplazo de la piel cirugía estética incluyendo la reconstrucción del seno, defectos faciales, la reconstrucción de labios, párpados injertos espaciadores, deprimido la reparación de la cicatriz, injertos mucosos, pliegues nasolabial, repavimentación oral, parotidectomía, reparación perforación septal, rinoplastia apósito para heridas temporal, la cobertura de heridas timpanoplastia vestibuloplastia otros defectos de tejidos blandos</p>
40	<p>injertos vasculares, incluyendo venosa, arterial o capilar</p>
45	<p>Otros tejidos blandos OTA de cuña para corregir valgo y varo desalineación Fascia utiliza para corregir la incontinencia urinaria</p>

50 II ANIMALES QUE CARECEN DE CUALQUIER EXPRESIÓN DE ALFA-1,3-GALACTOSILTRANSFERASA FUNCIONAL

55 Se desvelan tejidos de animales que carecen de cualquier expresión funcional de alfa-1,3-galactosiltransferasa. En una realización, el animal es un porcino. En otra realización, el animal es un bovino o un ovino. En otras realizaciones, se proporcionan animales en los que un alelo del gen alfa-1,3-GT se inactiva mediante un evento de elección de diana genética. En otro aspecto de la presente divulgación, se proporcionan animales en los que ambos alelos del gen alfa-1,3-GT se inactivan mediante un evento de elección de diana genética. En una realización, el gen puede elegirse como diana mediante recombinación homóloga. En otras realizaciones, el gen puede alterarse, es decir, puede alterarse una porción del código genético, afectando así la transcripción y/o traducción de ese segmento del gen. Por ejemplo, la alteración de un gen puede producirse mediante técnicas de sustitución, delección ("inactivación") o inserción ("activación"). Pueden insertarse genes adicionales para una proteína deseada o secuencia reguladora que modula la transcripción de una secuencia existente.

65 Animales, además de los monos del viejo mundo y seres humanos, tales como cerdos, que poseen dos alelos inactivos del gen alfa-1,3-GT no se producen naturalmente. Se descubrió sorprendentemente que mientras que se intentaba inactivar el segundo alelo del gen alfa-1,3-GT mediante un evento de elección de diana genética, se

identificó una mutación puntual, que inactivó el segundo alelo.

Así, en otro aspecto de la presente divulgación, el gen alfa-1,3-GT puede inactivarse mediante al menos una mutación puntual. En una realización, un alelo del gen alfa-1,3-GT puede inactivarse mediante al menos una mutación puntual. En otra realización, ambos alelos del gen alfa-1,3-GT pueden inactivarse mediante al menos una mutación puntual. En una realización, esta mutación puntual puede producirse mediante un evento de elección de diana genética. En otra realización, esta mutación puntual puede producirse naturalmente. En una realización específica, la mutación puntual puede ser una mutación de T a G en la segunda base del exón 9 del gen alfa-1,3-GT. Cerdos que llevan una mutación puntual que se produce naturalmente en el gen alfa-1,3-GT permiten la producción de cerdos deficientes en alfa-1,3-GT libres de genes de resistencia a antibióticos y así tienen la posibilidad de hacer 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 inactivar el gen alfa-1,3-GT. En otras realizaciones, se proporcionan cerdos en los que ambos alelos del gen alfa-1,3-GT contienen mutaciones puntuales que previenen cualquier expresión de alfa-1,3-GT funcional. En una realización específica, se proporcionan cerdos que contienen la mutación de T a G en la segunda base del exón 9 en ambos alelos del gen alfa-1,3-GT.

Otro aspecto de la presente divulgación proporciona un animal, en el que ambos alelos del gen alfa-1,3-GT se inactivan, por lo que un alelo se inactiva por un evento de elección de diana genética y el otro alelo se inactiva mediante una mutación puntual que se produce naturalmente. En una realización, se desvela un animal porcino, en el que ambos alelos del gen alfa-1,3-GT se inactivan, por lo que un alelo se inactiva por un evento de elección de diana genética y el otro alelo se inactiva debido a la presencia de una mutación puntual de T a G en la segunda base del exón 9. En una realización específica, se desvela un animal porcino, en el que ambos alelos del gen alfa-1,3-GT se inactivan, por lo que un alelo se inactiva mediante una construcción que elige diana dirigida al exón 9 y el otro alelo se inactiva debido a la presencia de una mutación puntual de T a G en la segunda base del exón 9.

Elección de diana genética del gen alfa-1,3-GT

Pueden obtenerse células de animales que pueden modificarse genéticamente a partir de una variedad de diferentes órganos y tejidos tales como, pero no se limitan a, piel, mesénquima, pulmón, páncreas, corazón, intestino, estómago, vejiga, vasos sanguíneos, riñón, uretra, órganos reproductores, y una preparación desagregada de un embrión completo o parte de un embrión, feto o animal adulto. En una realización de la divulgación, pueden seleccionarse células del grupo que consiste en, pero no se limita a, células epiteliales, células de fibroblasto, células neurales, queratinocitos, células hematopoyéticas, melanocitos, condrocitos, linfocitos (B y T), macrófagos, monocitos, células mononucleares, células de músculo cardíaco, otras células de músculo, células granulosas, células del cúmulo, células epidérmicas, células endoteliales, células de islotes de Langerhans, glóbulos sanguíneos, células precursoras de la sangre, células óseas, células precursoras de hueso, citoblastos neuronales, citoblastos primordiales, hepatocitos, queratinocitos, células endoteliales de la vena umbilical, células endoteliales aórticas, células endoteliales microvasculares, fibroblastos, células estrelladas del hígado, células de 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 pancreáticas de los islotes, células tiroideas, células paratiroideas, células parótidas, células tumorales, células de la glía, astrocitos, glóbulos rojos, glóbulos blancos, macrófagos, células epiteliales, células somáticas, células pituitarias, células suprarrenales, células pilosas, células de la vejiga, de riñón, células retinianas, células de los bastones, células de los conos, células del corazón, células de los nódulos sinusales, células del bazo, células presentadoras de antígeno, células de memoria, linfocitos T, linfocitos B, células plasmáticas, células de músculo, células de ovario, células uterinas, células de próstata, células epiteliales vaginales, espermatozoides, células testiculares, células germinativas, óvulos, células de Leydig, células peritubulares, células de Sertoli, células luteínicas, células cervicales, células endometriales, células mamarias, células foliculares, células mucosas, células ciliadas, células epiteliales no queratinizadas, células epiteliales queratinizadas, células de pulmón, células caliciformes, células epiteliales columnares, células epiteliales escamosas, osteocitos, osteoblastos y osteoclastos.

En una realización alternativa, pueden usarse embriocitoblastos. Puede emplearse una línea de embriocitoblastos o pueden obtenerse embriocitoblastos frescos de un huésped, tal como un animal porcino. Las células pueden cultivarse sobre un capa alimentadora de fibroblastos apropiada o cultivarse en presencia de factor inhibidor de leucemia (LIF). En una realización preferida, las células pueden ser fibroblastos; en una realización específica, las células pueden ser fibroblastos fetales. Las células de fibroblastos son un tipo de célula somática preferida debido a que 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 clónicamente para su uso en procedimientos que eligen genes como diana.

Construcciones que eligen diana

Recombinación homóloga

La recombinación homóloga permite modificaciones específicas de sitio en genes endógenos y así pueden manipularse novedosas alteraciones en el genoma. En la recombinación homóloga, el ADN entrante interactúa con y se integra en un sitio en el genoma que contiene una secuencia de ADN sustancialmente homóloga. En la integración no homóloga ("aleatoria" o "ilícita"), el ADN entrante no se encuentra en una secuencia homóloga en el genoma, pero se integra en cualquier parte, en una de un gran número de posibles localizaciones. En general, estudios con células eucariotas superiores han revelado que la frecuencia de recombinación homóloga es mucho menor a la frecuencia de integración aleatoria. La relación de estas frecuencias tiene implicaciones directas para la "elección de diana génica" que dependen de la integración mediante recombinación homóloga (es decir, recombinación entre el "ADN que elige diana" exógeno y el "ADN diana" correspondiente en el genoma).

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

Un aspecto de la presente divulgación usa recombinación homóloga para inactivar el gen alfa-1,3-GT en células, tales como las células descritas anteriormente. El ADN puede comprender al menos una porción del (de los) gen(es) en el sitio particular con introducción de una alteración en al menos una, opcionalmente ambas copias, del (de los) gen(es) nativo(s), de manera que se prevenga la expresión de alfa-1,3-GT funcional. La alteración puede ser una inserción, delección, sustitución o combinación de las mismas. Cuando la alteración se introduce en solo una copia del gen que se inactiva, las células que tienen una única copia no mutada del gen diana se amplifican y pueden someterse a una segunda etapa de elección de diana, en la que la alteración puede ser igual o diferente de la primera alteración, normalmente diferente, y si participa una delección, o sustitución, puede ser solapante al menos una porción de la alteración originalmente introducida. En esta segunda etapa que elige diana puede usarse un vector que elige diana con los mismos brazos de homología, pero que contiene marcadores de selección de mamífero diferentes. Los transformantes resultantes se criban para la ausencia de un antígeno diana funcional y el ADN de la célula puede cribarse adicionalmente para garantizar la ausencia de un gen diana no mutante. Alternativamente, puede lograrse homocigosidad en cuanto a un fenotipo criando huéspedes heterocigóticos para la mutación.

Vectores que eligen diana

La modificación de un sitio elegido como diana de una célula puede producirse introduciendo ADN en las células, en las que el ADN tiene homología con el sitio 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 sitio diana. El gen marcador puede flanquearse en ambos lados por secuencias de ADN homólogas, un brazo de recombinación en 3' y un brazo de recombinación en 5'. Se han descrito en la materia métodos para la construcción de vectores que eligen diana, véase, por ejemplo, Dai y col., Nature Biotechnology 20: 251-255, 2002; documento WO 00/51424.

Pueden prepararse diversas construcciones para la recombinación homóloga en un sitio diana. La construcción puede incluir al menos 50 pb, 100 pb, 500 pb, 1 kbp, 2 kbp, 4 kbp, 5 kbp, 10 kbp, 15 kbp, 20 kbp o 50 kbp, de secuencia homóloga al sitio diana. La secuencia puede incluir cualquier secuencia contigua del gen alfa-1,3-GT porcino (véase, por ejemplo, n° de acceso de GenBank L36152, documento WO0130992 concedido a la Universidad de Pittsburgh del Commonwealth System of Higher Education; documento WO 01/123541 concedido a Alexion, Inc.).

Pueden suponerse diversas consideraciones en la determinación del grado de homología de secuencias de ADN diana, tales como, por ejemplo, el tamaño del sitio diana, disponibilidad de secuencias, eficiencia relativa de eventos de entrecruzamientos dobles en el sitio diana y la similitud de la secuencia diana con otras secuencias.

El ADN que elige diana 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 que va a modificarse. La secuencia sustancialmente isogénica puede ser al menos aproximadamente el 95 %, 97-98 %, 99,0-99,5 %, 99,6-99,9 % o el 100 % idéntica a la secuencia diana correspondiente (excepto por las modificaciones de secuencia deseadas). El ADN que elige diana y el ADN diana pueden compartir preferentemente estiramientos de ADN de al menos aproximadamente 75, 150 ó 500 pares de bases que son el 100 % idénticos. Por consiguiente, el ADN que elige diana puede derivarse de células estrechamente relacionadas con la línea celular que se elige como diana; o el ADN que elige diana puede derivarse de células de la misma línea celular o animal que las células que se eligen como diana.

Las construcciones de ADN pueden diseñarse para modificar la alfa-1,3-GT diana endógena. La secuencia

homóloga para elegir como diana la construcción puede tener una o más deleciones, inserciones, sustituciones o combinaciones de las mismas. La alteración puede ser la inserción de un gen marcador de selección fusionado en el marco de lectura con la secuencia en la dirección 5' del gen diana.

5 Genes marcadores de selección adecuados incluyen, pero no se limitan a: genes que confieren la capacidad de cultivarse sobre ciertos sustratos de medio, tales como el gen tk (timidina cinasa) o el gen hprt (hipoxantina fosforribosiltransferasa) que confieren la capacidad de cultivarse sobre medio HAT (hipoxantina, aminopterin y timidina); el gen gpt bacteriano (guanina/xantina fosforribosiltransferasa) que permite el crecimiento sobre medio MAX (ácido micofenólico, adenina y xantina). Véanse, por ejemplo, Song, K-Y., y col., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 84:6820-6824 (1987); Sambrook, J., y col., 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 cultivarse sobre sustratos seleccionados, genes que codifican proteínas que producen señales detectables tales como luminiscencia, tales como proteína verde fluorescente, proteína verde fluorescente potenciada (eGFP). Se conocen y están disponibles una amplia variedad de tales marcadores, que incluyen, 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. y col., Nature 348:649-651 (1990)). Otros genes marcadores de selección incluyen: acetohidroxiácido sintasa (AHAS), fosfatasa alcalina (AP), beta galactosidasa (LacZ), beta gluconidasa (GUS), cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), proteína verde fluorescente (GFP), proteína roja fluorescente (RFP), proteína amarilla fluorescente (YFP), proteína cian fluorescente (CFP), peroxidasa de rábano picante (HRP), luciferasa (Luc), nopalina sintasa (NOS), octopina sintasa (OCS) y derivados de las mismas. Están disponibles múltiples marcadores de selección que confieren resistencia a ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, kanamicina, lincomicina, metotrexato, fosfinotricina, puromicina y tetraciclina.

25 Los métodos para la incorporación de genes de resistencia a antibióticos y factores de selección negativos serán conocidos para aquellos expertos habituales en la materia (véanse, por ejemplo, el documento WO 99/15650; la patente de EE.UU. nº 6.080.576; la patente de EE.UU. nº 6.136.566; Niwa y col., J. Biochem. 113:343-349 (1993); y Yoshida y col., Transgenic Research 4:277-287 (1995)).

30 También pueden usarse combinaciones de marcadores de selección. Por ejemplo, para elegir como diana alfa-1,3-GT, un gen neo (con o sin su promotor propio, como se trata anteriormente) puede clonarse en una secuencia de ADN que es homóloga al gen alfa-1,3-GT. Para usar una combinación de marcadores, el gen HSV-tk puede clonarse de forma que esté fuera del ADN que elige diana (podría ponerse otro marcador de selección sobre el flanco opuesto, si se desea). Después de introducir la construcción de ADN en las células que van a elegirse como diana, las células pueden seleccionarse sobre los antibióticos apropiados. En este ejemplo particular, es más probable que aquellas células que son resistentes a G418 y ganciclovir se hayan producido por recombinación homóloga en la que el gen neo se ha recombinado en el gen alfa-1,3-GT, pero el gen tk se ha perdido debido a que se localizó fuera de la región del entrecruzamiento doble.

40 Las deleciones pueden tener al menos aproximadamente 50 pb, más normalmente al menos aproximadamente 100 pb, y generalmente no más de aproximadamente 20 kbp, en las que la deleción puede incluir normalmente al menos una porción de la región codificante que incluye una porción de o uno o más exones, una porción de o uno o más intrones, y puede o puede no incluir una porción de las regiones no codificantes flanqueantes, particularmente la región no codificante de 5' (región reguladora de la transcripción). Así, la región homóloga puede extenderse más allá de la región codificante en la región no codificante de 5' o alternativamente en la región no codificante de 3'. Las inserciones pueden generalmente no superar 10 kbp, normalmente no superar 5 kbp, teniendo generalmente al menos 50 pb, más normalmente al menos 200 pb.

50 La(s) región (regiones) de homología puede(n) incluir mutaciones, en las que las mutaciones pueden inactivar adicionalmente el gen diana, proporcionando un desplazamiento del marco, o cambiando un aminoácido clave, o la mutación puede corregir un alelo disfuncional, etc. La mutación puede ser un cambio imperceptible, no superando aproximadamente el 5 % de las secuencias flanqueantes homólogas. Si se desea la mutación de un gen, el gen marcador puede insertarse en un intrón o un exón.

55 La construcción puede prepararse según métodos conocidos en la técnica, diversos fragmentos pueden ponerse juntos, introducirse en vectores apropiados, clonarse, analizarse y a continuación manipularse adicionalmente hasta que se haya logrado la construcción deseada. Pueden hacerse diversas modificaciones a la secuencia, para permitir el análisis de restricción, escisión, identificación de sondas, etc. Pueden introducirse mutaciones silenciosas, según se desee. En diversas etapas, pueden emplearse análisis de restricción, secuenciación, amplificación con la reacción en cadena de la polimerasa, reparación de cebadores, mutagénesis *in vitro*, etc.

65 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 etapa la construcción puede clonarse y analizarse. Puede emplearse un marcador, el mismo o diferente del marcador que va a usarse para la 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, introducción de una delección corta en la secuencia homóloga. Después de la manipulación final, la construcción puede introducirse en la célula.

5 En la presente se divulgan construcciones recombinantes que contienen secuencias del gen alfa-1,3-GT. Las construcciones comprenden un vector, tal como un plásmido o vector viral, en el que se ha insertado una secuencia de la divulgación, en una orientación directa o inversa. La construcción también puede incluir secuencias reguladoras, que incluyen, por ejemplo, un promotor, operativamente ligado a la secuencia. Grandes números de
10 vectores adecuados y promotores son conocidos para aquellos expertos en la materia, y están comercialmente disponibles. Los siguientes vectores se proporcionan a modo de ejemplo. Bacterianos: pBs, pQE-9 (Qiagen), phagescript, PsiX174, 30 pBluescript SK, pBsKS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene); pTrc99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia). Eucariotas: pWlneo, pSv2cat, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPv, pMSG, pSVL (Pharmacia), vectores de origen viral (vectores M13, vectores del fago bacteriano 1,
15 vectores de adenovirus y vectores de retrovirus), vectores de número de copias alto, bajo y ajustable, vectores que tienen replicones compatibles para su uso en combinación en un único huésped (pACYC184 y pBR322) y vectores de replicación episómica eucariota (pCDM8). Otros vectores incluyen vectores de expresión procarionta 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
20 variantes y derivados de los mismos. Otros vectores incluyen vectores de expresión eucariota tales como pFastBac, pFastBacHT, pFastBacDUAL, pSFV y pTet-Splice (Invitrogen), pEUK-CI, 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, pMCIneo 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
25 variantes o derivados de los mismos. Vectores adicionales que pueden usarse incluyen: pUC18, pUC19, pBlueScript, pSPORT, cósmidos, fagémidos, YAC (cromosomas artificiales de levadura), 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,
30 pcDNA3.1/His, pcDNA3.1(-)/Myc-His, pSecTag, pEBVHis, pPIC9K, pPIC3.5K, pA0815, 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, pREP 10, 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-4T-3, 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, pLAPS, 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, pMCIneo, pMCIneo 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 dos híbridos y de dos híbridos 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 en tanto que sean replicables y viables en el huésped.

Técnicas que pueden usarse para permitir la entrada de la construcción de ADN en la célula huésped incluyen coprecipitación con fosfato de calcio/ADN, microinyección de ADN en el núcleo, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, transfección, o cualquier otra técnica conocida por un experto en la materia. El ADN puede ser ADN mono o bicatenario, lineal o circular, relajado o superenrollado. Para diversas técnicas para
65

transfectar células de mamífero, véase, por ejemplo, Keown y col., *Methods in Enzymology* Vol. 185, pp. 527-537 (1990).

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

Selección de células homológamente recombinadas

A continuación, las células pueden cultivarse en medio apropiadamente seleccionado para identificar células que proporcionan la integración apropiada. La presencia del gen marcador de selección insertado en el gen alfa-1,3-GT establece la integración de la construcción diana en el genoma del huésped. Aquellas células que muestran el fenotipo deseado pueden entonces analizarse adicionalmente por análisis de restricción, electroforesis, análisis de Southern, reacción en cadena de la polimerasa, etc., para analizar el ADN con el fin de establecer si se produjo recombinación homóloga o no homóloga. Esto puede determinarse empleando sondas para el inserto y secuenciando a continuación las regiones de 5' y 3' que flanquean el inserto para la presencia del gen alfa-1,3-GT que se extiende más allá de las regiones flanqueantes de la construcción o identificando la presencia de una deleción, cuando se introduce tal deleción. 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 sitio diana. De esta forma, solo pueden obtenerse dúplex de ADN que tienen ambos cebadores presentes en las cadenas complementarias si se ha producido la recombinación homóloga. Demostrando la presencia de las secuencias de cebadores o la secuencia de tamaño esperada, se soporta la aparición de recombinación homóloga.

La reacción en cadena de la polimerasa usada para cribar eventos de recombinación homóloga se conoce en la técnica, véanse, por ejemplo, Kim y Smithies, *Nuclei Acids Res.* 16:8887-8903, 1988; y Joyner y col., *Nature* 338:153-156, 1989. Se ha mostrado que la combinación específica de un potenciador del poliovirus mutante y un promotor de timidina cinasa para conducir el gen neomicina es activa en tanto embriocitoblastos como células EC por Thomas y Capecchi, arriba, 1987; Nicholas y Berg (1983) en *Teratocarcinoma Stem Cell*. Siver, Martin y Strikland (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N.Y. (pp. 469-497); y Linney y Donerly, *Cell* 35:693-699, 1983.

Es probable que las líneas celulares obtenidas de la primera ronda de elección de diana sea heterocigóticas para el alelo elegido como diana. La homocigosidad, en la que ambos alelos se modifican, puede lograrse de varias formas. Un enfoque es cultivar varias células en las que una copia se ha modificado y a continuación someter estas células a otra ronda de elección de diana usando un marcador de selección diferente. Alternativamente, pueden obtenerse homocigotos criando animales heterocigóticos para el alelo modificado, según la genética mendeliana tradicional. En algunas situaciones, puede desearse tener dos alelos modificados diferentes. Esto puede lograrse por rondas sucesivas de elección de genes como diana o criando heterocigotos, cada uno de los cuales lleva uno de los alelos modificados deseados.

Mutación inducida del sitio alfa-1,3-GT

En ciertas otras realizaciones, los métodos de la divulgación 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 divulgación incluyen, pero no se limitan a, mutágenos químicos (por ejemplo, sustancias químicas intercalantes de ADN o de unión a ADN tales como N-etil-N-nitrosourea (ENU), metanosulfonato de etilo (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 de ADN, inhibidores de la reparación de ADN y ADN polimerasas propensas al error y proteínas de replicación), además de inserción de transposones. Según los métodos de la presente divulgación, pueden exponerse células en cultivo a uno de estos agentes, y puede seleccionarse cualquier mutación que produzca el agotamiento de galactosa alfa-1,3-galactosa sobre la superficie celular, por ejemplo, mediante exposición a la toxina A.

Se conocen en la técnica dosis preferidas de mutágenos químicos para inducir mutaciones en células, o pueden determinarse fácilmente por el experto en la materia usando ensayos de mutagénesis conocidos en la técnica. La mutagénesis química de células *in vitro* puede lograrse 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 dosis es posible llevar a cabo el grado óptimo de mutagénesis para el fin previsto, mutando así un número deseado 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 menores y mayores dosis y tiempos de

exposición para lograr la frecuencia de mutación deseada.

Identificación de células que no expresan alfa-1,3-GT funcional

5 En una realización, el procedimiento de selección puede basarse en una toxina bacteriana para seleccionar células que carecen de expresión de alfa-1,3-GT funcional. En otra realización, la toxina bacteriana, toxina A producida por *Clostridium difficile*, puede usarse para seleccionar células que carecen del epítipo de la superficie celular galactosa-alfa-1,3-galactosa. La exposición a la toxina de *C. difficile* puede producir el redondeo de las células que presentan este epítipo sobre su superficie, liberando las células de la matriz de placa. Tanto las inactivaciones como las mutaciones de genes elegidos como diana que inhabilitan la función o expresión enzimática pueden detectarse usando este método de selección. Entonces, pueden usarse células que carecen de expresión superficial de células del epítipo de galactosa-alfa-1,3-galactosa, identificado usando la selección mediada por toxina A descrita, o producida usando métodos convencionales de inactivación de genes que incluyen elección de genes como diana, para producir animales, en los que ambos alelos del gen alfa-1,3-GT son inactivos.

15 En una realización, el método de selección puede detectar el agotamiento del epítipo alfa-1,3-GT directamente, tanto debido a la inactivación elegida como diana del gen alfa-1,3-GT por recombinación homóloga como a una mutación en el gen que produce una enzima no funcionante o no expresada. La selección mediante resistencia a antibióticos se ha usado más comúnmente para el cribado (véase anteriormente). Este método puede detectar la presencia del gen de resistencia sobre el vector que elige diana, pero no indica directamente si la integración fue un evento de recombinación elegido como diana o una integración aleatoria. Cierta tecnología, tal como poli A y tecnología de trampa de promotor, aumentan la probabilidad de eventos elegidos como diana, pero de nuevo, no dan evidencia directa de que se haya logrado 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 elegida como diana; en estos casos, el gen para un factor letal para las células se inserta de tal forma que solo acontecimientos elegidos como diana permitan a la célula evitar la muerte. Las células seleccionadas por estos métodos pueden entonces ensayarse para la alteración de genes, integración de vectores y, finalmente, agotamiento de epítopos alfa-1,3-gal. En estos casos, como la selección se basa en la detección de la integración de vectores que eligen diana y no en el fenotipo alterado, solo pueden detectarse las inactivaciones elegidas como diana, no las mutaciones puntuales, transposiciones o truncaciones de genes u otras modificaciones tales.

20 En otra realización, el procedimiento de selección puede realizarse usando suero que contiene factores del complemento y anticuerpos naturales para el epítipo de gal alfa1,3Gal (véase, por ejemplo, Koike y col., *Xenotransplantation* 4:147-153, 1997). La exposición a suero de un primate humano o no humano que contiene anticuerpos anti-Gal puede producir la lisis celular debido a la unión de anticuerpos específicos y la activación del complemento en células que presentan el epítipo gal alfa-1,3-gal. Por tanto, las células deficientes en alfa-1,3-GT seguirán vivas y así pueden seleccionarse.

25 Pueden caracterizarse adicionalmente células de animales que se cree que carecen de expresión de alfa-1,3-GT funcional. Tal caracterización puede llevarse a cabo por las siguientes técnicas, que incluyen, pero no se limitan a: análisis por PCR, análisis de transferencia Southern, análisis de transferencia Northern, ensayos de unión a lectina específica y/o análisis de secuenciación.

30 Puede usarse el análisis por PCR como se describe en la materia (véase, por ejemplo, Dai y col., *Nature Biotechnology* 20:431-455) para determinar la integración de vectores que eligen diana. En una realización, pueden originarse amplímeros en el gen de resistencia a antibióticos y extenderse en una región fuera de la secuencia del vector. También puede usarse análisis de Southern (véase, por ejemplo, Dai y col., *Nature Biotechnology* 20:431-455) para caracterizar modificaciones macroscópicas en el sitio, tales como la integración de un vector que elige diana en el sitio de alfa-1,3-GT. Mientras tanto, puede usarse análisis Northern para caracterizar el transcrito producido a partir de cada uno de los alelos.

35 La unión a lectina específica, usando lectina GSL IB4 de *Griffonia* (*Bandeiraea*) *simplicifolia* (Vector Labs), una lectina que se une específicamente al resto de hidrato de carbono de gal alfa-1,3-gal, y el análisis FACS (citometría de flujo por anticuerpos fluorescentes) de unión pueden determinar si el epítipo alfa-1,3-gal está presente o no sobre las células. Este tipo de análisis implica la adición de lectina GSL IB4 marcada con fluoresceína a las células y posterior citometría de flujo.

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

45 En el presente documento se divulga un método para producir animales viables, tales como cerdos, en los que ambos alelos del gen alfa-1,3-GT se han inactivado. En una realización, los animales se producen clonando usando un núcleo donante de una célula en la que ambos alelos del gen alfa-1,3-GT se han inactivado. En una realización, ambos alelos del gen alfa-1,3-GT se inactivan mediante un evento de elección de diana genética. En otra realización, ambos alelos del gen alfa-1,3-GT se inactivan debido a la presencia de una mutación puntual. En otra

- realización, un alelo se inactiva por un evento de elección de diana genética y el otro alelo se inactiva mediante una mutación puntual. En otra realización, un alelo se inactiva por un evento de elección de diana genética y el otro alelo se inactiva debido a la presencia de una mutación puntual de T a G en la segunda base del exón 9 del gen alfa-1,3-GT. En una realización específica, un alelo se inactiva mediante una construcción que elige diana dirigida al exón 9 y el otro alelo se inactiva debido a la presencia de una mutación puntual de T a G en la segunda base del exón 9 del gen alfa-1,3-GT. En otra realización, un método para clonar tales animales, por ejemplo, cerdos, incluye: desnuclear un ovocito, fusionar el ovocito con un núcleo donante de una célula en la que ambos alelos del gen alfa-1,3-GT se han inactivado e implantar el embrión derivado de la transferencia nuclear en una madre de alquiler.
- Alternativamente, se desvela un método para producir animales viables que carecen de cualquier expresión de alfa-1,3-GT funcional inactivando ambos alelos del gen alfa-1,3-GT en embriocitoblastos, que pueden entonces usarse para producir descendencia.
- Animales genéticamente alterados que pueden crearse modificando cigotos directamente. Para mamíferos, los cigotos modificados pueden entonces introducirse en el útero de una hembra pseudopreñada que puede llevar el animal a término. Por ejemplo, si se desean animales completos que carecen del gen alfa-1,3-GT, entonces embriocitoblastos derivados de ese animal pueden elegirse como diana y después introducirse en blastocistos para cultivar las células modificadas en animales quiméricos. Para embriocitoblastos, puede usarse tanto una línea de embriocitoblastos como citoblastos recientemente obtenidos.
- En una realización adecuada de la divulgación, las células totipotentes son embriocitoblastos (ES). El aislamiento de células ES de blastocistos, el establecimiento de líneas de células ES y su posterior cultivo se llevan a cabo por métodos convencionales como se describen, por ejemplo, por Doetchmann y col., *J. Embryol. Exp. Morph.* 87:27-45 (1985); Li y col., *Cell* 69:915-926 (1992); Robertson, E. J. "Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach", ed. E. J. Robertson, IRL Press, Oxford, England (1987); Wurst y Joyner, "Gene Targeting: A Practical Approach", ed. A. L. Joyner, IRL Press, Oxford, England (1993); Hogen y col., "Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual", eds. Hogan, Beddington, Costantini y Lacy, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1994); y Wang y col., *Nature* 336:741-744 (1992). En otra realización adecuada de la divulgación, las células totipotentes son células germinativas embrionarias (EG). Las células germinativas embrionarias son células indiferenciadas funcionalmente equivalentes a células ES, es decir, pueden cultivarse y transfectarse *in vitro*, entonces contribuyen a linajes de células somáticas y germinativas de una quimera (Stewart y col., *Dev. Biol.* 161:626-628 (1994)). Las células EG se derivan por cultivo de células germinativas primordiales, los progenitores de los gametos, con una combinación de factores de crecimiento: factor inhibidor de leucemia, factor Steel y factor de crecimiento de fibroblastos básico (Matsui y col., *Cell* 70:841-847 (1992); Resnick y col., *Nature* 359:550-551 (1992)). El cultivo de células EG puede llevarse a cabo usando métodos descritos en el artículo por Donovan y col., "Transgenic Animals, Generation and Use", Ed. L. M. Houdebine, Harwood Academic Publishers (1997), y en la bibliografía original citada en su interior.
- Pueden obtenerse blastocistos tetraploides para su uso en la divulgación por producción y desarrollo de cigotos naturales, o por métodos conocidos por electrofusión de embriones bicelulares y posteriormente cultivarse como se describe, por ejemplo, por James y col., *Genet. Res. Camb.* 60:185-194 (1992); Nagy y Rossant, "Gene Targeting: A Practical Approach", ed. A. L. Joyner, IRL Press, Oxford, England (1993); o por Kubiak y Tarkowski, *Exp. Cell Res.* 157:561- 566 (1985).
- La introducción de las células ES o células EG en los blastocistos puede llevarse a cabo por cualquier método conocido en la técnica. Un método adecuado para los fines de la presente divulgación es el método de microinyección como se describe por Wang y col., *EMBO J.* 10:2437-2450 (1991).
- Alternativamente, pueden producirse animales transgénicos por embriocitoblastos modificados. Los embriocitoblastos genéticamente modificados pueden inyectarse en un blastocisto y a continuación llevarse a término en un mamífero huésped hembra según técnicas convencionales. La progenie heterocigótica puede entonces cribarse para la presencia de la alteración en el sitio del sitio diana, usando técnicas tales como PCR o transferencia Southern. Después de cruzarse con un huésped no mutante de la misma especie, la progenie quimérica resultante puede entonces cruzarse entre razas para lograr huéspedes homocigóticos.
- Después de transformar embriocitoblastos con el vector que elige diana para alterar el gen alfa-1,3-GT, las células pueden sembrarse sobre una capa alimentadora 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, las colonias pueden recogerse y analizarse para la aparición de recombinación homóloga. Puede usarse reacción en cadena de la polimerasa, con cebadores dentro y sin la secuencia de construcción, pero en el sitio diana. Aquellas colonias que muestran recombinación homóloga pueden entonces usarse para la manipulación de embriones y la inyección de blastocistos. Pueden obtenerse blastocistos de hembras superovuladas. Los embriocitoblastos pueden entonces tripsinarse y añadirse las células modificadas a una gotita que contiene los blastocistos. Al menos uno de los embriocitoblastos modificados puede inyectarse en el blastocele del blastocisto. Después de la inyección, al menos uno de los blastocistos puede devolverse a cada

trompa uterina de hembras pseudopreñadas. Entonces se deja que las hembras lleguen a término y las camadas resultantes se criban para células mutantes que tienen la construcción. Los blastocistos están seleccionados para diferente linaje de las células ES transformadas. Proporcionando un fenotipo diferente del blastocisto y las células ES, puede detectarse fácilmente progenie quimérica, y a continuación puede realizarse genotipado para investigar la presencia del gen alfa-1,3-GT modificado.

Transferencia nuclear de células somáticas para producir descendencia transgénica clonada

La presente divulgación proporciona un método para clonar un animal, tal como un cerdo, que carece de un gen alfa-1,3-GT funcional mediante transferencia nuclear de células somáticas. En general, el animal puede producirse por un proceso de transferencia nuclear que comprende las siguientes etapas: obtener células diferenciadas deseadas que van a usarse como fuente de núcleos donantes; obtener ovocitos del animal; desnuclear dichos ovocitos; transferir la célula diferenciada deseada o núcleo de célula al ovocito desnucleado, por ejemplo, por fusión o inyección, para formar unidades de NT; activar la unidad de NT resultante; y transferir dicha unidad de NT cultivada a un animal huésped de forma que la unidad de NT se desarrolle en un feto.

Se conocen técnicas de transferencia nuclear o trasplante nuclear en la técnica (Dai y col., *Nature Biotechnology* 20:251-255; Polejaeva y col., *Nature* 407:86-90 (2000); Campbell y col., *Theriogenology*, 43:181 (1995); Collas y col., *Mol. Report Dev.*, 38:264-267 (1994); Keefer y col., *Biol. Reprod.*, 50:935-939 (1994); Sims y col., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90:6143-6147 (1993); documentos WO 94/26884; WO 94/24274 y WO 90/03432, patentes de EE.UU. nº 4.944.384 y 5.057.420).

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

Pueden obtenerse células donantes nucleares somáticas de una variedad de órganos y tejidos diferentes tales como, pero no se limitan a, piel, mesénquima, pulmón, páncreas, corazón, intestino, estómago, vejiga, vasos sanguíneos, riñón, uretra, órganos reproductores, y una preparación desagregada de todo o parte de un embrión, feto o animal adulto. En una realización adecuada de la divulgación, las células donantes nucleares están seleccionadas del grupo que consiste en células epiteliales, células de fibroblasto, células neurales, queratinocitos, células hematopoyéticas, melanocitos, condrocitos, linfocitos (B y T), macrófagos, monocitos, células mononucleares, células de músculo cardíaco, otras células de músculo, células granulosa, células del cúmulo, células epidérmicas o células endoteliales. En otra realización, la célula donante nuclear es un embriocitoblasto. En una realización preferida, las células de fibroblastos pueden usarse como células donantes.

En otra realización de la divulgación, las células donantes nucleares de la divulgación son células germinativas de un animal. Puede usarse cualquier célula germinativa 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 germinativa embrionaria.

Las células donantes nucleares pueden detenerse en cualquier fase del ciclo celular (G0, G1, G2, S, M) de manera que se garantice la coordinación con la célula aceptora. Puede usarse cualquier método conocido en la técnica para manipular la fase del ciclo celular. Métodos para controlar la fase del ciclo celular incluyen, pero no se limitan a, quiescencia de G0 inducida por la inhibición del contacto de células cultivadas, quiescencia de G0 inducida por la eliminación de suero u otro nutriente esencial, quiescencia de G0 inducida por la senescencia, quiescencia de G0 inducida mediante la adición de un factor de crecimiento específico; quiescencia de G0 o G1 inducida por medios físicos o químicos tales como choque térmico, presión hiperbárica u otro tratamiento con una sustancia química, 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 citometría de flujo activada por fluorescencia, agitación mitótica, tratamiento con agentes de alteración de los

microtúbulos o cualquier sustancia química que altere la progresión en la mitosis (véase también Freshney, R. I., "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique", Alan R. Liss, Inc, New York (1983).

5 Los métodos para el aislamiento de ovocitos son muy conocidos en la técnica. Esencialmente, éstos pueden comprender aislar ovocitos de los ovarios o el conducto reproductor de un animal. Una fuente fácilmente disponible de ovocitos es materiales de matadero. Para la combinación de técnicas tales como ingeniería genética, transferencia nuclear y clonación, los ovocitos deben generalmente madurarse *in vitro* antes de que estas células puedan usarse como células receptoras para la transferencia nuclear, y antes de que puedan fecundarse por el espermatozoide para desarrollarse en un embrión. Este proceso requiere generalmente recoger ovocitos inmaduros (profase I) del ovario del mamífero, por ejemplo, ovario bovino obtenido en un matadero, y madurar los ovocitos en un medio de maduración antes de la fecundación o desnucleación hasta que el ovocito alcanza la etapa de metafase II, que en el caso de ovocitos bovinos generalmente se produce 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 cerda primeriza. Una "cerda primeriza" es un cerda hembra que nunca ha tenido descendencia. En otras realizaciones, el ovocito se obtiene de cerda. Una "cerda" es el cerdo hembra que ha producido previamente descendencia.

20 Un ovocito de la etapa de metafase II puede ser el ovocito receptor, se cree que en esta etapa el ovocito puede ser o está suficientemente "activado" para tratar el núcleo introducido como lo hace un semen fecundante. Se han usado satisfactoriamente ovocitos en la etapa de metafase II, que se han madurado *in vivo*, en técnicas de transferencia nuclear. Esencialmente, pueden recogerse quirúrgicamente ovocitos de la metafase II maduros de tanto animal no superovulado como superovulado 35 a 48, o 39-41, horas después de la aparición del celo o después de la inyección de gonadotropina coriónica humana (hCG) u hormona similar. El ovocito puede ponerse en un medio apropiado, tal como una disolución de hialuronidasa.

25 Después de un periodo de maduración de tiempo fijo, que oscila de aproximadamente 10 a 40 horas, aproximadamente 16-18 horas, aproximadamente 40-42 horas o aproximadamente 39-41 horas, los ovocitos pueden desnuclearse. Antes de la desnucleación, los ovocitos pueden sacarse y ponerse en un medio apropiado, tal como HECM que contiene 1 miligramo por mililitro de hialuronidasa antes de sacar las células del cúmulo. Los ovocitos desnudados pueden entonces cribarse para cuerpos polares, y los ovocitos de metafase II seleccionados, como se ha determinado por la presencia de cuerpos polares, se usan entonces para transferencia nuclear. Sigue la desnucleación.

35 La desnucleación puede realizarse por métodos conocidos, tal como se describen en la patente de EE.UU. nº 4.994.384. Por ejemplo, pueden ponerse ovocitos de metafase II en tanto HECM, que contiene opcionalmente 7,5 microgramos por mililitro de citocalasina B, para desnucleación inmediata, o pueden ponerse en un medio adecuado, por ejemplo, un medio de cultivo de embriones tal como CRIaa, más 10 % de suero de vaca en celo, y a continuación desnuclearse después, preferentemente no más de 24 horas después, y más preferentemente 16-18 horas después.

40 La desnucleación puede llevarse a cabo microquirúrgicamente usando una micropipeta para eliminar el cuerpo polar y el citoplasma adyacente. Los ovocitos pueden entonces cribarse para identificar aquellos que se han desnucleado satisfactoriamente. Una forma de cribar los ovocitos es teñir los ovocitos con 1 microgramo por mililitro de colorante 33342 Hoechst en HECM, y entonces visualizar los ovocitos bajo irradiación ultravioleta no menos de 10 segundos. Los ovocitos que se han desnucleado satisfactoriamente pueden entonces ponerse en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, CRIaa más 10 % de suero.

50 Una única célula de mamífero de la misma especie que el ovocito desnucleado puede entonces transferirse al espacio perivitelino del ovocito desnucleado usado para producir la unidad de NT. Pueden usarse la célula de mamífero y el ovocito desnucleado para producir unidades de NT según métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células pueden fusionarse por electrofusión. La electrofusión se lleva a cabo proporcionando un pulso de electricidad que es suficiente para producir una rotura transitoria de la membrana plasmática. Esta rotura de la membrana plasmática es muy corta debido a que la membrana se vuelve a formar rápidamente. Así, si dos membranas adyacentes son inducidas para romperse y tras volver a formarse se entremezclan las bicapas de lípido, pueden abrirse pequeños canales entre las dos células. Debido a la inestabilidad termodinámica de una abertura tan pequeña, se agranda hasta que las dos células se vuelven una. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4.997.384 por Prather y col. Pueden usarse una variedad de medios de electrofusión que incluyen, por ejemplo, sacarosa, manitol, sorbitol y disolución tamponada con tampón. También puede llevarse a cabo fusión usando virus de Sendai como agente fusogénico (Graham, Wister Inot. Symp. Monogr., 9, 19, 1969). Por tanto, el núcleo pueden inyectarse directamente en el ovocito en vez de usando fusión por electroporación. Véase, por ejemplo, Collas y Barnes, Mol. Reprod. Dev., 38:264-267 (1994). Después de la fusión, las unidades de NT fusionadas resultantes se ponen entonces en un medio adecuado hasta la activación, por ejemplo, medio CRIaa. Normalmente, la activación puede efectuarse poco después, por ejemplo menos de 24 horas después, o aproximadamente 4-9 horas después, o óptimamente 1-2 horas después de la fusión. En una realización preferida, la activación se produce al menos una hora después de la fusión y 40-41 horas después de la maduración.

La unidad de NT puede activarse por métodos conocidos. Tales métodos incluyen, por ejemplo, cultivar la unidad de NT a temperatura sub-fisiológica, en esencia aplicando un choque de temperatura frío, o en realidad fresco, a la unidad de NT. Esto puede hacerse lo más convenientemente cultivando la unidad de NT a temperatura ambiente, que es fría con respecto a las condiciones de temperatura fisiológica a las que los embriones se exponen normalmente. Alternativamente, la activación puede lograrse por aplicación de agentes de activación conocidos. Por ejemplo, se ha mostrado que la penetración de ovocitos por semen durante la fecundación activa la prefusión de ovocitos dando mayores números de embarazos viables y múltiples terneros genéticamente idénticos después de la transferencia nuclear. Por tanto, pueden usarse tratamientos tales como choque eléctrico y químico para activar embriones de NT después de la fusión. Véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.496.720 concedida a Susko-Parrish y col. La fusión y activación puede inducirse por la aplicación de un pulso de CA de 5 V durante 5 s seguido de dos pulsos de CC de 1,5 kV/cm durante 60 µs usando cada uno un pulso de CA ECM2001 Electrocell Manipulator (BTX Inc., San Diego, CA). Adicionalmente, la activación puede efectuarse aumentando simultáneamente o secuencialmente los niveles de cationes divalentes en el ovocito, y reduciendo la fosforilación de proteínas celulares en el ovocito. Esto puede efectuarse 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 de aumentar los niveles de cationes divalentes incluyen el uso de choque eléctrico, tratamiento con etanol y tratamiento con quelantes enjaulados. La fosforilación puede reducirse por métodos conocidos, por ejemplo, mediante la adición de inhibidores de cinasas, por ejemplo, inhibidores de serina-treonina cinasas, tales como 6-dimetil-aminopurina, estaurosporina, 2-aminopurina y esfingosina. Alternativamente, puede inhibirse la fosforilación de proteínas celulares por introducción de una fosfatasa en el ovocito, por ejemplo, fosfatasa 2A y fosfatasa 2B.

Las unidades de NT activadas, o "embriones fusionados", pueden entonces cultivarse en un medio de cultivo *in vitro* adecuado hasta la generación de colonias de células. Medios de cultivo adecuados para el cultivo y la maduración de embriones son muy conocidos en la técnica. Ejemplos de medios conocidos, que pueden usarse para el cultivo y mantenimiento de embriones, incluyen Ham's F-10 + 10 % de suero de ternero fetal (FCS), medio de cultivo de tejido-199 (TCM-199) + 10 % de suero de ternero fetal, Tyrodes-albúmina-lactato-piruvato (TALP), solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS), medios de Eagle y de Whitten, y, en un ejemplo específico, las unidades de NT activadas pueden cultivarse en medio NCSU-23 durante aproximadamente 1-4 h a aproximadamente 38,6 °C en una atmósfera humidificada de 5 % de CO₂.

Después, la unidad o unidades de NT cultivadas pueden lavarse y a continuación ponerse en un medio adecuado contenido en placas de pocillos que preferentemente contienen una capa alimentadora confluyente adecuada. Capas alimentadoras adecuadas incluyen, a modo de ejemplo, fibroblastos y células epiteliales. Las unidades de NT se cultivan sobre la capa alimentadora hasta que las unidades de NT alcanzan un tamaño adecuado para transferirlas a una hembra receptora, o para obtener células que pueden usarse para producir colonias de células. Preferentemente, estas unidades de NT pueden cultivarse hasta al menos aproximadamente 2 a 400 células, aproximadamente 4 a 128 células, o al menos aproximadamente 50 células.

Las unidades de NT activadas pueden entonces transferirse (transferencias de embriones) al oviducto de un cerdo hembra. En una realización, los cerdos hembra pueden ser una cerda primeriza receptora de celo sincronizado. Pueden usarse cerdas primerizas cruzadas (blancas grandes/Duroc/Landrace) (280-400 lbs). Las cerdas primerizas pueden sincronizarse como animales receptores para la administración por vía oral de 18-20 mg de Regu-Mate (Altrenogest, Hoechst, Warren, NJ) mezclado en el pienso. Regu-Mate puede administrarse durante 14 días consecutivos. Mil unidades de gonadotropina coriónica humana (hCG, Intervet America, Millsboro, DE) pueden entonces administrarse i.m. aproximadamente 105 h después del último tratamiento con Regu-Mate. Entonces pueden realizarse transferencias de embriones aproximadamente 22-26 h después de la inyección de hCG. En una realización, el embarazo puede llevarse a término y producir el parto de descendencia viva. En otra realización, el embarazo puede terminarse pronto y pueden recogerse células embrionarias.

50 *Cruce de animales inactivados homocigóticos deseados*

En el presente documento se divulga un método para producir animales viables que carecen de cualquier expresión de alfa-1,3-GT funcional criando un macho heterocigótico para el gen alfa-1,3-GT con una hembra heterocigótica para el gen alfa-1,3-GT. En una realización, los animales son heterocigóticos debido a la modificación genética de un alelo del gen alfa-1,3-GT para prevenir la expresión de ese alelo. En otra realización, los animales son heterocigóticos debido a la presencia de una mutación puntual en un alelo del gen alfa-1,3-GT. En otra realización, la mutación puntual puede ser una mutación puntual de T a G en la segunda base del exón 9 del gen alfa-1,3-GT. En una realización específica, se proporciona un método para producir un animal que carece de cualquier expresión de alfa-1,3-GT funcional, en el que un cerdo macho que contiene una mutación puntual de T a G en la segunda base del exón 9 del gen alfa-1,3-GT se cruza con un cerdo hembra que contiene una mutación puntual de T a G en la segunda base del exón 9 del gen alfa-1,3-GT.

En una realización, pueden cruzarse animales sexualmente maduros producidos de transferencia nuclear de células donantes que llevan una inactivación doble en el gen alfa-1,3-GT y probarse su descendencia para la inactivación homocigótica. Estos animales inactivados homocigóticos pueden entonces cruzarse para producir más animales.

En otra realización, ovocitos de un animal con inactivación doble sexualmente maduro pueden fecundarse *in vitro* usando semen no mutante de dos líneas de cerdos genéticamente diversas e implantarse los embriones en sustitutos adecuados. Las crías de estos apareamientos pueden probarse para la presencia de la inactivación, por ejemplo, pueden probarse por secuenciación de ADNc, PCR, sensibilidad a la toxina A y/o unión a lectina. Entonces, en la madurez sexual, pueden cruzarse animales de cada una de estas camadas.

En ciertos métodos según este aspecto de la divulgación, los embarazos pueden terminarse pronto de manera que los fibroblastos fetales pueden aislarse y caracterizarse adicionalmente fenotípicamente y/o genotípicamente. Los fibroblastos que carecen de expresión del gen alfa-1,3-GT pueden entonces usarse para transferencia nuclear según los métodos descritos en el presente documento (véase también Dai y col.) para producir múltiples embarazos y crías que llevan la doble inactivación deseada.

III. Tipos de animales genéticamente modificados / modificaciones genéticas adicionales

En un aspecto de la presente divulgación, se proporcionan animales en los que un alelo del gen alfa-1,3-GT se inactiva mediante un evento de elección de diana genética. En otro aspecto de la presente divulgación, se proporcionan animales porcinos en los que ambos alelos del gen alfa-1,3-GT se inactivan mediante un evento de elección de diana genética. En una realización, el gen puede ser elegido como diana mediante recombinación homóloga. En otras realizaciones, el gen puede alterarse, es decir, puede alterarse una porción del código genético, afectando así la transcripción y/o traducción de ese segmento del gen. Por ejemplo, puede producirse la alteración de un gen mediante técnicas de sustitución, delección ("inactivación") o inserción ("activación"). Pueden insertarse genes adicionales para una proteína deseada o secuencia reguladora que modula la transcripción de una secuencia existente.

Así, en otro aspecto de la presente invención, el gen alfa-1,3-GT puede inactivarse mediante al menos una mutación puntual. En una realización, un alelo del gen alfa-1,3-GT puede inactivarse mediante al menos una mutación puntual. En otra realización, ambos alelos del gen alfa-1,3-GT pueden inactivarse mediante al menos una mutación puntual. En una realización, esta mutación puntual puede producirse mediante un evento de elección de diana genética. En otra realización, esta mutación puntual puede producirse naturalmente. En una realización específica, la mutación puntual puede ser una mutación de T a G en la segunda base del exón 9 del gen alfa-1,3-GT (Figura 1). Cerdos que llevan una mutación puntual que se produce naturalmente en el gen alfa-1,3-GT permiten la producción de cerdos deficientes en alfa-1,3-GT libres de genes de resistencia a antibióticos y así tienen la posibilidad de hacer 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 inactivar el gen alfa-1,3-GT. En otras realizaciones, se proporcionan cerdos en los que ambos alelos del gen alfa-1,3-GT contienen mutaciones puntuales que previenen cualquier expresión de alfa-1,3-GT funcional. En una realización específica, se proporcionan cerdos que contienen la mutación de T a G en la segunda base del exón 9 en ambos alelos del gen alfa-1,3-GT (Figura 1).

Otro aspecto de la presente divulgación proporciona un animal, en el que ambos alelos del gen alfa-1,3-GT se inactivan, por lo que un alelo se inactiva por un evento de elección de diana genética y el otro alelo se inactiva mediante una mutación puntual que se produce naturalmente. En una realización, se proporciona un animal porcino, en el que ambos alelos del gen alfa-1,3-GT se inactivan, por lo que un alelo se inactiva por un evento de elección de diana genética y el otro alelo se inactiva debido a la presencia de una mutación puntual de 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 alfa-1,3-GT se inactivan, por lo que un alelo se inactiva mediante una construcción que elige diana dirigida al exón 9 (Figura 6) y el otro alelo se inactiva debido a la presencia de una mutación puntual de T a G en la segunda base del exón 9.

En otra realización, puede obtenerse tejido de animales que carecen de cualquier expresión funcional del gen alfa-1,3-GT que también pueden contener modificaciones genéticas adicionales. Tales modificaciones genéticas pueden incluir adiciones y/o delecciones de otros genes para prevenir rechazo, promover cicatrización y/o minimizar o eliminar patógenos no deseados (tales como priones o retrovirus).

PERV se refiere a una familia de retrovirus de la que se han identificado tres clases principales hasta la fecha: PERV-A (Nº de acceso de GenBank AF038601), PERV-B (Nº de acceso de EMBL PERY17013) y PERV-C (Nº de acceso de GenBank AF038600) (Patience y col., 1997, Akiyoshi y col., 1998). Los genes *gag* y *pol* de PERV-A, B y C son altamente homólogos, es el gen *env* que se diferencia entre los diferentes tipos de PERV (por ejemplo, PERV-A, PERV-B, PERV-C). PERV-D también se ha identificado recientemente (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.261.806).

En una de la presente invención, pueden regularse genes de retrovirus endógeno porcino (PERV) por la expresión de moléculas de ARN interferente (ARNi). Por ejemplo, pueden usarse al menos dos moléculas de ARNi de manera que la expresión del virus PERV se elimine funcionalmente o esté por debajo de los niveles de detección (véase, por ejemplo, USSN 60/523.938). En otra realización, otros virus, que incluyen, pero no se limitan a, virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) se inactivan o modulan por disminución tanto mediante recombinación

homóloga como usando un enfoque de ARN inhibidor (ARNinh). En el caso de regulación por disminución usando ARNinh, secuencias de genes que codifican ARN inhibidores pequeños se expresan como un transgén y se introducen en cerdos tanto mediante microinyección, ICSI, transferencia nuclear, o usando transferencia génica mediada por semen.

En otra realización, puede eliminarse o reducirse la expresión de genes adicionales responsables del rechazo del xenoinjerto. Tales genes incluyen, pero no se limitan a, el gen CMP-NEUAc hidroxilasa, el gen iso-globósido 3 sintasa y el gen Forssman sintasa. Además, también pueden expresarse genes o ADNc que codifica proteínas relacionadas con el complemento, que son responsables de la supresión de la lisis mediada por el complemento, en los animales y tejidos de la presente divulgación. Tales genes incluyen, pero no se limitan a, CD59, DAF, MCP y CD46 (véase, por ejemplo, el documento WO 99/53042; Chen y col., Xenotransplantation, Volumen 6 Issue 3 Page 194 - August 1999, que describe cerdos que expresan transgenes CD59/DAF; Costa C y col., Xenotransplantation. 2002 Jan;9(1):45-57, que describe cerdos transgénicos que expresan CD59 humano y H-transferasa; Zhao L y col.; Diamond LE y col., Transplantation. 2001 Jan 15;71(1):132-42, que describe cerdos transgénicos CD46 humanos.

Modificaciones adicionales pueden incluir la expresión del inhibidor de la ruta del factor de tejido (TFPI), heparina, antitrombina, hirudina, TFPI, péptido anticoagulante tick, o un factor de veneno de serpiente, tal como se describe en el documento WO 98/42850 y la patente de EE.UU. nº 6.423.316, titulada "Anticoagulant fusion protein anchored to cell membrane"; o compuestos, tales como anticuerpos, que regulan por disminución la expresión de una molécula de adhesión a células por las células, tal como se describe en el documento WO 00/31126 titulado "Suppression of xenograft rejection by down regulation of a cell adhesion molecules" y compuestos en los que se previene la co-estimulación por la señal 2, tal como por administración al receptor del órgano de una forma soluble de CTLA-4 del organismo donante xenógeno, por ejemplo, como se describe en el documento WO 99/57266 titulado "Immunosuppression by blocking T cell co-stimulation signal 2 (B7/CD28 interaction)".

Ciertos aspectos de la invención se describen en mayor detalle en los ejemplos no limitantes que siguen.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1:

Producción de células heterocigóticas porcinas para el gen alfa-1,3-GT

Aislamiento y transfección de fibroblastos fetales porcinos primarios. Se aislaron células de fibroblastos fetales (PCFF4-1 a PCFF4-10) de 10 fetos del mismo embarazo en el día 33 de gestación. Después de quitar la cabeza y las vísceras, los fetos se lavaron con disolución salina equilibrada con Hank (HBSS; Gibco-BRL, Rockville, MD), se dispusieron en 20 ml de HBSS y se cortaron en dados con tijeras quirúrgicas pequeñas. El tejido se sedimentó y se resuspendió en tubos de 50 ml con 40 ml de DMEM y 100 U/ml de colagenasa (Gibco-BRL) por feto. Los tubos se incubaron durante 40 min en un baño de agua con agitación a 37 °C. Se dejó sedimentar el tejido digerido durante 3-4 min y el sobrenadante enriquecido en células se transfirió a un nuevo tubo de 50 ml y se sedimentó. A continuación, las células se resuspendieron en 40 ml de DMEM que contenía 10 % de suero de ternero fetal (FCS), 1X aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio 1 mM y 2 ng/ml de bFGF, y se sembraron en placas de 10 cm. Todas las células se criopreservaron tras alcanzar la confluencia. Se aislaron células SLA-1 a SLA-10 de 10 fetos en el día 28 de embarazo. Los fetos se aplastaron a través de un tamiz de metal de 60 de malla usando pinzas quirúrgicas curvadas lentamente de manera que no se generara excesivo calor. A continuación, la suspensión de células se sedimentó y se resuspendió en 30 ml de DMEM que contenía 10 % de FCS, 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 criopreservaron. Para las transfecciones, se introdujeron 10 µg de ADN de 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 de vectores deficientes. Se construyeron dos vectores deficientes en 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 alfa-1,3-GT de 6,8 kb, que incluye la mayoría del intrón 8 y el exón 9, por PCR a partir de ADN purificado de células SLA1-10 y células PCFF4-2, respectivamente. El único sitio EcoRV en el extremo 5' del exón 9 se convirtió en un sitio Sall y se insertó un fragmento de IRES-neo-poli A de 1,8 kb en el sitio Sall. El IRES (sitio interno de entrada al ribosoma) funciona como un sitio inicial de la traducción para la proteína neo. Así, ambos vectores tienen un brazo de recombinación de 5' de 4,9 kb y un brazo de recombinación de 3' de 1,9 kb (Figura 6).

PCR de 3' y PCR de largo alcance. Se resuspendieron aproximadamente 1.000 células en 5 µl de tampón de lisis de embrión (ELB) (Tris 40 mM, pH 8,9, 0,9 % de Triton X-100, 0,9 % de NP40, 0,4 mg/ml de proteinasa K), se incubaron a 65 °C durante 15 min para lisar las células y se calentaron a 95 °C durante 10 min para inactivar la proteinasa K. Durante el análisis por PCR de 3', se amplificaron fragmentos usando el sistema de PCR Expand High Fidelity (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 LR-PCR, se amplificaron fragmentos 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 de aumento/ciclo a 68 °C, seguido de un ciclo final de 7 min a 68 °C. Las condiciones de PCR de 3' y LR-PCR para ADN purificado fueron las mismas que las células, excepto que se mezcló 1 µl de ADN purificado (30 µg/ml) con 4 µl de ELB.

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

Resultados. Se cribaron colonias resistentes a antibiótico (G418) por PCR de 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 de 3' (Figura 6). Por tanto, solo mediante elección de diana satisfactoria en el sitio α1,3GT se obtendría el producto de PCR de 2,4 kb esperado. A partir de un total de siete transfecciones en cuatro líneas celulares diferentes, se recogieron 1105 colonias resistentes a G418, de las que 100 (9 %) fueron positivas para la rotura del gen α1,3GT en el cribado de PCR de 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 resistente a G418, 657A-P6, fueron negativas. Una porción de cada colonia positiva por PCR de 3' se congeló inmediatamente, en varias alícuotas pequeñas, para el uso futuro en experimentos de NT, mientras que el resto de las células se expandieron para PCR de largo alcance (LR-PCR) y análisis de Southern.

Como el análisis por PCR para detectar empalmes por recombinación, o análisis de ARNm (RT-PCR), puede generar resultados positivos falsos, se realizó una PCR de largo alcance, que englobaría la región elegida como diana interna. La LR-PCR cubre la secuencia genómica de α1,3GT de 7,4 kb del exón 8 hasta el extremo del exón 9, con ambos cebadores (αGTE8S y αGTE9A2) localizados fuera de la región de recombinación (Figura 2). Las células PCFF4-6 de control, y la colonia negativa por PCR de 3', 657A-P6, mostró solo la banda de 7,4 kb endógena del sitio α1,3GT no mutante. A diferencia, tres de las colonias positivas por PCR de 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 elegida como diana del casete de IRES-neo de 1,8 kb en el sitio de α1,3 GT.

Aproximadamente la mitad (17/30) de las colonias positivas para LR-PCR se expandieron satisfactoriamente dando números suficientes de células (1 x 10⁶ células) para análisis de Southern. Se anticipó que las colonias serían heterocigóticas para la inactivación en el sitio α1,3 GT, y así deberían tener una copia de genes normal sin modificar y una copia alterada del gen α1,3 GT. Con digestión con BstEII, las células inactivadas en 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 las secuencias de IRES-neo en el sitio α1,3 GT (Figura 2). Las 17 colonias positivas por LR-PCR se confirmaron por análisis de Southern para la inactivación. Las mismas membranas se volvieron a sondear con secuencias específicas para neo y la banda de 9 kb se detectó con la sonda neo, confirmando así la inserción elegida como diana del casete IRES-neo en el sitio de α1,3GT alterado.

EJEMPLO 2:

Producción de células homocigóticas porcinas para el gen alfa-1,3-GT

Células de fibroblastos fetales deficientes en alfa-1,3-GT heterocigóticas, (657A-I11 1-6), donde

Se aislaron células de fibroblastos fetales deficientes en alfa-1,3-GT heterocigóticas, (657A-I11 1-6), de un embarazo del día-32 como se ha descrito anteriormente (véase también Dai y col., Nature Biotechnology 20:451 (2002)). Después de quitar la cabeza y las vísceras, algunos fetos se lavaron con disolución salina equilibrada con Hank (HBSS; Gibco-BRI, Rockville, MD), se dispusieron en 20 ml de HBSS y se cortaron en dados con tijeras quirúrgicas pequeñas. El tejido se sedimentó y se resuspendió en tubos de 50 ml con 40 ml de DMEM y 100 U/ml de colagenasa (Gibco-BRL) por feto. Los tubos se incubaron durante 40 min en un baño de agua con agitación a 37 °C. Se dejó sedimentar el tejido digerido durante 3-4 min y el sobrenadante enriquecido en células se transfirió a un nuevo tubo de 50 ml y se sedimentó. A continuación, las células se resuspendieron en 40 ml de DMEM que contenía 10 % de suero de ternero fetal (FCS), 1x aminoácidos no esenciales, piruvato de sodio 1 mM (Gibco-BRL) y 2 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF; Roche Molecular Biochemicals, Indianápolis, IN) y se sembraron en placas de 10 cm. Todas las células se criopreservaron tras alcanzar la confluencia. Después de quitar la cabeza y las vísceras, algunos fetos se lavaron con disolución salina equilibrada con Hank (HBSS; Gibco-BRI, Rockville, MD), se dispusieron en 20 ml de HBSS y se cortaron en dados con tijeras quirúrgicas pequeñas. Los fetos se aplastaron a través de un tamiz de metal de 60 de malla (Sigma, St. Louis, MO) usando pinzas quirúrgicas curvadas lentamente de manera que no se generara excesivo calor. A continuación, la suspensión de células se sedimentó y se resuspendió en 30 ml de DMEM que contenía 10 % de FCS, 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 criopreservaron. Para las transfecciones, se introdujeron 10 µg de ADN de 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 480 pocillos a una densidad de 2.000 células por pocillo y se seleccionaron con 250 µg/ml de G418 (Gibco-BRL). Se construyó un vector de inactivación de alfa-1,3-GT que elige como diana ATG (codón de partida) (pPL680), que también contuvo un gen neo, para inactivar el segundo alelo del gen alfa-1,3-GT. Estas células se transfectaron por electroporación con pPL680 y se seleccionaron para el fenotipo negativo para alfa1,3Gal con toxina A de *C. difficile* purificada (descrita más adelante).

10 **EJEMPLO 3:**

Selección con toxina A de *C. difficile* para células porcinas homocigóticas para el gen alfa-1,3-GT

Curva de citotoxicidad de la toxina A

Se expusieron células porcinas (PCFF4-6) durante 1 hora o durante la noche a diluciones sucesivas de diez veces 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 la noche a 37 °C. Los resultados de esta exposición se detallan en la Tabla 2. Claramente, una exposición de 1 hora a la toxina A a >1 µg/ml produjo un efecto citotóxico en >90 % de las células. Por tanto, se eligió una concentración de toxina A a o ligeramente por encima de 1 µg/ml para la selección de células genéticamente alteradas.

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

[Toxina A], µg/ml	1 hora incubación	Incubación durante la noche
0	Concluencia 100%	Concluencia 100%
.00001	Concluencia 100%	Concluencia 100%
.0001	Concluencia 100%	Concluencia 100%
.001	Concluencia 100%	Concluencia 100%
.01	Concluencia 100%	Concluencia 50%, acorralado 50%
.1	Concluencia 90%	Tanto como 10 µg/ml
1	Acorralado >90%	Tanto como 10 µg/ml
10	Todas la células acorraladas	Todas la células acorraladas, algunas levantadas

Se transfectaron células desagregadas de un embrión porcino (I-11:1-6) que contuvieron una inactivación elegida como diana previamente identificada en un alelo del gen gal alfa-1,3-GT (Dai y col.) con 10 µg de ADN de vector linealizado (trampa 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 sustituyó con 2 µg/ml de toxina A en medio de cultivo (DMEM-alta glucosa con 2,8 ng/ml de bFGF y 20 % de FCS). Las células se expusieron al efecto selectivo de la toxina A durante 2 horas a 37 °C. Se extrajo el medio que contenía la toxina A, junto con cualquier célula afectada que se había liberado de la superficie de la placa, se lavaron las células restantes con medio fresco y se sustituyó el medio sin toxina A. Diez días después, las células se expusieron de nuevo a la toxina A a 1,3 µg/ml en medio durante 2 horas a 37 °C. Se eliminaron los medios, la toxina A, y cualquier célula en disolución, se lavaron las células restantes y se sustituyó el medio.

Dieciséis días después de la transfección, se recogió una única colonia que presentó insensibilidad a la toxina A, designada 680B1, y se envió una porción para análisis de ADN y tinción con lectina. En análisis de ADN indicó que la insensibilidad a la toxina A no fue debida a la integración del segundo vector diana; sin embargo, las células no se tiñeron con lectina GSL IB-4, que indica que se había producido una inactivación funcional del sitio. Se usaron células doblemente inactivadas 680B1 para la transferencia nuclear en 5 receptores y resultaron tres embarazos. Dos de estos embarazos abortaron espontáneamente en el primer mes; los cuatro fetos del embarazo restante se recogieron en el día 39 de embarazo y las células se desagregaron y se sembraron en cultivo de tejido. Estas células fetales (680B1-1, 680B1-2, 680B1-3, 680B1-4) se expusieron a la toxina A a 1 µg/ml durante 1 hora a 37 °C, seguido de eliminación del medio, lavado de las células y sustitución del medio sin toxina A. Los fetos 1, 2 y 4 no se afectaron por la toxina A, mientras que la mayoría de las células del feto 3 se redondearon, que indica que este embrión fue sensible a los efectos citotóxicos de la toxina A.

Los fetos 1, 2 y 4 no se unieron a la lectina GS IB4, como se indica por análisis de FACS (véase la Tabla 3), mientras que el feto 3 se unió a lectina. Esto sugiere que los fetos 1, 2 y 4 no llevan 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 con lectina GS-IB4 (%)		
Células		No tinción	50 µg/ml IB4 lectina	100 µg/ml IB4 lectina
5	Células HeLa (CTL Negativo)	1%	2%	2.8%
	Células PCFF4-6 (CTL Positivo)	0.2%	76%	91%
	Células PCFF4 (CTL Positivo)	1.5%	82%	94%
10	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%

15 Se ejecutó un ensayo de fijación del complemento sobre células de los cuatro fetos. El ensayo de lisis del complemento se desarrolló como un bioensayo de la ausencia de expresión de alfa gal. El suero humano contiene altos niveles de anticuerpo previamente formado contra alfa gal, además de la cartera completa de las proteínas reguladoras del complemento (la ruta de C3). La presencia de alfa gal sobre la superficie de una célula, tras la unión de anticuerpo anti-alfa gal, activa la cascada del complemento, y produce la lisis de células mediada por el complemento. Las células negativas para alfa-gal serían resistentes a la lisis mediada por el complemento. En tres pruebas separadas, B1 y las células de cerdo de control se expusieron a suero humano más complemento, y se realizaron ensayos para evaluar la sensibilidad o resistencia a la lisis de células mediada por el complemento iniciada por alfa-gal. El ensayo se realizó con células B1-1, B1-2 y B1-4, además de células GT KO heterocigóticas (B1-3, positiva para gal) y con células de cerdo PCFF4-6 alfa-gal (+) no mutantes como control. Se expusieron células a uno de los tres tratamientos; dos controles negativos, albúmina de suero bovino (BSA) y suero humano inactivado por calor (HIA-HS) no contienen ninguna proteína del complemento funcional y así no se esperaba que produjeran ninguna lisis de células significativa; el tercer tratamiento, suero humano inactivado no por calor (NHS) contiene complemento humano funcional, además de anticuerpos específicos anti-gal, y así se esperaba que lisaran las células que tienen galactosa-alfa-1,3-galactosa sobre su superficie celular.

20 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 positivas para α 1,3Gal, son todavía tan sensibles al plasma humano como las células PCFF4-6 no mutantes.

25 Los resultados de la secuenciación de ADNc de todos los fetos indicaron que los fetos 1, 2 y 4 contienen una mutación puntual en el segundo alelo de alfa-1,3-GT, un cambio que daría una enzima disfuncional (véase la Figura 2). Esta mutación se produjo en el pb 424 de la región codificante, específicamente, el segundo par de bases del exón 9, del gen alfa-1,3-GT (GGTA1) (Nº de acceso de GenBank L36152) como una conversión de una timina en un residuo de guanina, que produce una sustitución de aminoácidos de tirosina en el aa 142 a un ácido aspártico.

30 Esto es una conversión significativa, ya que la tirosina, un aminoácido hidrófilo, es un componente crítico del sitio de unión a UDP de alfa-1,3-GT (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 participa en la unión a UDP-Gal (Gastinel y col., EMBO Journal 20(4): 638-649, 2001). Por tanto, se esperaba que un cambio de tirosina (un aminoácido hidrófobo) a ácido aspártico (un aminoácido hidrófilo) produjera la alteración de la función de α GT (como se observa).

35 Para confirmar que el ADNc mutado no hará funcional la proteína α GT, los ADNc del segundo alelo de las 4 células se clonaron en un vector de expresión y este vector de expresión GT se transfectó en células de fibroblastos humanas (células HeLa), además de en células de mono Rhesus primarias. Como los seres humanos y los monos del viejo mundo carecen de un gen alfa-1,3-GT funcional, las células HeLa no tendrían una alfa-1,3-galactosa sobre su superficie celular (como se ha ensayado por experimentos de unión a lectina). Los resultados mostraron que las células HeLa y de mono, cuando se transfectaron con ADNc obtenido de células B1-1, B1-2 y B1-4, fueron todavía negativas para α 1,3Gal por tinción con IB4-lectina, mientras que las células HeLa y de mono Rhesus transfectadas con ADNc de B1-3, hicieron un transcrito de alfa-1,3-GT funcional y posteriormente fueron positivas para α 1,3Gal. Claramente, las células con la mutación de aspartato (en lugar de tirosina) no pueden hacer funcional la alfa-1,3-galactosiltransferasa

EJEMPLO 4:

40 Generación de cerdos clonados usando fibroblastos fetales deficientes en alfa-1,3-GT homocigóticos como donantes nucleares

Preparación de células para transferencia nuclear.

45

Se manipularon genéticamente células donantes para producir células homocigóticas para deficiencia de alfa-1,3-GT como se ha descrito generalmente anteriormente. Se realizó transferencia nuclear por métodos que son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Dai y col., *Nature Biotechnology* 20: 251-255, 2002; y Polejaeva y col., *Nature* 407:86-90, 2000).

Se recogieron ovocitos 46-54 h después de la inyección de hCG por lavado inverso de los oviductos usando solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS) previamente calentada que contenía albúmina de suero bovino (BSA; 4 gl^{-1}) (como se describe en Polejaeva, I.A. y col., (*Nature* 407, 86-90 (2000)). La desnucleación de ovocitos madurados *in vitro* (BioMed, Madison, WI) empezó entre 40 y 42 horas después de la maduración como se describe en Polejaeva, I.A. y col. (*Nature* 407, 86-90 (2000)). Los ovocitos recuperados se lavaron en PBS que contenía 4 gl^{-1} de BSA a 38 °C, y se transfirieron a medio NCSU-23 tamponado con fosfato libre de calcio a 38 °C para el transporte al laboratorio. Para la desnucleación, los presentes inventores incubaron los ovocitos en medio NCSU-23 tamponado con fosfato libre de calcio que contenía 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de citocalasina B (Sigma) y 7,5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de Hoechst 33342 (Sigma) a 38 °C durante 20 min. Entonces se aspiró una pequeña cantidad de citoplasma de directamente debajo del primer cuerpo polar usando una pipeta de vidrio de 18 μM (Humagen, Charlottesville, Virginia). Los presentes inventores expusieron el carioplasto aspirado a luz ultravioleta para confirmar la presencia de una placa de metafase.

Para la transferencia nuclear, se dispuso una única célula de fibroblasto bajo la zona pelúcida en contacto con cada ovocito desnucleado. Se indujeron la fusión y activación por aplicación de un pulso de CA de 5 V durante 5 s seguido de dos pulsos de CC de 1,5 kV/cm durante 60 μs usando cada uno un ECM2001 Electrocult Manipulator (BTX Inc., San Diego, CA). Los embriones fusionados se cultivaron en medio NCSU-23 durante 1-4 h a 38,6 °C en una atmósfera humidificada de 5 % de CO_2 , y a continuación se transfirieron al oviducto de una cerda primeriza de celo sincronizado. Las cerdas primerizas cruzadas (blancas grandes/Duroc/landrace) (280-400 lbs) se sincronizaron como receptores por administración por vía oral de 18-20 mg de Regu-Mate (Altrenogest, Hoechst, Warren, NJ) mezclado en su pienso. Regu-Mate se alimentó durante 14 días consecutivos. Se administró gonadotropina coriónica humana (hCG, 1.000 unidades; Intervet America, Millsboro, DE) intra-muscularmente 105 h después del último tratamiento con Regu-Mate. Se hicieron transferencias de embriones 22-26 h después de la inyección de hCG.

A continuación se usó toxina A para seleccionar los fibroblastos porcinos como donantes nucleares que se produjeron como se ha descrito en detalle en el presente documento anteriormente.

Transferencias de embriones y partos vivos resultantes

En el intento inicial por producir cerdos alfa-1,3-GT dKO vivos por transferencia nuclear, se realizaron un total de 16 transferencias de embriones con células donantes genéticamente manipuladas. Se establecieron nueve embarazos iniciales, pero solo dos pasaron del día 75 de gestación. Nacieron cinco lechones el 25 de julio de 2002. Un lechón murió inmediatamente después del parto y otros cuatro nacieron vivos y parecieron normales (Figura 4).

EJEMPLO 5:

Análisis de cerdos deficientes en alfa-1,3-GT homocigóticos

Se obtuvieron células de fibroblastos de la cola y secciones de tejido umbilical de 5 lechones con inactivación doble y se tiñeron usando la lectina GS-IB4 como se ha descrito previamente. No se observó tinción, que indica una ausencia completa del epítipo galactosa-alfa-1,3-galactosa sobre la superficie de tejidos de estos animales (datos no mostrados). Células endoteliales de la aorta y fibroblastos de músculo y de la cola aislados del lechón muerto (761-1) fueron negativas con tinción con lectina GS-IB4. El análisis de FACS de fibroblastos de músculo del lechón 761-1 también mostró un resultado negativo para la unión a GS-IB4. Secciones de tejido de hígado, riñón, bazo, piel, intestino, músculo, cerebro, corazón, páncreas, pulmón, aorta, lengua, cordón umbilical y cola obtenidos del lechón 761-1 fueron todas negativas con tinción con GS-IB4, que indica una ausencia completa de epítipes alfa-1,3-Gal de la superficie celular detectables (Phelps y col., *Science* 299: 411-414, 2003 que incluye la Figura S3).

Los presentes inventores realizaron una prueba de inmunogenicidad *in vivo* con ratones deficientes en alfa-1,3-GT. Los presentes inventores inyectaron agrupaciones de células similares a islotes (ICC) aisladas del páncreas del lechón 761-1 intraperitonealmente en ratones deficientes en alfa-1,3-GT. Los presentes inventores usaron ICC de un lechón no mutante neonatal como control. Como se muestra en la Fig. 5, no se observó aumento en el título de inmunoglobulina M (IgM) para alfa-1,3-Gal en ratones deficientes en alfa-1,3-GT después de la inyección con ICC del lechón alfa-1,3-GT DKO, a diferencia de aumentos significativos del título de IgM observados en aquellos ratones inyectados con ICC de lechón no mutante (Phelps y col., *Science* 299: 411-414, 2003 que incluye la Figura S4). Este resultado demuestra claramente que las células de lechón DKO no hacen ningún epítipo alfa-1,3-Gal.

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

Desde la 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 de fibroblastos de la cola de un miembro de la camada 761 como donante nuclear. Estos nacimientos se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4: Resumen de nacimientos doblemente deficientes en alfa-GT producidos por transferencia nuclear

Línea celular	No. de camadas	No. de cerditos vivos producidos
A	8	14
B	2	2
C	1	1
Total		17

*PM = Nocaut alelo GT mediante mutación puntual; Neo nocaut = alelo GT través homóloga la recombinación y la inserción de Neo gen marcador seleccionable. Todos los cerdos se presentan en este mesa son nocauts GT homocigóticos.

EJEMPLO 6:

Cría de cerdos macho y hembra con una única inactivación (SKO) en alfa-1,3-GT heterocigóticos para establecer una miniplara de cerdos doblemente inactivados (DKO)

La transferencia Southern confirmó que se han generado hembras GT-SKO clonadas y cerdos clonados macho. Se han criado heterocigóticos macho y hembra (cerdos de una única inactivación en el gen alfa-1,3-GT) por cría natural y por inseminación artificial (IA), con el fin de generar una plara de cerdos DKO para su uso en estudios preclínicos y ensayos clínicos humanos.

Ejemplo 7: Descelularización de tejido dérmico de animales doblemente inactivados

El tejido biológico que va a procesarse se consigue o recoge primero de un animal donante en el que se ha inactivado alfa-1,3-GT funcional, por ejemplo, en cerdos, como se ha descrito anteriormente. Se escinde tejido dérmico del animal donante usando un dermatomo u otro dispositivo conocido para un experto en la materia. El tejido se dispone en una disolución de transporte estabilizante que detiene y previene la degradación osmótica, hipóxica, autolítica y proteolítica, protege contra la contaminación bacteriana y reduce el daño mecánico que puede producirse. La disolución estabilizante generalmente contiene un tampón apropiado, uno o más antioxidantes, uno o más agentes oncóticos, un antibiótico, uno o más inhibidores de la proteasa, como se describen en el presente documento o conocidos para un experto en la materia.

Entonces, el tejido se incuba en una disolución de procesamiento para eliminar las células antigénicas viables (incluyendo células epiteliales, células endoteliales, células de músculo liso y fibroblastos) de la matriz estructural sin dañar el complejo de la membrana basal o la integridad estructural de la matriz de colágeno. La disolución de procesamiento generalmente contiene un tampón apropiado, sal, un antibiótico, uno o más detergentes, uno o más inhibidores de la proteasa y/o una o más enzimas como se describen en el presente documento o conocidas para un experto en la materia. El tratamiento del tejido con esta disolución de procesamiento se hace a una concentración durante un periodo de tiempo de forma que se evite la degradación del complejo de la membrana basal y se mantenga la integridad estructural de la matriz que incluye fibras de colágeno y elastina para producir tejido descelularizado.

Después de descelularizarse el tejido, se incuba en una disolución de criopreservación. Esta disolución contiene generalmente uno o más crioprotectores para minimizar el daño del cristal de hielo a la matriz estructural que podría producirse durante la congelación, y uno o más componentes protectores del secado, para minimizar la alteración del daño estructural durante el secado y puede incluir una combinación de un disolvente orgánico y agua que no experimenta ni expansión ni contracción durante la congelación. Tras la incubación en esta disolución de criopreservación, el tejido se envasa dentro de un recipiente estéril. Como método adicional o alternativo, la matriz de tejido descelularizado se fija con un agente de reticulación tal como glutaraldehído y se guarda antes del trasplante.

Ejemplo 8: Recogida de ligamento para xenoinjertos de animales con genes doblemente inactivados

El tejido biológico que va a procesarse se consigue o recoge primero de un animal donante en el que se ha inactivado alfa-1,3-GT funcional, como se ha descrito en el presente documento. Se escinde tejido de ligamento del animal donante usando una técnica quirúrgica apropiada. En la primera etapa, se elimina un ligamento intacto de la rodilla de un animal no humano. La articulación que sirve de fuente del ligamento se recoge de animales recién

sacrificados y se dispone inmediatamente en una disolución isotónica estéril adecuada u otra disolución de preservación de tejido. La recogida de las articulaciones se produce tan pronto como sea posible después del sacrificio del animal y se realiza en frío, es decir, en el intervalo aproximado de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 20 °C, para minimizar la degradación enzimática del tejido del ligamento. Se recoge el ligamento solo o se recoge el ligamento con un bloque de hueso unido a uno o ambos extremos. Se deja unido al ligamento un bloque de hueso que representa un tapón cilíndrico de aproximadamente 9-10 mm de diámetro por 20-40 mm de longitud. Se identifica cuidadosamente el ligamento y se disecciona libre de tejido adherente. Entonces, el xenoinjerto se lava en aproximadamente diez volúmenes de agua fría estéril para eliminar las proteínas de la sangre residuales y materiales solubles en agua. A continuación, el xenoinjerto se sumerge en alcohol a temperatura ambiente durante aproximadamente cinco minutos, para esterilizar el tejido y para eliminar materiales no colagenosos.

Después de la inmersión en alcohol, el xenoinjerto se implanta en una rodilla. Alternativamente, el xenoinjerto se somete a al menos uno de los siguientes tratamientos: tratamiento con radiación, tratamiento con alcohol u ozonación, uno o más ciclos de congelación y descongelación, y/o tratamiento con un agente de reticulación químico. En el tratamiento con ciclos de congelación/descongelación, el xenoinjerto se descongela por inmersión en un baño de solución salina isotónica a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) durante aproximadamente diez minutos. No se usa calor externo o fuente de radiación, con el fin de minimizar la degradación de la fibra.

Además, o alternativamente, el xenoinjerto se somete a un tratamiento de rotura celular para destruir las células del ligamento antes de la digestión *in vitro* del xenoinjerto con glucosidasas. Después de eliminarse los restos de hidrato de carbono superficiales de las células nucleadas y componentes extracelulares, las células nucleadas, es decir, las células vivas re-expresan los restos de hidrato de carbono superficiales.

Además, o alternativamente, tanto antes como después de destruir las células del ligamento, el xenoinjerto se somete a digestión *in vitro* del xenoinjerto con glucosidasas, eliminan enzimáticamente los restos de hidrato de carbono superficiales antigénicos. También pueden usarse otras enzimas, con el fin de eliminar cualquier resto de hidratos de carbono no alfa gal residual.

Antes de la implantación, el xenoinjerto de ligamento de la invención se trata con digestión limitada por enzimas proteolíticas tales como ficina o tripsina para aumentar la flexibilidad del tejido o se recubre con agentes anticalcificación, recubrimientos antitrombóticos, antibióticos, factores de crecimiento, u otros fármacos conocidos en la técnica para potenciar la incorporación del xenoinjerto en la articulación de la rodilla del receptor. Adicionalmente o alternativamente, el xenoinjerto del ligamento se esteriliza adicionalmente usando métodos conocidos, por ejemplo, con tratamiento con glutaraldehído o formaldehído adicional, esterilización con óxido de etileno, esterilización con óxido de propileno, o similares. El xenoinjerto se almacena congelado hasta que se requiera para su uso.

El xenoinjerto de ligamento, o un segmento del mismo, se implanta en una articulación de la rodilla humana dañada por aquellos expertos en la materia usando técnicas quirúrgicas artroscópicas conocidas. Los instrumentos específicos para realizar técnicas artroscópicas son conocidos para aquellos expertos en la materia, que garantizan la colocación precisa y reproducible de implantes de ligamento. Inicialmente, se lleva a cabo una artroscopia de diagnóstico completo de la articulación de la rodilla usando métodos conocidos. El ligamento irreparablemente dañado se elimina con una rasuradora quirúrgica. Se identifican los sitios de inserción anatómica para el ligamento y se taladran para acomodar un tapón de hueso. El tamaño del tapón de hueso es aproximadamente 9-10 mm de anchura por aproximadamente 9-10 mm de profundidad por 20-40 mm de longitud. El ligamento xenogénico se lleva a través de los orificios de perforación y se fija con tornillos de interferencia. Se realiza cierre rutinario.

Ejemplo 9: Injertos de tejido derivados de submucosa del intestino delgado (SIS) de cerdos deficientes en el gen alfa-1,3-Gal homocigóticos

El material de injerto de tejido se deriva de un animal, tal como un cerdo, que carece de cualquier expresión funcional de alfa-1,3-GT, y contiene tejido de submucosa y tejido de mucosa basilar deslaminado de un segmento del intestino delgado, tal como el yeyuno, una división del intestino delgado que se extiende entre el duodeno y el ileon.

Se prepara un injerto de SIS obtenido del intestino delgado de cerdos deficientes en alfa-1,3-gal reseccionando primero un segmento de yeyuno proximal autógeno siguiendo una incisión por lapatotomía de la línea media. El segmento reseccionado de yeyuno se envuelve entonces en esponjas quirúrgicas que se han empapado en solución salina fisiológica. Tras completarse la anastomosis intestinal, el segmento intestinal escindido se prepara erosionando tejido intestinal para eliminar las capas externas que incluyen tanto la túnica serosa y la túnica muscular como las capas internas que incluyen al menos la porción luminal de la túnica mucosa. En condiciones de abrasión suave, la túnica mucosa se deslaminada entre el estrato compacto y la lámina propia. Más particularmente, tras la eliminación de cualquier tejido mesentérico del segmento intestinal utilizando, por ejemplo, usando pinzas de Adson-Brown y tijeras de Metzenbaum, la túnica serosa y la túnica muscular (las capas de tejido externas) se deslaminan del segmento intestinal por abrasión usando un movimiento de pasada longitudinal con un mango del escalpelo y

gasa humedecida. Tras la eversión del segmento intestinal, la porción luminal de la túnica mucosa se deslaminada del tejido subyacente usando el mismo movimiento de pasada. Se presta atención para prevenir la perforación de la submucosa. Por tanto, se elimina cualquier "marca" de tejido de las capas deslaminadas que quede sobre la superficie del injerto. Opcionalmente, el segmento intestinal puede evertirse primero, a continuación raspase de las capas lumbinales, a continuación reinsertarse en su orientación original para la eliminación de la túnica serosa y la túnica muscular. El material de injerto es un tubo traslúcido blanquecino de tejido de aproximadamente 0,1 mm de espesor, que normalmente consiste en la túnica submucosa con la lámina muscular mucosa unida y el estrato compacto. Para la preparación del injerto vascular, el injerto preparado se everta a su orientación original de manera que el estrato compacto sirva de superficie luminal del injerto.

El material de injerto preparado normalmente se aclara con solución salina y se dispone en un disolución al 10 % de sulfato de neomicina durante aproximadamente 20 minutos, tiempo después del cual el material de injerto está listo para su uso. Los injertos se aplican usando procedimientos quirúrgicos rutinarios comúnmente empleados para aplicaciones en injerto de tejido. Para su uso en aplicaciones de injerto de tejido no vascular, el material de injerto tubular se corta longitudinalmente y se estira para formar un "parche" de tejido. El procedimiento de deslaminación de tejido entero descrito anteriormente puede llevarse a cabo sobre "parches" de tejido intestinal preparados cortando el segmento intestinal longitudinalmente y "desenrollando" para formar un parche pre-injerto. Los parches de tejido de injerto preparados pueden utilizarse, por ejemplo, como material de injerto de piel, para la reparación de duramadre, o para la reparación de otros defectos de tejido del cuerpo que se prestan a aplicación quirúrgica de un parche de injerto de tejido que tiene las características físicas y funcionales de la composición de injerto presente. Otra aplicación para el material de parches de Gal KO SIS incluye para la reparación del manguito de los rotadores, hernia, reparación de la pared abdominal, cabestrillos para tratar incontinencia urinaria, quemaduras, sustitución de piel, cirugía cosmética que incluye reconstrucción de mama, defectos faciales, reconstrucción de labios, injertos separadores del párpado, reparación de cicatrices hundidas, injertos de mucosa, pliegues nasolabiales, remodelación oral, parotidectomía, reparación de la perforación septal, rinoplastia, apósito temporal para heridas, cobertura de heridas, timpanoplastia, vestibuloplastia y otros defectos del tejido blando.

Para su uso en injertos vasculares, el diámetro del injerto es aproximadamente el mismo que el diámetro del vaso sanguíneo receptor. Esto se lleva a cabo manipulando el injerto de tejido para definir un cilindro que tiene un diámetro aproximadamente igual que el del vaso sanguíneo receptor y suturando o asegurando de otro modo el injerto de tejido longitudinalmente para formar dicho injerto vascular. Así, por ejemplo, se prepara un injerto vascular seleccionando una varilla de vidrio estéril que tiene un diámetro externo igual al del vaso sanguíneo receptor e introduciendo la varilla de vidrio en la luz del injerto. Entonces se recoge tejido redundante y se consigue el diámetro de la luz deseado suturando a lo largo de la longitud del injerto (por ejemplo, usando dos líneas de sutura continuas o una simple línea de sutura interrumpida) o usando otras técnicas de aseguramiento de tejido reconocidas en la técnica (véase también la patente de EE.UU. nº 4.956.178).

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Una prótesis que comprende un producto de tejido derivado de un animal porcino que carece de cualquier expresión de alfa-1,3-galactosiltransferasa en donde el producto de tejido es un andamiaje.
- 2.** La prótesis de la reivindicación 1, en la que el andamiaje es una matriz porosa que promueve el crecimiento interno de las células, y en la que la prótesis es para su uso en la reconstrucción, reparación y/o reemplazo de tejido.
- 10 **3.** La prótesis de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el tejido es
- (i) un tejido duro;
 - (ii) un tejido blando; o
 - (iii) una combinación de tejido duro y blando.
- 15 **4.** La prótesis de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el tejido es tejido dérmico, hueso, ligamentos, tendones, válvulas cardíacas, núcleo pulposo, cartílago, menisco, vasos sanguíneos o pericardio.
- 5.** La prótesis de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el tejido se selecciona de tejidos de la piel, urinario, vejiga y submucosa de órganos.
- 20 **6.** La prótesis de la reivindicación 5, en la que el tejido comprende piel.
- 7.** La prótesis de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el tejido se selecciona de menisco lateral extraído de una articulación de rodilla, cartílago articular extraído de cualquier articulación, ligamentos y tendones como el tendón de Aquiles.
- 25 **8.** La prótesis de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, para su uso en la reparación de hernia, pared abdominal o manguito de los rotadores.
- 30 **9.** La prótesis de la reivindicación 1, para su uso en la implantación en una región entre y/o que conecta dos de los huesos de un sujeto.
- 10.** La prótesis de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para su uso en la reconstrucción o reparación ortopédica humana.
- 35 **11.** La prótesis de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el tejido es para su uso en la reparación de piel humana.
- 12.** La prótesis de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el producto de tejido se somete a tratamiento o modificación adicional.
- 40 **13.** La prótesis de la reivindicación 12, en la que las modificaciones son modificaciones genéticas, en la que opcionalmente las modificaciones genéticas pueden incluir adiciones y/o deleciones de genes para evitar el rechazo, promover la curación de heridas, y/o minimizar o eliminar patógenos no deseados, en la que además opcionalmente la modificación genética es la inactivación del gen CMP-NEUAc hidroxilasa, el gen isoGlobósido 3 sintasa, el gen Forssman sintasa.
- 45 **14.** La prótesis de la reivindicación 13, en la que:
- a) el tratamiento o modificación promueve la curación de heridas, minimiza o elimina patógenos no deseados, añade factores de crecimiento para promover la remodelación tisular, esteriliza el tejido, y/o mejora las propiedades biomecánicas o físicas del tejido; o
 - b) el tratamiento es químico, mecánico o físico.
- 50 **15.** La prótesis de cualquier reivindicación anterior, en la que el animal porcino se puede producir cruzando un heterocigótico macho para el gen de alfa-1,3 galactosiltransferasa con un heterocigótico hembra para el gen de alfa-1,3 galactosiltransferasa en la que opcionalmente el animal porcino se puede producir cruzando juntos los cerdos que carecen de cualquier expresión de alfa-1,3 galactosiltransferasa funcional.
- 55 **16.** La prótesis de cualquier reivindicación anterior, en la que el andamiaje se puede producir por tratamiento mecánico, químico o enzimático de tejido de cerdos knockout alfa 1,3 gal, de tal manera que se eliminan todas las células y desechos dejando atrás el ECM en un patrón de fibras bien adecuado para el reclutamiento de células huésped y la regeneración de tejidos.
- 60 **17.** La prótesis de cualquier reivindicación anterior, en donde la prótesis tiene un contorno de superficie exterior in
- 65

vivo que es sustancialmente el mismo que una región corporal natural.

FIGURA 1

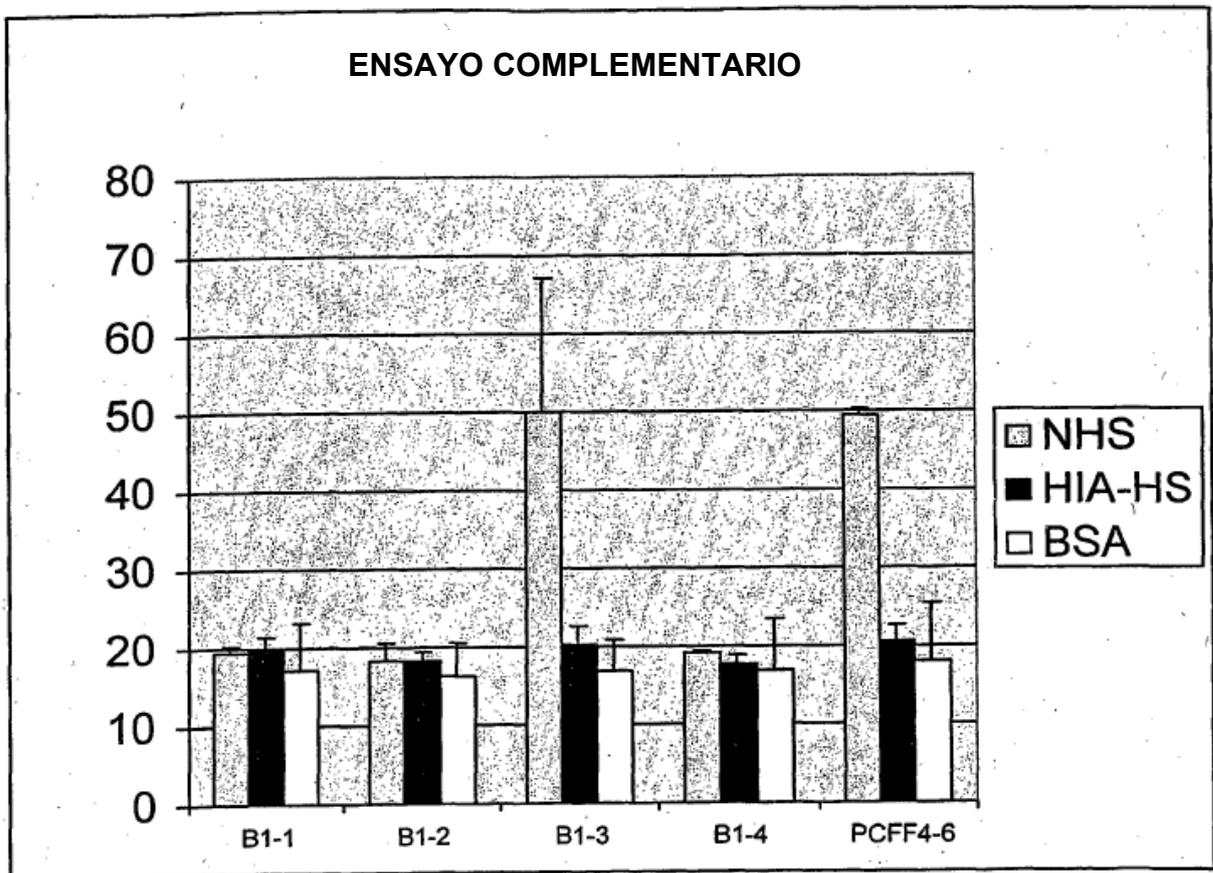


FIGURA 2

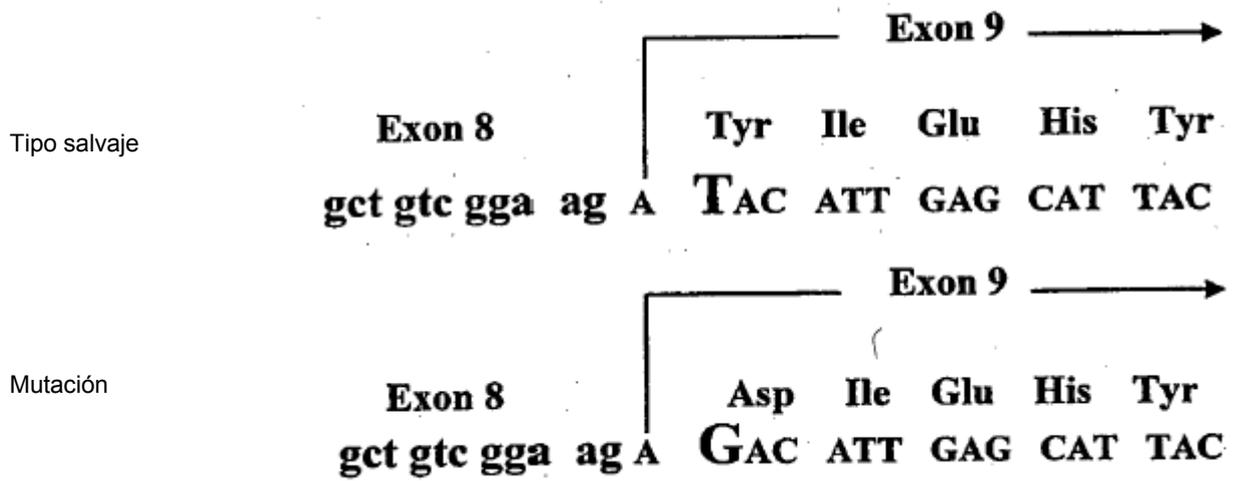


FIGURA 3

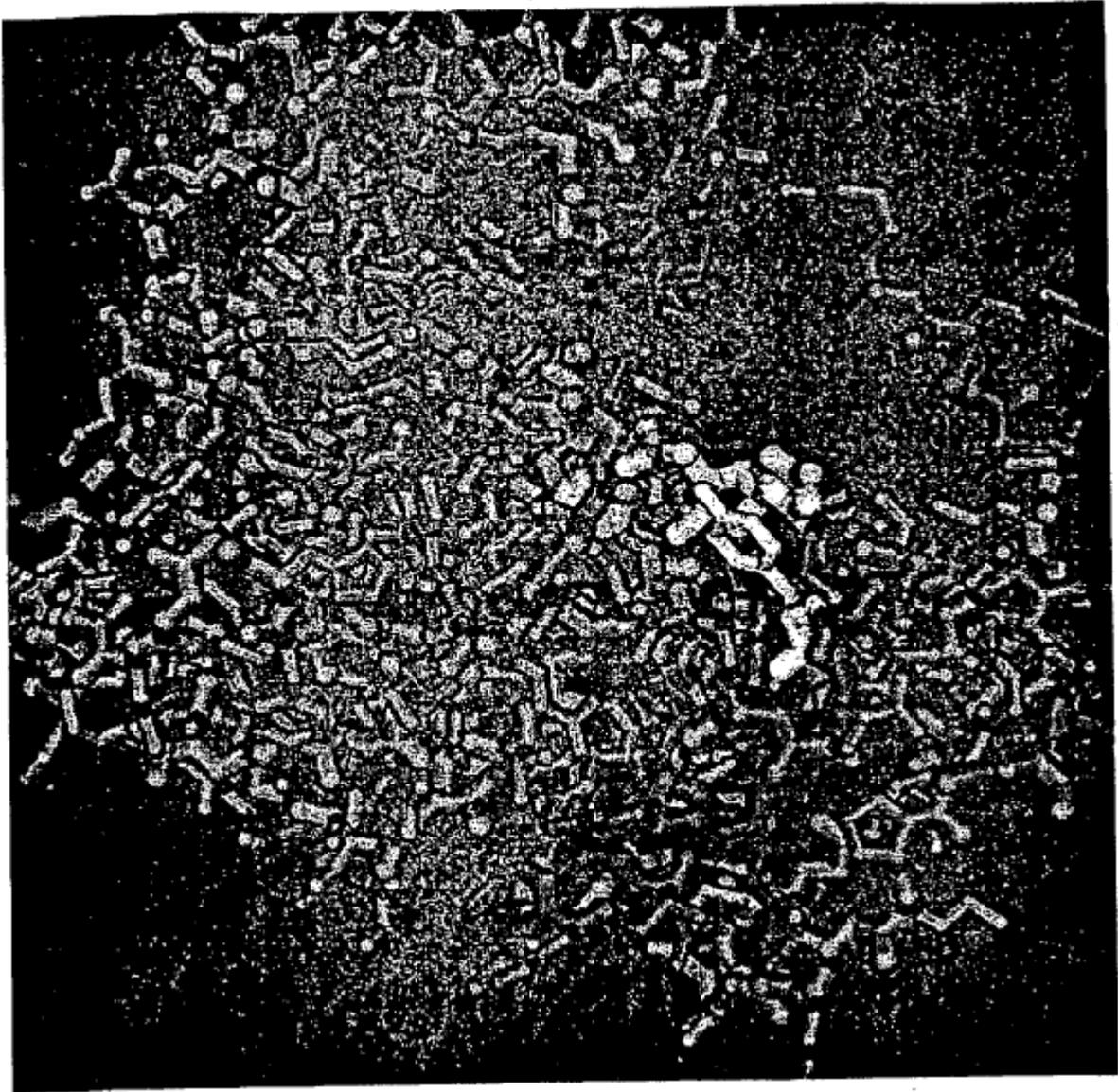


FIGURA 4

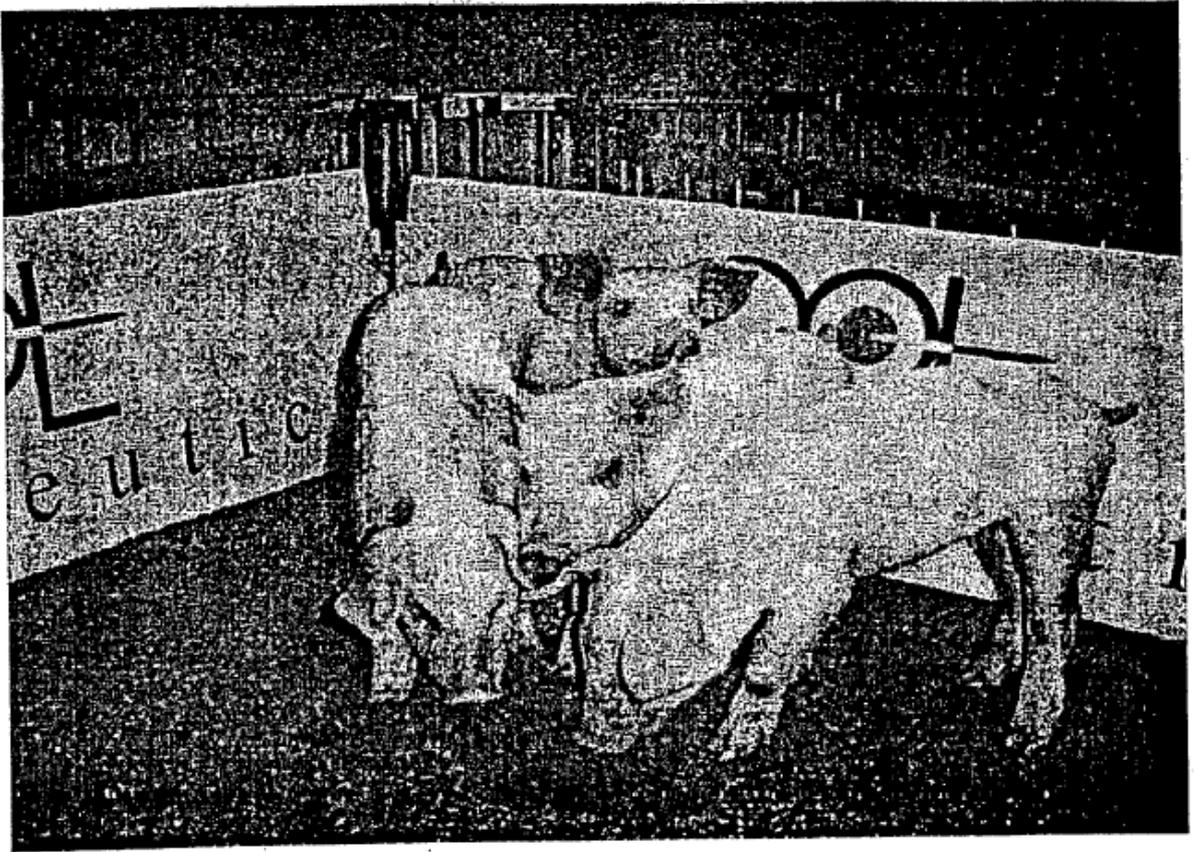


FIGURA 5

Unidades fluorescentes

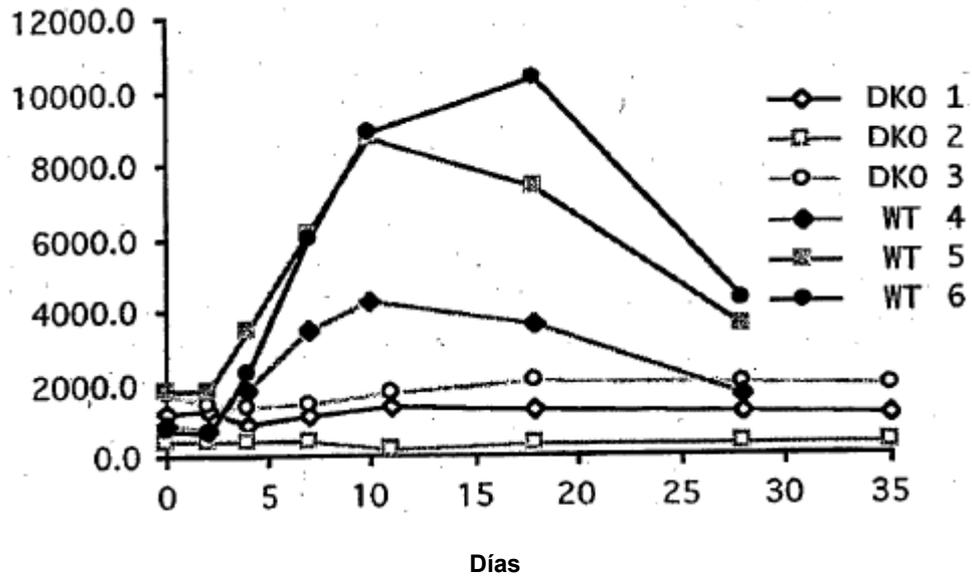


Figura 6

A

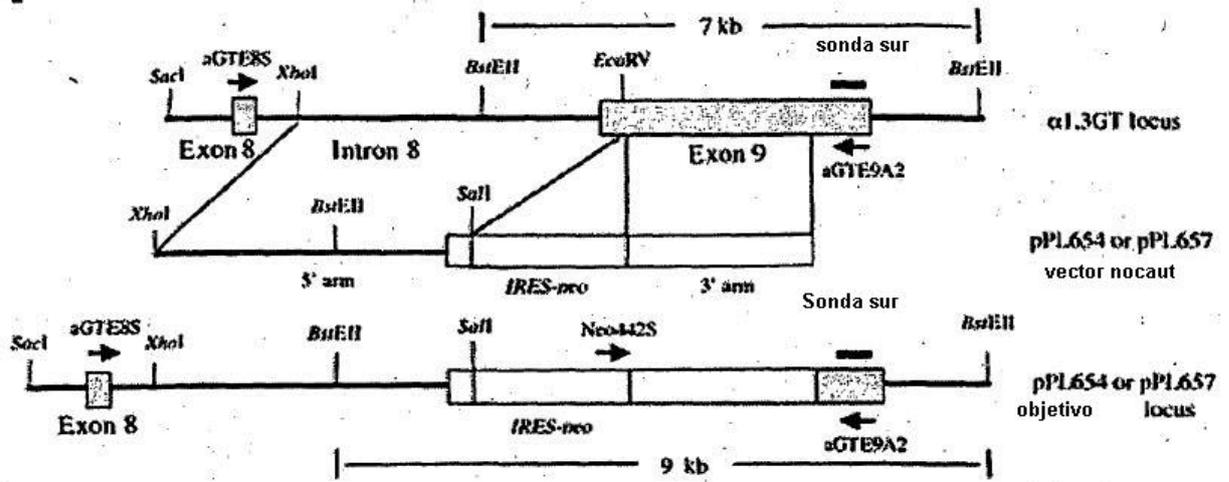


Figura 7

