

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 680 636**

51 Int. Cl.:

**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61L 27/36** (2006.01)  
**C12N 15/85** (2006.01)  
**A01K 67/027** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2012 PCT/US2012/025097**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2012 WO12112586**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2012 E 12706385 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2675901**

54 Título: **Cerdos genéticamente modificados para xenotrasplante de xenoinjertos vascularizados y derivados de los mismos**

30 Prioridad:

**14.02.2011 US 201161442504 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**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 680 636 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

**Cerdos genéticamente modificados para xenotrasplante de xenoinjertos vascularizados y derivados de los mismos**

[0001] Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos 61/442.504, presentada el 14 de febrero de 2011.

**Campo de la invención**

[0002] La presente invención proporciona ciertos donantes animales, tejidos y células que son particularmente útiles para las terapias de xenotrasplante. En particular, los descritos en este documento son animales porcinos, así como tejido y células derivadas de estos, que carecen de cualquier expresión de alfa 1,3 galactosiltransferasa funcional (aGT) y expresan uno o más transgenes adicionales que hacen que estos animales sean donantes adecuados para xenotrasplante de xenoinjertos vascularizados y derivados de los mismos. También se describen métodos de tratamiento y uso de órganos, tejidos y células derivadas de tales animales.

**Antecedentes de la invención**

[0003] Hay una escasez crítica de órganos humanos para el trasplante de órganos. Solo en los Estados Unidos, aproximadamente 110.000 pacientes están en listas de espera para recibir órganos, y sin embargo solo 30.000 órganos estarán disponibles de donantes fallecidos. Casi 20 pacientes mueren cada día (7.000 por año) a la espera de un órgano (Cooper y Ayares, 2010 International Journal of Surgery, In Press, doi: 10.1016/j.ijssu.2010.11.002). El suministro de órganos y tejidos humanos para su uso en alotrasplantes nunca satisfará completamente las necesidades de la población. Se necesita urgentemente una nueva fuente de materiales de donantes.

**Xenotrasplante**

[0004] Los xenotrasplantes (trasplante de órganos, tejidos y células de un donante de una especie diferente) podrían abordar eficazmente la escasez de material donante humano. Los xenotrasplantes también se suministran ventajosamente (i) de una manera predecible, que no es de emergencia; (ii) producido en un ambiente controlado; y (iii) disponible para caracterización y estudio antes del trasplante.

[0005] Dependiendo de la relación entre las especies donantes y receptores, el xenotrasplante se puede describir como concordante o discordante. Las especies concordantes son especies filogenéticamente estrechamente relacionadas (p. ej., ratón a rata). Las especies discordantes no están estrechamente relacionadas (p. ej., cerdo a humano). Los cerdos han sido el foco de la mayoría de las investigaciones en el área de xenotransplante, ya que el cerdo comparte muchas características anatómicas y fisiológicas con humanos. Los cerdos también tienen períodos de gestación relativamente cortos, pueden criarse en ambientes libres de patógenos y pueden no presentar los mismos problemas éticos asociados con animales que no se usan comúnmente como fuentes alimenticias (por ejemplo, primates).

[0006] El conocimiento científico y experiencia en el campo de los xenotrasplantes cerdo a primate ha crecido rápidamente en la última década, lo que resulta en la supervivencia considerablemente prolongada de los receptores de primates de xenoinjertos porcinos para salvar vidas. (Cozzi et al., Xenotransplantation, 16: 203 - 214. 2009). Recientemente, se han reportado logros significativos en el campo del xenotrasplante de órganos. Para una revisión de los resultados de xenotrasplantes de órganos, véase Ekser et al., 2009, Transplant Immunology Jun; 21 (2): 87-92

**Modificación genética**

[0007] Mientras que sean ventajosos en muchos aspectos, los xenotrasplantes también crean un escenario inmunológico más complejo que alotrasplante. Como tal, se han realizado esfuerzos considerables para abordar la barrera inmune a través de la modificación genética (van der Windt et al., Xenotransplantation. Jul 2007; 14 (4): 288-97, Cowan y D'Apice, Curr Opin Organ Transplant. 2008 Abr; 13 (2): 178-83).

[0008] El rechazo de xenoinjertos puede dividirse en tres fases: rechazo hiperagudo, rechazo de xenoinjerto humoral agudo y rechazo celular mediado por células T. El rechazo hiperagudo (HAR, por sus siglas en inglés) es un evento muy rápido que ocasiona daños irreversibles y pérdida de injerto en minutos o horas después de la reperusión del injerto. Se desencadena por la presencia de anticuerpos naturales xenorreactivos presentes en el receptor en el momento del trasplante. Los seres humanos tienen un anticuerpo de origen natural para el epítipo alfa 1,3-galactosa (Gal) que se encuentra en las células del cerdo. Este anticuerpo se produce en grandes cantidades y, ahora se cree, es el principal mediador de HAR. (Sandrin et al., Proc Natl Acad Sci, 1993 Dic 1; 90 (23): 11391 - 5, 1993; revisión por Sandrin y McKenzie, Immunol Rev. 1994 Oct; 141: 169 - 90).

[0009] Los esfuerzos iniciales para modificar genéticamente los cerdos se han centrado en la eliminación del epítipo

alfa 1,3-galactosa (Gal) de células de cerdo. En 2003, Phelps et al. (Science, 2003, 299: 411-414) informaron de la producción de los primeros cerdos vivos que carecían de expresión funcional de  $\alpha$ GT (GTKO), lo que representaba un gran avance en los xenotrasplantes (véase también la publicación PCT N° WO 04/028243 de Revivicor, Inc. y la Publicación PCT N° WO 04/016742 de Immerge Biotherapeutics, Inc.). Estudios posteriores han demostrado que los injertos de órganos de cerdos GTKO no sufren HAR (Kuwaki y col., Nat Med. 2005 enero; 11 (1): 29-31, Yamada et al., Nat Med. 2005 enero; 11 (1) : 32-4). Se ha sugerido la expresión de reguladores del complemento en el tejido de xenotrasplano como una estrategia diferente para combatir HAR (Squinto, Curr Opin Biotechnol. 1996). Diciembre; 7 (6): 641-5). La patente europea 0495852 de Imutran sugiere asociar tejidos de xenoinjertos con factores de restricción del complemento receptor para reducir la activación del complemento en el receptor (véase también Diamond, et al., Transpl Immunol. 1995 diciembre; 3 (4): 305-12). Se han informado de cerdos transgénicos que expresan DAF humano (hDAF) y/o CD59 humano (hCD59) (Byrne y col., Transplant Proc., 1996 Abr; 28 (2): 758).

**[0010]** El CD46 se ha expresado en células de cerdo usando un minigen que se optimizó para una alta expresión ubicua y los riñones de estos cerdos transgénicos CD46 se protegieron del rechazo hiperagudo en un modelo de xenotrasplante de primate (Loveland et al., Xenotransplantation, 2004, 11: 171 : 183). Los cerdos transgénicos con la combinación de GTKO y expresión de CD46 se probaron recientemente en un modelo de corazón heterotópico (cerdo a babuino) y proporcionaron supervivencia prolongada y función de corazones de xenoinjerto durante hasta 8 meses sin evidencia de rechazo inmune (Mohiuddin et al., Abstract TTS-1383. Transplantation 2010; 90 (supl): 325; Mohiuddin et al. (2011), publicación en línea American Journal of Transplantation). Sin embargo, los primates se colocaron en un régimen inmunosupresor ATG, anti-CD154 y MMF, que prolongó la supervivencia del injerto GTKO.hCD46 Tg durante hasta 236 días (n = 9, supervivencia media de 71 días y supervivencia media de 94 días). No es posible que este tipo de régimen inmunosupresor se use en humanos. Ekser et al. (Transplant 2010 Sep 15; 90 (5): 483-93) informaron de la función hepática en mandriles después del trasplante de hígados de cerdos inactivados genéticamente de alfa-1,3-galactosil-transferasa transgénicos para CD46. Los babuinos receptores murieron o fueron sacrificados después de 4 a 7 días, pero se vieron limitados por el rápido desarrollo de una trombocitopenia profunda.

**[0011]** Incluso cuando se evita HAR, el xenoinjerto se somete a una forma retardada de rechazo, rechazo agudo humoral o xenoinjerto vascular agudo (AHXR/AVXR) - también denominado rechazo de xenoinjerto retrasado (DXR) (Shimizu et al 2008 Am J Pathol. 2008 Jun; 172 (6): 1471-81). En general, se piensa que se inicia con anticuerpos xeno-reactivos, incluyendo anticuerpos no Gal y activación posterior del endotelio del injerto, el complemento y los sistemas de coagulación (Miyagawa et al., Xenotransplantation, 2010, 1: 11-25). Aunque las amenazas presentadas por la respuesta humoral son críticas con respecto a la supervivencia y la función de los injertos vascularizados, el riesgo de daño del injerto por los mecanismos celulares también es importante. Las respuestas agudas mediadas por células T juegan un papel importante en el rechazo de xenotrasplantes. De varias vías de estimulación de células T identificadas hasta la fecha, la más destacada es la vía CD28 y la vía de la proteína asociada a los linfocitos T citotóxicos (CTLA4) relacionada.

**[0012]** Hasta la fecha, gran parte de la investigación sobre CTLA4-Ig como un agente inmunosupresor se ha centrado en la administración de formas solubles de CTLA4-Ig a un paciente (véase la patente de EE.UU. N° 7.304.033; Publicación PCT N° WO 99/57266; y Lui y col., J Immunol Methods 2003 277: 171 - 183). Para reducir la carga inmunosupresora global en un paciente, se ha sugerido la expresión transgénica de dicha proteína. Se han desarrollado ratones transgénicos que expresan CTLA4-Ig (Ronchese y col., J Exp Med (1994) 179: 809; Lane y col., J Exp Med. (1994) Marzo 1; 179 (3): 819; Sutherland et al. - Transplantation 2000 69 (9): 1806-12). Además, la publicación PCT N° WO 01/30966 de Alexion Pharmaceuticals, Inc. y la publicación PCT N° WO 07/035213 de Revivicor describen cerdos transgénicos que expresan solo el transgén CTLA4-Ig (véase también Phelps et al., Xenotransplantation, 16 (6): 477-485. 2009). Se produjeron cerdos que expresan CTLA4-Ig en el tejido cerebral, pero se demostró que la expresión plasmática alta causaba efectos negativos (Martin, et al. (2005) Transg. Rsch. 14: 373-84). Sigue habiendo dudas sobre si la expresión a largo plazo de transgenes inmunosupresores en ungulados plantea problemas de seguridad para el ungulado o para el receptor de cualquier tejido de dicho animal.

**[0013]** Además de las respuestas inmunes celulares y humorales, un desafío significativo asociado con el xenotrasplante es la desregulación de coagulación y microangiopatía trombótica en la vasculatura del injerto (Ekser et al, 2009 Jun; 21 (2): 87-92). Este fenómeno salió a la luz cuando se evitó HAR mediante la eliminación del epítipo Gal y/o la expresión transgénica de inhibidores del complemento, y se evitó también el AHXR clásico con altos niveles de inmunosupresión. Esta coagulación intravascular se desencadena por daño del endotelio mediado por anticuerpos/células o por incompatibilidades del factor de coagulación entre las especies discordantes (cerdo y primate no humano), lo que conduce a la activación endotelial. En un entorno de trasplante, el endotelio de un injerto vascularizado del donante es donde los antígenos del donante entran en contacto con el torrente sanguíneo del receptor (o del huésped), lo que conduce a una respuesta inmune mediada por anticuerpos y al posible rechazo del injerto. Dependiendo de la relación del donante y el receptor, pueden ocurrir varios tipos de rechazo inmunológico. (véase, por ejemplo, Fundamental Immunology, Ed. William E. Paul, Lippincott Williams & Wilkins; Sexta edición (22 de mayo de 2008), Capítulo 44).

**[0014]** Una vez que se activa el endotelio, que cambia desde su estado anticoagulante a un estado procoagulante por hasta la regulación del factor de von Willebrand y la producción de factor tisular que conduce a la formación de

trombos, hemorragia, y el rechazo del injerto (Mohiuddin, 2007, PLoS Medicine, Vol 4 (3) p.0429-0434). Hasta que se aborde este tema de la coagulación intravascular, la obtención de la supervivencia a largo plazo de un xenoinjerto vascularizado seguirá siendo un desafío formidable.

5 **[0015]** La adición de un transgén anticoagulante se ha sugerido para evitar respuestas de coagulación a xenoinjertos (revisados por Cowan, Xenotransplantation, 2007; 14: 7-12), sin embargo, hasta la fecha, muy pocos de los cerdos transgénicos que expresan los anticoagulantes se han producido y ninguno se ha ensayado in vivo en modelos de xenotrasplantes. Importantes problemas de salud y viabilidad en cerdos producidos con un fenotipo anticoagulante han llevado a una baja tasa de producción de animales transgénicos viables. En ratones, la expresión del anticoagulante CD39 conducido por un promotor murino de H2-K (MHC clase I), condujo a una agregación plaquetaria alterada y tiempos de sangrado prolongados (véase Dwyer et al. (2004) J Clin Invest 113: 1440-46). Otro grupo intentó producir cerdos transgénicos TFPI en combinación con un transgén DAF impulsado por el potenciador de promotor constitutivo pCMVIE a través de la transferencia nuclear (Lee et al 2010 Reprod Domest Anim. 2010 Jul 4 epub ahead of print PMID: 20626677). Sólo se obtuvo un lechón transgénico viable a partir de este esfuerzo y se demostró que expresaba DAF y TFPI en células de corazón, hígado y oído examinadas.

20 **[0016]** Cerdos multi-transgénicos también se han generado que contienen transgenes hCD59, DAF y TM, con el anticoagulante TM dirigido por un promotor CMV (Petersen et al, Xenotransplantation 2009: 16: 486-495), sin embargo hay una considerable variabilidad en el nivel de expresión TM en estos cerdos. Además, Dwyer et al. (Transplantation Reviews 21 (2007) 54 - 63), informaron brevemente de la generación de cerdos transgénicos CD39. La patente de EE.UU. Nº 7.378.569 describe cerdos transgénicos que transportan dos transgenes, uno que codifica un factor de aceleración de desintegración humano (hDAF) y el otro que codifica un hemo oxigenasa-1 humana (hHO)-1, que son útiles para proporcionar células, tejidos u órganos para xenotrasplante Ayares (2009 Xenotransplantation 16 (5) 373) discute otras modificaciones genéticas, basándose en los antecedentes genéticos de GTKO, ha sido iniciado por varios grupos para abordar problemas tales como respuestas inducidas de anticuerpos a antígenos no Gal, trombosis y respuestas inmunes de mediación celular.

30 **[0017]** A pesar de que el xenotrasplante de órganos, en particular de los donantes porcinos, es una alternativa atractiva al uso de aloinjertos, debido a la limitada oferta y la calidad de los materiales donantes humanos, sigue habiendo obstáculos importantes. Tanto la respuesta inmune inmediata como la tardía requieren cócteles potencialmente tóxicos de las terapias inmunosupresoras, e incluso en ese caso, la activación endotelial y la subsiguiente desregulación y trombosis de la coagulación en el injerto pueden provocar la falla del injerto. La producción de animales genéticamente modificados para abordar ciertas respuestas inmunes ha sido sugerida; sin embargo, esto requiere la eliminación coordinada y la expresión apropiada de transgenes múltiples que son capaces de abordar cada respuesta inmune sin reducir significativamente la salud y la viabilidad general del cerdo. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de animales y tejidos mejorados adecuados para terapias de xenotrasplante. En particular, sigue existiendo la necesidad de mejores animales donantes, órganos y tejidos para su uso en xenotrasplantes sin requerir terapias inmunosupresoras o anticoagulantes significativos o a largo plazo. El resumen Ayares, Transgenic research Feb 2010, 19 (1), 17-8-2009, p143; de la 7ª Conferencia de la Universidad de California-Davis-Transgenic-Animal-Research Conference; Tahoe City, CA, EE.UU.; El 17-21 de agosto de 2009 reveló que los cerdos transgénicos multigénicos con expresión de genes para la regulación del complemento para abordar la respuesta humoral a dianas anti-no gal (es decir, DAF o CD46), inhibición de la coagulación/rombosis (es decir, TFPI o CD39) y se ha producido protección local contra la respuesta celular humana (CTLA4lg). Se afirma que para muchos transgenes se puede usar un sistema promotor constitutivo para la expresión en todos los tejidos, de modo que un animal puede usarse para múltiples aplicaciones de trasplante, sin embargo, nuestros resultados han demostrado que para ciertos transgenes, la expresión específica del tejido ayuda a evitar potenciales problemas para el cerdo donante. Ya que la inhibición de la coagulación y la modulación de la vía del complemento son importantes para el rechazo retardado del xenoinjerto de ambos órganos completos y de los xenoinjertos de células de los islotes, los cerdos se han producido con expresión transgénica específica del tejido en los compartimentos del endotelio vascular o del páncreas endocrino o constitutivamente en todos los tejidos. Los resultados in vivo en primates no humanos han demostrado la normalización completa de la glucosa en sangre durante hasta 1 año en monos diabéticos y la supervivencia a los 6 meses de corazones de cerdo multigénicos en mandriles, lo que demuestra la promesa de esta tecnología para uso clínico humano. Un objeto de la presente invención consiste en proporcionar animales porcinos genéticamente modificados para xenotrasplantes de xenoinjertos vascularizados y sus derivados.

50 **[0018]** Es otro objeto de la presente invención proporcionar xenoinjertos vascularizados de animales porcinos modificados genéticamente que expresan de uno o más inmunosupresores y/o transgenes anticoagulantes y carecen de la expresión de alfa-1,3-galactosiltransferasa.

60 **[0019]** Un objeto adicional de la presente invención consiste en proporcionar animales porcinos modificados genéticamente que expresan de uno o más inmunosupresores y/o transgenes anticoagulantes específicamente en el endotelio.

65 **Sumario de la invención**

5 **[0020]** La invención en su sentido más amplio se define como en las reivindicaciones independientes. La invención proporciona un animal porcino transgénico que comprende modificaciones genéticas que resultan en (i) falta de cualquier expresión de alfa 1,3 galactosiltransferasa (GTKO) funcional; (ii) expresión de al menos un transgén inhibidor del complemento bajo el control de un promotor ubicuo; y (iii) expresión de al menos un transgén anticoagulante bajo el control de un promotor endotelial específico.

10 **[0021]** La invención también proporciona células derivadas de un animal de la invención, en donde las células comprenden modificaciones genéticas que dan como resultado (i) la falta de cualquier expresión de alfa funcional 1,3 galactosiltransferasa (GTKO); (ii) expresión de al menos un transgén inhibidor del complemento bajo el control de un promotor ubicuo; y (iii) expresión de al menos un transgén anticoagulante bajo el control de un promotor endotelial específico.

15 **[0022]** La invención proporciona también un órgano derivado de un animal de la invención, en donde el órgano comprende modificaciones genéticas que dan como resultado (i) la falta de cualquier expresión de alfa funcional 1,3 galactosiltransferasa (GTKO); (ii) expresión de al menos un transgén inhibidor del complemento bajo el control de un promotor ubicuo; y (iii) expresión de al menos un transgén anticoagulante bajo el control de un promotor endotelial específico, donde opcionalmente el órgano se selecciona del grupo que consiste en corazón, pulmón, hígado y riñón.

20 **[0023]** La invención también proporciona tejido derivado de un animal de la invención, en el que el tejido comprende modificaciones genéticas que dan como resultado (i) la falta de cualquier expresión de alfa funcional 1,3 galactosiltransferasa (GTKO); (ii) expresión de al menos un transgén inhibidor del complemento bajo el control de un promotor ubicuo; y (iii) expresión de al menos un transgén anticoagulante bajo el control de un promotor endotelial específico, donde opcionalmente el tejido se selecciona del grupo que consiste en tejido vascular, tejido retinal y tejido corneal, y en el que opcionalmente el tejido vascular es injerto vascular.

25 **[0024]** La invención también proporciona órganos porcinos, tejido o células derivadas de un animal de la invención, en donde los órganos, tejidos o células comprenden modificaciones genéticas que dan lugar a: (i) la falta de cualquier expresión de alfa funcional 1,3 galactosiltransferasa (GTKO); (ii) la expresión de al menos un transgén inhibidor del complemento se expresa a partir de un promotor ubicuo; y (iii) expresión de al menos un transgén anticoagulante bajo el control de un promotor endotelial específico para uso en un método para xenotrasplante que comprende administrar dichos órganos, tejidos o células a un primate que lo necesite.

## 35 RESUMEN DE LA DIVULGACIÓN

40 **[0025]** En este documento se describen animales, órganos, tejidos y células de porcino genéticamente modificadas que son particularmente útiles para xenotrasplantes de xenoinjertos vascularizados y sus derivados. Los xenoinjertos vascularizados pueden incluir cualquier órgano, tejido, célula o combinación de los mismos, que contiene vasos sanguíneos porcinos y/o se derivan de un órgano, tejido o célula del mismo. Los animales donantes modificados genéticamente sirven como fuente de órganos, tejidos y células que superan las respuestas inmunes humoral (HAR y AHXR/AVXR/DXR) y celular (ACXR), haciéndolas particularmente útiles para los xenotrasplantes. Específicamente, los animales donantes genéticamente modificados tienen transgenes específicamente expresados en el endotelio vascular.

45 **[0026]** Dado que el endotelio vascular es el sitio del primer contacto entre la corriente sanguínea del receptor y un injerto donante, y el sitio de la activación inmune inicial y la respuesta; la modificación del endotelio del cerdo reducirá el daño y el rechazo del injerto debido a la coagulopatía de consumo (también conocida como coagulación intravascular diseminada (CID)) y la microangiopatía trombótica actualmente observada después de un xenotrasplante discordante. Dichos animales donantes genéticamente modificados pueden servir como fuente de xenoinjertos vascularizados (así como de los órganos, tejidos y células derivadas de los mismos), haciéndolos particularmente útiles para el xenotrasplante, usando un régimen inmunosupresor clínicamente relevante.

50 **[0027]** Los animales porcinos viables modificados genéticamente descritos en este documento se caracterizan por la reactividad inmune reducida globalmente (es decir, debido a la falta de expresión de alfa 1,3 galactosiltransferasa funcional (aGT)), así como la expresión de transgenes críticos para superar el rechazo de trasplante, seleccionado del grupo que incluye anticoagulantes, inmunomoduladores y citoprotectores. Antes de la presente invención, se desconocía si estos tipos de transgenes, que pueden provocar que el animal esté inmunocomprometido y hemofílico, se podrían expresar en un solo animal que podría ser un donante de trasplante adecuado porque se esperaba que la viabilidad de los animales se vería severamente restringida. Los presentes inventores han descubierto que tales animales, tejidos y células donantes se pueden obtener, en particular cuando se reduce globalmente la reactividad inmune debido a la falta de expresión de alfa 1,3 galactosiltransferasa funcional (GTKO) se combina con la expresión endotelial específica de ciertos transgenes.

55 **[0028]** Otras realizaciones de la presente invención pueden incluir la adición de un transgén inmunomodulador que se expresa específicamente en el endotelio. El inmunomodulador puede ser una molécula inmunosupresora, tal como CTLA4, en particular, CTLA4-Ig. La expresión local de un inmunomodulador permite el uso final de un régimen

inmunosupresor clínicamente relevante en el siguiente xenotrasplante humano del órgano, tejido o célula.

**[0029]** En este documento, se describen animales porcinos GTKO, órganos, tejidos y células que expresan específicamente al menos un transgén en el endotelio.

**[0030]** El transgén expresado específicamente en el endotelio puede ser al menos un anticoagulante. El transgén expresado específicamente en el endotelio puede ser al menos un inmunomodulador. El transgén expresado específicamente en el endotelio puede ser al menos un inmunosupresor. El transgén expresado en el endotelio puede ser al menos un transgén citoprotector.

**[0031]** También se describe en el presente documento animales GTKO, tejidos y células que expresan específicamente múltiples transgenes en endotelio. Los múltiples transgenes se pueden seleccionar del grupo que incluye anticoagulantes, inmunomoduladores y transgenes citoprotectores.

**[0032]** En este documento, se describen animales, tejidos y células de GTKO que expresan específicamente al menos dos transgenes en el endotelio. Los al menos dos transgenes pueden ser anticoagulantes.

**[0033]** En este documento, se describen animales, tejidos y células de GTKO que expresan específicamente al menos tres transgenes en el endotelio. Los al menos tres transgenes pueden incluir dos transgenes anticoagulantes y un transgén inmunosupresor.

**[0034]** Se da a conocer en el presente documento animales GTKO, tejidos y células que carecen de cualquier expresión de alfa funcional 1,3 galactosiltransferasa (GTKO) y que expresan específicamente la trombomodulina y EPCR (receptor C de la proteína endotelial) en el endotelio.

**[0035]** También se describen en el presente documento animales porcinos, tejidos y células que carecen de cualquier expresión de alfa 1,3 galactosiltransferasa funcional (GTKO) y que expresa al menos un primer transgen y al menos un segundo transgen, en donde el segundo transgen se expresa específicamente en el endotelio.

**[0036]** Al menos un primer transgen puede ser un inmunomodulador. Al menos un primer transgen puede ser un inhibidor del complemento.

**[0037]** Al menos un primer transgén puede ser un inhibidor del complemento y al menos un segundo transgén expresado específicamente en el endotelio se selecciona del grupo que incluye (i) un anticoagulante; (ii) un inmunosupresor; y (iii) un citoprotector.

**[0038]** Se divulgan aquí animales, tejidos y células porcinas que carecen de cualquier expresión de alfa 1,3-galactosiltransferasa funcional (GTKO) y expresa al menos un inhibidor del complemento y al menos un transgén adicional seleccionado del grupo que consiste en anticoagulantes, inmunosupresores y citoprotectores.

**[0039]** Se divulgan aquí animales, tejidos y células porcinas que carecen de cualquier expresión de alfa 1,3-galactosiltransferasa funcional (GTKO) y expresa al menos un inhibidor del complemento y al menos un anticoagulante. El inhibidor complementario puede ser CD46 y al menos un anticoagulante se puede seleccionar del grupo que consiste en TFPI, CD39, hirudina, trombomodulina y EPCR. Al menos un inhibidor del complemento puede ser CD46 y al menos un anticoagulante puede ser trombomodulina. Al menos un inhibidor del complemento puede ser CD46 y el al menos un transgén adicional puede ser un inmunosupresor, por ejemplo, CTLA4.

**[0040]** Se describen aquí animales, tejidos y células porcinas que carecen de cualquier expresión de alfa 1,3-galactosiltransferasa funcional (GTKO) y además expresan al menos un inhibidor del complemento, al menos un anticoagulante y al menos un inmunosupresor. Opcionalmente, los animales, tejidos y células porcinas también expresan al menos un transgén citoprotector.

**[0041]** El transgén puede ser expresado específicamente en el endotelio. El transgén puede expresarse específicamente en células endoteliales. El transgen puede expresarse en el endotelio vascular. El endotelio vascular se refiere a las células endoteliales que recubren los vasos sanguíneos. Se entiende que estos vasos sanguíneos inervan los órganos y tejidos. El transgen puede expresarse en el endotelio vascular de un tejido u órgano seleccionado del grupo que incluye, pero no se limita a: corazón, riñón, hígado, pulmón, córnea y vasos sanguíneos. La expresión puede ser a cualquier nivel, pero en una realización específica, la expresión está en un nivel alto. La expresión de transgenes descritos en la presente memoria puede ser dirigida por un promotor específico endotelial. El promotor endotelial específico puede ser la molécula de adhesión intercelular 2 (ICAM-2). El promotor específico endotelial puede ser TIE-2. El promotor puede ser un promotor porcino.

**[0042]** Un anticoagulante de acuerdo con la presente invención se puede seleccionar de entre el grupo que incluye el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), hirudina, la trombomodulina (TM), receptor endotelial de la proteína C (EPCR), y CD39. En una realización particular, el anticoagulante es TFPI. En otra realización, el anticoagulante es CD39. En otra realización, el anticoagulante es trombomodulina.

5 **[0043]** Un inmunomodulador de acuerdo con la presente invención puede ser un inhibidor del complemento o un inmunosupresor. En realizaciones específicas, el inmunomodulador es un inhibidor del complemento. El inhibidor del complemento puede ser CD46 (o MCP), CD55, CD59 y/o CRI. En una realización específica, se pueden expresar al menos dos inhibidores del complemento. En una realización, los inhibidores del complemento pueden ser CD55 y CD59. En otra realización, el inmunomodulador puede ser un transactivador de clase II o mutantes del mismo. En ciertas realizaciones, el inmunomodulador puede ser un mutante negativo dominante transactivador de clase II (CIITA-DN). En otra realización específica, el inmunomodulador es un inmunosupresor. El inmunosupresor puede ser CTLA4-Ig. Se pueden seleccionar otros inmunomoduladores del grupo, pero sin limitación, CIITA-DN, PDL1, PDL2 o ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL), ligando Fas (FasL, CD95L) CD47, conocido como asociado a integrina proteína (CD47), HLA-E, HLA-DP, HLA-DQ y/o HLA-DR.

15 **[0044]** El transgén citoprotector de acuerdo con la presente invención puede ser un anti-apoptótico, un antioxidante o un transgén anti-inflamatorio. En ciertas realizaciones, el transgén citoprotector se selecciona del grupo que incluye A20, HO-1, FAT-1, catalasa y receptor de TNF-alfa soluble (sTNFR1).

**[0045]** Se describen aquí animales, tejidos y células porcinas con al menos las siguientes modificaciones genéticas: falta de expresión de GT, expresión de CD46 y expresión endotelial específica de trombosmodulina. CD46 puede expresarse ubicuamente.

20 **[0046]** En este documento se describen animales, tejidos y células porcinas con al menos las siguientes modificaciones genéticas: falta de expresión de GT, expresión de un inhibidor del complemento, expresión endotelial específica de un anticoagulante y/o expresión endotelial específica de un inmunomodulador. En este documento se describen animales, tejidos y células porcinas con al menos las siguientes modificaciones genéticas: falta de expresión de GT, expresión de CD46 y expresión endotelial específica de trombosmodulina. En este documento se divulgan animales porcinos, tejidos y células con al menos las siguientes modificaciones genéticas: falta de expresión de GT, expresión de CD46 y expresión endotelial específica de CD39. En este documento se divulgan animales porcinos, tejidos y células con al menos las siguientes modificaciones genéticas: falta de expresión de GT, expresión de CD46, expresión endotelial específica de trombosmodulina y expresión endotelial específica de CD39. CD46 puede expresarse de manera ubicua.

30 **[0047]** Se divulgan aquí animales, tejidos y células porcinas con al menos las siguientes modificaciones genéticas: falta de expresión de GT, expresión de CD46, expresión endotelial específica de trombosmodulina y expresión endotelial específica de CTLA4-Ig. En este documento se describen animales, tejidos y células porcinas con al menos las siguientes modificaciones genéticas: falta de expresión de GT, expresión de CD46, expresión endotelial específica de trombosmodulina y expresión endotelial específica de CIITA-DN. CD46 puede expresarse de manera ubicua.

35 **[0048]** Se describen aquí animales, tejidos y células porcinas con al menos las siguientes modificaciones genéticas: falta de expresión de GT, expresión de CD46, expresión endotelial específica de trombosmodulina y expresión de EPCR. CD46 puede expresarse de manera ubicua. La expresión de EPCR puede ser dirigida por un promotor endotelial específico. El promotor endotelial específico puede ser ICAM-2 porcino. El promotor endotelial específico puede ser TIE-2. La expresión de EPCR puede ser dirigida por un promotor ubicuo. El promotor ubicuo puede ser CAG.

45 **[0049]** Se describen en la presente invención animales porcinos, tejidos y células con al menos las siguientes modificaciones genéticas: falta de expresión de GT, expresión de CD46, expresión de trombosmodulina endotelial específica, expresión endotelial específica de CD39 y expresión específica endotelial de CTLA4-Ig. CD46 puede expresarse de manera ubicua. El cerdo puede expresar TFPI en lugar o además de la trombosmodulina.

50 **[0050]** Se divulgan aquí animales, tejidos y células porcinas con al menos las siguientes modificaciones genéticas: falta de expresión de GT, expresión de CD46, expresión de un transgén citoprotector, expresión endotelial específica de trombosmodulina, expresión endotelial específica de CD39, y expresión endotelial específica de CTLA4-Ig. CD46 puede expresarse de manera ubicua.

55 **[0051]** Se describen en la presente invención animales porcinos, tejidos y células con al menos las siguientes modificaciones genéticas: falta de expresión de GT, expresión de CD46, expresión de un transgén citoprotector, expresión endotelial específica de trombosmodulina y expresión endotelial específica de CD39. CD46 puede expresarse de manera ubicua. El cerdo puede expresar TFPI en lugar o además de la trombosmodulina.

60 **[0052]** Se divulgan aquí animales, tejidos y células porcinas con al menos las siguientes modificaciones genéticas: falta de expresión de GT, expresión de CD46, expresión de CIITA-DN y expresión endotelial específica de trombosmodulina y/o expresión específica endotelial de CD39. CD46 puede expresarse de manera ubicua.

65 **[0053]** Aquí se describen animales porcinos, tejidos y células con al menos las siguientes modificaciones genéticas: falta de expresión de GT, expresión de CD46, expresión de DAF, expresión de CIITA-DN y expresión endotelial específica de trombosmodulina y/o expresión específica endotelial de CD39. También se describen en la presente

invención animales porcinos, tejidos y células con al menos las siguientes modificaciones genéticas: falta de expresión de GT, expresión de CD46, expresión endotelial específica de trombosmodulina y/o expresión endotelial específica de EPCR. También se describen en la presente invención animales porcinos, tejidos, particularmente pulmones y células, particularmente células de pulmón, con al menos las siguientes modificaciones genéticas: falta de expresión de GT, expresión de CD46 y expresión endotelial específica de trombosmodulina. CD46 puede expresarse de manera ubicua.

**[0054]** Se divulga aquí un método para el tratamiento o la profilaxis de la disfunción del órgano que incluye administrar los órganos o células de la presente invención a un huésped que lo necesita. El huésped puede tener disfunción cardíaca, hepática, renal o pulmonar. Se puede administrar al huésped un xenoinjerto vascularizado y/o se deriva de un órgano, tejido o célula del mismo.

**[0055]** El huésped puede ser un primate. El anfitrión puede ser un humano. El anfitrión puede ser un ser humano que sufre de una disfunción orgánica.

**[0056]** El órgano puede ser un corazón porcino. El órgano puede ser un riñón porcino. El órgano puede ser un pulmón porcino. El órgano puede ser un hígado porcino. Las células pueden ser células derivadas de hígado porcino, cortes de tejido hepático; o células hepáticas aisladas. Las células pueden ser hepatocitos porcinos. Los hepatocitos porcinos o las rebanadas de tejido hepático porcino pueden usarse en un dispositivo médico. Los órganos se pueden seleccionar de entre los siguientes: corazón, pulmón, hígado, riñón, intestino, bazo y páncreas. Los órganos se pueden utilizar como órganos de puente hasta que haya disponible un órgano humano. Los órganos xenotransplantados pueden sobrevivir y funcionar en el receptor como un aloinjerto.

**[0057]** Un hígado donante porcino puede usarse como un trasplante de puente, permitiendo la estabilización de un paciente hasta que un hígado donante humano (aloinjerto) vuelve a estar disponible.

**[0058]** Las propias células endoteliales producidas por los métodos descritos en este documento se pueden usar como célula xenotransplantada.

**[0059]** Las células endoteliales porcinas de la córnea se pueden usar como material de trasplante para tratar la disfunción de la córnea.

**[0060]** Las células endoteliales porcinas de la retina se pueden usar como material de trasplante para tratar la disfunción de la retina.

**[0061]** La vasculatura en sí puede ser utilizada como el xenoinjerto como un injerto vascular. Los vasos pueden usarse como injertos para lo siguiente, entre otros, la cirugía reconstructiva vascular, la cirugía de derivación coronaria o la cirugía de derivación periférica para tratar la aterosclerosis, la arteriopatía coronaria, la enfermedad vascular periférica o el aneurisma aórtico. Los vasos pueden incluir tejido grande y microvasculatura, como microvasos, capilares, microcapilares y lechos capilares.

**[0062]** La dosis de fármaco(s)/agente(s) inmunosupresor(es) se puede reducir en comparación con otros métodos. La dosificación de uno o más de daclizumab, tacrolimus y/o sirolimus puede verse reducida en comparación con las dosis utilizadas en otros métodos de trasplante. Los regímenes inmunosupresores clínicamente relevantes se describen junto con los órganos, tejidos y células descritas en este documento.

**[0063]** El número de tipos de fármaco(s)/agente(s) inmunosupresor(es) se puede reducir en comparación con otros métodos.

**[0064]** La duración de la inmunosupresión puede ser acortada en comparación con otros métodos.

**[0065]** Inmunosupresión más baja o sin mantenimiento se puede usar en comparación con otros métodos.

**[0066]** Se describe un método para el tratamiento o la profilaxis de disfunción de órganos, incluyendo la administración de los órganos, tejidos o células de la presente invención a un hospedador, en donde después del trasplante no existen complicaciones numerosas, o graves que amenazan la vida, asociadas con uno o más del procedimiento de trasplante, el régimen inmunosupresor o el régimen de inducción de tolerancia. Se describe un método para el tratamiento o la profilaxis de la disfunción de órganos que incluye administrar los órganos, tejidos o células de la presente invención a un huésped, en donde después del trasplante no hay numerosas complicaciones graves o potencialmente mortales asociadas con uno o más de los procedimientos de trasplante. Se describe un método para el tratamiento o la profilaxis de la disfunción del órgano que incluye administrar los órganos, tejidos o células de la presente invención a un huésped, en donde después del trasplante no hay numerosas complicaciones graves que amenacen la vida, incluida la coagulopatía de consumo.

**[0067]** Se describe un método para el tratamiento o la enfermedad del ojo de profilaxis, incluyendo para el tratamiento de la córnea o disfunción de la retina, incluyendo la administración de los órganos, tejidos o células de la

presente invención a un huésped, en donde después del trasplante no hay complicaciones numerosas, o graves potencialmente mortales asociadas con uno o más procedimientos de trasplante, el régimen inmunosupresor o el régimen inductor de tolerancia.

- 5 **[0068]** Otras realizaciones de la descripción serán evidentes para un experto habitual a la luz de la siguiente descripción de la invención, las reivindicaciones y lo que se conoce en la técnica.

### Descripción de las figuras

- 10 **[0069]** La patente o el archivo de aplicación contiene al menos un dibujo ejecutado en color. Copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujo(s) a color se proporcionarán por la Oficina previa solicitud y pago de la tarifa necesaria.

15 **Figuras 1a y 1b** son figuras representativas de los vectores usados en la invención.

**Figura 1a:** el vector pREV859B es el promotor/potenciador Tie-2 unido a un transgén CD39; el vector pREV861 es el promotor/potenciador de ICAM-2 unido a un transgén CD39.

- 20 **Figura 1b:** el vector pREV 871 es el promotor/potenciador de ICAM-2 unido a un transgén de TFPI; el vector pREV 872 es el promotor/potenciador de ICAM-2 unido a un transgén TM; el vector pREV 873 es el promotor/potenciador de ICAM-2 unido a un transgén de EPCR.

- 25 **Figura 2** muestra el análisis por citometría de flujo de la expresión de proteína transgénica en células endoteliales aórticas inmortales porcinas transfectadas (AOC). El anticuerpo monoclonal anti-humano trombomodulina (mAb) reaccionó con (A), AOC no transfectadas y (B) AOC transfectadas con TM humano y EPCR humano. El mAb del receptor de la proteína C endotelial humana (EPCR) reaccionó con (A) AOC's no transfectadas y (D) AOC transfectadas con TM humano y EPCR humano.

- 30 **Figura 3** muestra el análisis citométrico de flujo de la expresión de proteína transgénica en células endoteliales aisladas de lechones 440-04 (transgénicos CD39) y 424-01 (transgénicos TM), teñidos con anti-CD39 y anti-CD141 (TM), respectivamente. (A) muestra la unión del control del isotipo a las células endoteliales del lechón 440-4. (B) muestra el anticuerpo monoclonal anti CD39 humano (mAb) que se une a células endoteliales positivas para CD39 de 440-4. (C) muestra el control del isotipo que se une a las células endoteliales del lechón 424-01. (D) muestra la unión de mAb anti CD141 (TM) humano a células endoteliales positivas a TM a partir de 424-01.

- 35 **Figura 4** presenta imágenes de células teñidas con anticuerpo anti TM humano marcado con FITC. Se observó expresión de TM en el endotelio de un vaso a partir de una biopsia de la cola del lechón 424-03. La fluorescencia de fondo (BF) muestra la morfología del vaso. El control del isotipo también se muestra.

- 40 **Figura 5** muestra la expresión del transcrito TM por RTPCR en muestras obtenidas de lechones multi-transgénicos 448-01, 448-02, 448-03 y 450-06. El número de copia de TM que se muestra es el número de copia de hTM presente en 50 ng de cADN.

### 45 Descripción detallada

- [0070]** El inmunobiología de los xenotrasplantes, entre las especies discordantes, ha sido bien detallado en el modelo de primate cerdo-a (revisado por Eksler y Cooper, 2010 *Experto Rev. Clin Immunol* 6 (2): 219-230; Li et al., *Transpl Immunol.* 2009 Jun; 21 (2): 70-4; Le Bas-Bernardet y Blanco *Transpl Immunol.* 2009 Jun; 21 (2): 60-4; Pierson et al., *Xenotransplante.* 2009 Sep -Oct; 16 (5): 263-80). En estudios iniciales, los órganos de cerdo de tipo salvaje trasplantados en primates no humanos fueron rechazados debido a la unión de anticuerpos naturales (preformados) al endotelio vascular del cerdo y al inicio de la cascada del complemento. Las células endoteliales respondieron a esta activación inmune convirtiendo de un anticoagulante a un fenotipo coagulante, y resultó HAR (Robson y col., *Int Arch Allergy Immunol.*, 1995 Abr; 106 (4): 305-22). La eliminación del epitopo Gal de la superficie celular en cerdos "Gal knock-out" (GTKO) genéticamente modificados eliminó HAR (Kuwaki y col., *Nat Med.* 2005 enero; 11 (1): 29-31). Posteriormente, los estudios que utilizaron cerdos GTKO identificaron formas adicionales de xenorrecepción, caracterizadas por coagulación intravascular y trombosis en el injerto. El primero, denominado rechazo de xenoinjerto humoral agudo (AHXR) o rechazo retardado de xenoinjerto (DXR), se desencadena por daño del endotelio mediado por anticuerpo/célula o por incompatibilidades del factor de coagulación entre las especies discordantes (cerdo y primate no humano) llevando a la activación endotelial. Una vez activado, el endotelio cambia de su estado anticoagulante a un estado procoagulante mediante la regulación al alza del factor de von Willebrand y la producción del factor tisular que conduce a la formación de trombos, hemorragia y rechazo del injerto (Mohiuddin, 2007, *PLoS Medicine*, Vol 4 (3) p.0429-0434). Además de AHXR, en ausencia de regímenes de inmunosupresión intensos, los xenoinjertos pueden sufrir un rechazo celular agudo, caracterizado por la infiltración de células T y B del injerto y la activación de las células T (Ekser y Cooper, 2010). Por lo tanto, en este desafiante entorno endotelial, un xenoinjerto debe ser capaz de prevenir o amortiguar todas estas respuestas inmunológicas, para permanecer

viable y funcional. La expresión de múltiples transgenes, tales como anticoagulantes, inmunosupresores y transgenes citoprotectores, de una manera específica de tejido dentro del endotelio porcino de un xenoinjerto, en un fondo genético de **GTKO**, abordará estos múltiples desafíos inmunológicos. Por lo tanto, en la presente memoria se describen cerdos manipulados genéticamente con el fondo genético de **GTKO** más otros transgenes hacia resultados mejorados en xenotrasplantes de órganos, tejidos o células endoteliales. Los órganos, tejidos y células de cerdos GTKO que expresan otros transgenes específicamente en el endotelio proporcionarán una protección significativa del material xenoinjertado de la respuesta inmune del receptor.

**[0071]** Un "transgen" es un gen o material genético que ha sido transferido de un organismo a otro. Típicamente, el término describe un segmento de ADN que contiene una secuencia de genes que se ha aislado de un organismo y se introduce en un organismo diferente. Este segmento no nativo de ADN puede retener la capacidad de producir ARN o proteína en el organismo transgénico, o puede alterar la función normal del código genético del organismo transgénico. En general, el ADN se incorpora a la línea germinal del organismo. Por ejemplo, en vertebrados superiores esto puede lograrse inyectando el ADN extraño en el núcleo de un óvulo fertilizado. Cuando se inserta en una célula, un transgén puede ser un segmento de ADNc (ADN complementario), que es una copia de ARNm (ARN mensajero), o el propio gen que reside en su región original de ADN genómico. El transgén puede ser una secuencia de genoma, en particular cuando se introduce como clones grandes en CAB (cromosomas artificiales bacterianos) o cósmidos. La "expresión" transgénica en el contexto de la presente especificación, a menos que se especifique lo contrario, significa que una secuencia peptídica de un ácido nucleico no nativo se expresa en al menos una célula en un hospedador. El péptido se puede expresar a partir de un transgén que se incorpora en el genoma del huésped.

**[0072]** Se entiende que un "donante" incluye cualquier organismo no humano que puede servir como fuente de tejido del donante o de las células para xenotrasplantes incluyendo, pero no limitándose a, mamíferos, aves, pollos, reptiles, peces, e insectos. El donante puede estar en cualquier etapa de desarrollo, incluidos, entre otros, fetal, neonatal, joven y adulto. Un "animal" es típicamente un mamífero. Se entiende que un "mamífero" incluye cualquier mamífero no humano, que incluye pero no se limita a cerdos, ovejas, cabras, bovinos, venados, mulas, caballos, monos, perros, gatos, ratas y ratones. Se describen cerdos genéticamente alterados y métodos de producción de los mismos. Los animales porcinos de la invención son "genéticamente modificados" o "transgénicos", lo que significa que tienen un transgén u otro ADN extraño, agregado o incorporado, o un gen endógeno modificado, incluyendo, dirigido, recombinado, interrumpido, eliminado, alterado, reemplazado, suprimido, potenciado o alterado de otro modo, para mediar un efecto genotípico o fenotípico en al menos una célula del animal, y típicamente en al menos una célula de línea germinal del animal porcino. Los animales porcinos pueden tener el transgén integrado en un alelo de su genoma (heterocigoto transgénico). Alternativamente, los animales porcinos pueden tener el transgén en dos alelos (homocigotos transgénicos).

**[0073]** El término "ungulado" se refiere a mamíferos ungulados. Los artiodáctilos son ungulados de dedos pares (de pezuña hendida), incluidos antílopes, camellos, vacas, ciervos, cabras, cerdos y ovejas. Los perisodáctilos son dedos del pie impares, que incluyen caballos, cebras, rinocerontes y tapires. El término ungulado tal como se usa en el presente documento se refiere a un animal ungulado adulto, embrionario o fetal.

**[0074]** Los términos "porcino", "animal porcino" y "cerdo" son términos genéricos que se refieren al mismo tipo de animal independientemente del género, tamaño, o raza.

**[0075]** Las "células" "tejidos" y "órganos" de la invención se derivan de un animal. Aunque las células, tejidos y órganos pueden derivarse de un animal maduro, en algunas realizaciones las células, tejidos y órganos se derivan de un tejido fetal o neonatal. En realizaciones particulares de la invención, las células, tejidos y órganos se derivan de un animal porcino transgénico y, en particular, un porcino transgénico que ha crecido hasta un tamaño suficiente para ser útil como donante de trasplante. En ciertas realizaciones, los animales sobreviven después de la edad de destete. En realizaciones específicas, los animales tienen al menos seis meses de edad. En ciertas realizaciones, el animal sobrevive para alcanzar la edad de crianza. En ciertas realizaciones, el animal es un animal porcino de al menos 300 libras. En realizaciones específicas, el animal es una cerda porcina y ha dado a luz al menos una vez.

**[0076]** Niveles "altos" de la expresión se consideran suficientes para proporcionar un fenotipo (expresión detectable o beneficio terapéutico). Típicamente, un nivel de expresión "alto" es suficiente para poder impartir un beneficio fenotípico o terapéutico al animal. Por ejemplo, puede ser capaz de reducir el rechazo de injertos, incluido el rechazo hiperagudo (HAR), el rechazo de xenoinjerto humoral/vascular agudo (AHXR/AVXR) y el rechazo celular mediado por células T. Anteriormente se desconocía si los antígenos anticoagulantes y los transgenes inmunosupresores podían expresarse en el endotelio porcino a niveles capaces de reducir estos tipos de rechazo.

**[0077]** El "endotelio" es un epitelio de origen mesoblástico compuesto de una sola capa de células aplanadas delgada que recubre las cavidades internas del cuerpo. Por ejemplo, las cavidades serosas o el interior del corazón contienen un revestimiento de células endoteliales y el "endotelio vascular" es el endotelio que recubre los vasos sanguíneos. (Medline Plus, Biblioteca Nacional de Medicina).

**[0078]** El término "régimen inmunosupresor clínicamente relevante" se refiere a un régimen clínicamente aceptable de medicamentos inmunosupresores proporcionados a un paciente tras trasplante de órganos, tejidos o células de

un cerdo modificado genéticamente como se describe aquí. La determinación de la relevancia clínica requiere un juicio general por parte de la FDA que equilibre el riesgo aceptable con el beneficio potencial de modo que se preserve la seguridad humana mientras que se mantiene la eficacia del medicamento o tratamiento. En un ejemplo, la FDA puede examinar la cantidad de eventos adversos asociados con un régimen particular. Un evento adverso es cualquier signo desfavorable e involuntario (incluido un hallazgo anormal de laboratorio, por ejemplo), síntoma o enfermedad temporalmente asociada con el uso de un medicamento, independientemente de que se lo considere relacionado con el producto médico.

**[0079]** Como se usa en el presente documento, los términos "específicos endoteliales", "expresión del transgén específica en el tejido endotelial", "expresa específicamente al menos un transgén en tejido endotelial" y similares, se entiende que estos términos se refieren a un transgén bajo el control de un elemento regulador endotelial específico que permite la expresión restringida de un transgén en tejido y/o células endoteliales. La función y expresión transgénicas está restringida al tejido y/o células endoteliales.

**[0080]** El "elemento endotelial específico regulador" y similares se refieren a un promotor, potenciador o una combinación de los mismos en el que el promotor, potenciador o una combinación de los mismos conduce la expresión de un transgén en los tejidos y/o células endoteliales restringidas. El elemento regulador proporciona la función y expresión transgénicas restringidas al tejido y/o células endoteliales.

## ***Animales transgénicos***

**[0081]** Se describen aquí animales porcinos, órganos, tejidos y células que tienen al menos cuatro modificaciones genéticas. Dichas modificaciones genéticas pueden incluir, sin limitación, adiciones y/o eliminaciones de genes, incluyendo knock-outs y knock-ins, knock-down, así como reconstrucciones. Se describen animales porcinos, órganos, tejidos y células que tienen al menos tres o al menos cuatro modificaciones genéticas, en las que al menos uno, al menos dos, al menos tres o cuatro de las modificaciones genéticas son transgenes y al menos uno, al menos dos, al menos tres o cuatro de los transgenes se expresan de manera ubicua. Se describen animales, órganos, tejidos y células porcinos que tienen al menos cuatro modificaciones genéticas, en las que al menos una modificación genética es un knock-out.

**[0082]** Animales porcinos, tejidos, órganos y células se describen que tienen al menos un gen noqueado y expresan al menos tres transgenes. Al menos un gen puede ser eliminado por recombinación homóloga.

**[0083]** Animales porcinos, órganos, tejidos y células se dan a conocer que tienen al menos cinco modificaciones genéticas. Dichas modificaciones genéticas pueden incluir, por ejemplo, adiciones y/o eliminaciones de otros genes, incluyendo knock-outs y knock-ins, así como también reordenamientos. Se describen animales porcinos, órganos, tejidos y células que tienen al menos cinco modificaciones genéticas, en las que al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o cinco de las modificaciones genéticas son transgenes y al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o cinco de los transgenes se expresan de manera ubicua. Se describen animales porcinos, órganos, tejidos y células que tienen al menos cinco modificaciones genéticas, en las que al menos una modificación genética es un knock-out.

**[0084]** Animales porcinos, tejidos y células se dan a conocer que tienen al menos un gen noqueado y expresan al menos cuatro transgenes. Al menos un gen puede ser eliminado por recombinación homóloga.

**[0085]** Animales porcinos, órganos, tejidos y células se dan a conocer que carecen de cualquier expresión de alfa funcional 1,3 galactosiltransferasa (GTKO) y expresan al menos un transgén en el endotelio. Se describen animales, órganos, tejidos y células de GTKO que expresan múltiples transgenes en el endotelio. En aspectos particulares, los animales, tejidos y células expresan al menos un inmunomodulador. Los animales, órganos, tejidos y células pueden expresar más de un inmunomodulador. Se describen animales, órganos, tejidos y células GTKO que expresan al menos un inmunomodulador y al menos un transgén anticoagulante. En un aspecto, el inmunomodulador es un inmunosupresor. En un aspecto alternativo, el inmunomodulador es un inhibidor del complemento. En un aspecto particular, la expresión del inmunomodulador es específica del endotelio. En un aspecto particular adicional, la expresión del inmunosupresor es específica del endotelio. En un aspecto aún más específico, la expresión del inhibidor del complemento es específica del endotelio. En otros aspectos, los animales, órganos, tejidos y células expresan al menos un anticoagulante. En ciertos aspectos, los animales, órganos, tejidos y células expresan más de un anticoagulante. En un aspecto particular, la expresión del anticoagulante es específica del endotelio. En una subcategoría, los animales, órganos, tejidos y células expresan al menos un transgén citoprotector. En otro aspecto, los animales, órganos, tejidos y células expresan más de un transgén citoprotector. En un aspecto, el transgén se expresa específicamente en el endotelio.

**[0086]** En este documento se describen animales, órganos, tejidos y células GTKO que carecen de expresión de alfa 1,3 galactosiltransferasa (GTKO) funcional y expresan al menos un inhibidor del complemento y al menos un transgen adicional seleccionado del grupo que consiste en anticoagulantes, inmunosupresores y citoprotectores. En un aspecto particular, la expresión de al menos un transgén adicional es específica del endotelio.

**[0087]** Se describen animales, órganos, tejidos y células de GTKO que expresan al menos un inhibidor del complemento (por ejemplo, CD46) y al menos un anticoagulante (por ejemplo, trombomodulina).

5 **[0088]** Se describen animales, órganos, tejidos y células de GTKO que expresan al menos un inhibidor del complemento (por ejemplo, CD46) y al menos dos anticoagulantes (por ejemplo, trombomodulina y CD39).

**[0089]** Se describen animales, órganos, tejidos y células GTKO que expresan al menos un inhibidor del complemento (por ejemplo, CD46) y al menos un inmunosupresor (por ejemplo, CTLA4).

10 **[0090]** Se describen animales, órganos, tejidos y células GTKO que expresan al menos un inhibidor del complemento (por ejemplo, CD46) y un transgén citoprotector (por ejemplo, A20).

**[0091]** Se describen animales, órganos, tejidos y células GTKO que expresan al menos un inmunosupresor, al menos un inhibidor del complemento y al menos un transgén anticoagulante. Se describen animales, órganos, tejidos y células GTKO que expresan al menos un inmunosupresor, al menos un inhibidor del complemento y al menos dos transgenes anticoagulantes. Se describen animales, órganos, tejidos y células GTKO que expresan al menos un inmunosupresor, al menos un inhibidor del complemento y al menos un transgén anticoagulante, en el que la expresión del al menos un inmunosupresor y el al menos un transgén anticoagulante es específico del endotelio. Se describen animales GTKO, órganos, tejidos y células que expresan al menos un inmunosupresor, al menos un inhibidor del complemento y al menos dos transgenes anticoagulantes, donde la expresión del al menos un inmunosupresor y los al menos dos transgenes anticoagulantes son específicos del endotelio. Se describen animales, órganos, tejidos y células GTKO que expresan al menos un inmunomodulador, al menos un anticoagulante y al menos un transgén citoprotector. Se describen animales, órganos, tejidos y células GTKO que expresan al menos un inmunosupresor, al menos un inhibidor del complemento, al menos un transgén anticoagulante y al menos un transgén citoprotector. Se describen animales, órganos, tejidos y células de GTKO que expresan al menos un inmunosupresor, al menos un inhibidor del complemento, al menos dos transgenes anticoagulantes y al menos un transgén anti-citoprotector. Se describen animales, órganos, tejidos y células GTKO que expresan al menos un inmunosupresor, al menos un inhibidor del complemento, al menos un transgén anticoagulante y al menos un transgén citoprotector, en el que la expresión de al menos un inmunosupresor y al menos un transgén anticoagulante es específico del endotelio. Se describen animales, órganos, tejidos y células GTKO que expresan al menos un inmunosupresor, al menos un inhibidor del complemento, al menos dos transgenes anticoagulantes y al menos un transgén citoprotector, en el que la expresión de al menos un inmunosupresor y al menos dos anticoagulantes transgenes es específico del endotelio. En un aspecto específico, la expresión del transgén anti-apoptótico es específica del endotelio.

35 **[0092]** En un aspecto, los animales porcinos transgénicos descritos en este documento son viables. En otro aspecto, los animales descritos en este documento son fértiles. En aspectos adicionales, los animales descritos en este documento pueden transmitir de manera estable algunas de sus modificaciones genéticas a su descendencia. En otros aspectos, los animales descritos en este documento pueden transmitir de manera estable todas sus modificaciones genéticas a su descendencia. En ciertos aspectos, los animales pueden transmitir de manera estable todas sus modificaciones genéticas a su descendencia cuando los animales son criados naturalmente. En otros aspectos, los múltiples transgenes presentan co-segregación con la descendencia. Los animales, órganos, tejidos y células porcinas se describen con al menos las siguientes modificaciones genéticas: falta de expresión de GT, expresión de un inhibidor del complemento, expresión endotelial específica de un transgén anticoagulante y expresión endotelial específica de un transgén inmunosupresor. Los animales, órganos, tejidos y células porcinas se describen con al menos las siguientes modificaciones genéticas: falta de expresión de GT, expresión de un inhibidor del complemento, expresión endotelial específica de dos transgenes anticoagulantes y expresión de un transgén inmunosupresor. Los animales, órganos, tejidos y células porcinas se describen con al menos las siguientes modificaciones genéticas: falta de expresión de GT, expresión de un inhibidor del complemento, expresión de un transgén citoprotector, expresión endotelial específica de dos transgenes anticoagulantes y expresión de un transgén inmunosupresor. En un aspecto específico, la expresión del transgén citoprotector también es específica del endotelio. Un inmunomodulador puede ser un inhibidor del complemento o un inmunosupresor. En aspectos específicos, el inmunomodulador es un inhibidor del complemento. El inhibidor del complemento puede ser CD46 (o MCP). En otros aspectos, el inhibidor del complemento es CD55, CD59 o CRI. En ciertos aspectos, el transgén se expresa a partir de un promotor ubicuo. En ciertos otros aspectos, el transgén se expresa a partir de un promotor activo principalmente en el endotelio. La expresión puede ser en cualquier nivel, pero en aspectos específicos, la expresión está en niveles altos. Típicamente, un nivel de expresión "alto" es suficiente para poder impartir un beneficio fenotípico o terapéutico al animal.

65 **[0093]** Un inmunomodulador también puede ser un inmunosupresor. El inmunosupresor puede ser capaz de regular negativamente una respuesta mediada por células T. En particular, el inmunosupresor puede ser CTLA4-Ig o mutantes de los mismos. En otros aspectos, el transgén inmunosupresor es un ligando que interfiere con la actividad de CD28, tal como un péptido receptor B7 o un mutante del mismo. En ciertos aspectos, el transgén se expresa a

partir de un promotor activo principalmente en el endotelio. La expresión puede ser en cualquier nivel, pero en aspectos específicos, la expresión está en niveles altos.

5 **[0094]** En otros aspectos, el inmunomodulador se puede seleccionar de entre el grupo que incluye transactivadores de clase II (CIITA) y mutantes, incluyendo mutantes dominantes negativos de los mismos (CIITA-DN), PDL1, PDL2, ligando inductor de apoptosis relacionado con factor  $\alpha$  de tumor necrosis (TRAIL), ligando Fas (FasL, CD95L) proteína asociada a integrina (CD47), HLA-E, HLA-DP, HLA-DQ o HLA-DR. En ciertos otros aspectos, el transgén se expresa a partir de un promotor activo principalmente en el endotelio. En ciertos aspectos, el transgén inmunomodulador se expresa a partir de un promotor ubicuo. La expresión puede ser en cualquier nivel, pero en  
10 aspectos específicos, la expresión está en niveles altos.

**[0095]** En un aspecto, el anticoagulante se selecciona del grupo que incluye inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), hirudina, trombomodulina, receptor endotelial de la proteína C (EPCR), y CD39. En un aspecto particular, el anticoagulante es trombomodulina. En otro aspecto particular, el anticoagulante es CD39. En ciertos otros aspectos, el transgén se expresa a partir de un promotor activo principalmente en el endotelio. La expresión puede ser en cualquier nivel, pero en aspectos específicos, la expresión está en niveles altos.

**[0096]** El transgén citoprotector puede ser un transgén anti-apoptótico, anti-oxidante o anti-inflamatorio. En ciertos aspectos, el transgén citoprotector se selecciona del grupo que incluye A20, HO-1, FAT-1, catalasa y receptor de TNF-alfa soluble (sTNFR1). En ciertos otros aspectos, el transgén se expresa a partir de un promotor activo principalmente en células endoteliales. La expresión puede ser en cualquier nivel, pero en aspectos específicos, la expresión está en niveles altos.

**[0097]** En ciertos aspectos el uno o más transgenes inmunosupresores o anticoagulantes se expresa en el endotelio de tejidos de animales GTKO de la especie porcina que expresan altos niveles de CD46. Se describen animales  
25 porcinos, tejidos y células que se derivan de animales GTKO que expresan altos niveles de CD46 y expresan trombomodulina en el endotelio. Se describen animales porcinos, tejidos y células derivadas de animales GTKO que expresan altos niveles de CD46 y expresan CD39 en el endotelio. Se describen animales porcinos, tejidos y células derivadas de animales GTKO que expresan altos niveles de CD46 y expresan CD39 y/o trombomodulina en el  
30 endotelio.

**[0098]** En algunos aspectos, el inmunomodulador tiene la secuencia de una proteína humana. En otros aspectos, el inmunomodulador tiene la secuencia de una proteína porcina. En algunos aspectos, el anticoagulante tiene la secuencia de una proteína humana. En otros aspectos, el anticoagulante tiene la secuencia de una proteína porcina.  
35 En algunos aspectos, el transgén citoprotector tiene la secuencia de una proteína porcina. En otro aspecto, el transgén citoprotector tiene la secuencia de una proteína humana. En un aspecto particular, el animal, órgano, tejido o célula porcina expresa un transgén de CD46 humano. En aspectos particulares, el animal, órgano, tejido o célula porcina expresa un transgén humano de CTLA4-Ig. En ciertos aspectos, el animal, órgano, tejido o célula porcina expresa una trombomodulina humana. En ciertos aspectos, el animal, órgano, tejido o célula porcina expresa un  
40 CD39 humano. En ciertos aspectos, el animal, órgano, tejido o célula porcina expresa un TFPI humano. En aspectos particulares, el animal, tejido o célula porcina expresa un transgén de CTLA4 porcino. Los animales, órganos, tejidos y células porcinas se describen con al menos las siguientes modificaciones genéticas: falta de expresión de GT, expresión de CD46, expresión endotelial específica de TFPI y expresión endotelial específica de CTLA4-Ig. Los animales, órganos, tejidos y células porcinas se describen con al menos las siguientes modificaciones genéticas:  
45 falta de expresión de GT, expresión de CD46, expresión endotelial específica de TFPI, expresión endotelial específica de CD39 y expresión endotelial específica de CD39. CTLA4-Ig. En un aspecto particular, el CD46 puede ser un CD46 humano. En otro aspecto particular, el CD46 humano puede expresarse a niveles elevados.

**[0099]** Los animales, órganos, tejidos y células porcinas se describen con al menos las siguientes modificaciones genéticas: falta de expresión de GT, expresión de CD46, expresión de un transgén citoprotector, expresión endotelial específica de trombomodulina y expresión endotelial específica de CTLA4-Ig. Los animales, tejidos y células porcinas se describen con al menos las siguientes modificaciones genéticas: falta de expresión de GT, expresión de CD46, expresión de un transgén citoprotector, expresión endotelial específica de trombomodulina, expresión endotelial específica de CD39 y expresión específica endotelial de CTLA4-Ig.  
50  
55

**[0100]** Los animales porcinos, órganos, tejidos y células porcinas se describen con al menos las siguientes modificaciones genéticas: falta de expresión de GT, expresión de CD46, expresión endotelial específica de trombomodulina y/o CD39, y expresión de CIITA.

**[0101]** Los animales porcinos, tejidos y células se describen con al menos las siguientes modificaciones genéticas: falta de expresión de GT, expresión de CD46, expresión de DAF, expresión endotelial específica de trombomodulina y/o CD39 y expresión de CIITA. Al menos un transgén anticoagulante se expresa a partir de un promotor activo principalmente en células endoteliales (EC) ("promotores específicos del endotelio"). Los promotores específicos del endotelio descritos aquí incluyen, pero no se limitan a: molécula de adhesión de células vasculares I (VCAM-1), factor de von Willebrand (vWF), sintetasa de óxido nítrico endotelial (eNOS), quinasa de tirosina (Tie), quinasa-I de tirosina de tipo aleta (FLT-I), receptor del dominio quinasa (KDR/flk-1), molécula de adhesión intercelular-2 (ICAM-2)  
60  
65

y endoglina. (Por ejemplo, todos revisados (para uso en vectores de transferencia de genes adenovirales) por Beck et al., *Current Gene Therapy*, 2004, 4, 457-467, Tabla 2A.) Otros promotores que pueden usarse para la expresión de transgenes en la vasculatura incluyen, pero no se limitan a, promotor de CD31 (molécula de adhesión de células endoteliales de plaquetas [PECAM]), E-selectina, promotor de pre-proendotelina-1 (PPE-1) (véase, por ejemplo, patente de EE.UU. N° 5.747.340 y publicación de patente de EE.UU. N° 2007/0286845) y LDL LOX-I (White et al., *Gene Ther.* 2008 Mar; 15 (5): 340-6; que se dirige a la vasculatura arterial). El promotor de CD31 (molécula de adhesión a células endoteliales de plaquetas [PECAM]) limita la expresión a células endoteliales, monocitos y plaquetas y se ha utilizado para dirigir hirudina y TFPI al endotelio activado en ratones transgénicos (Chen et al., *Blood*, 2004 Sep 1; 104 (5): 1344-9). También se incorporan aquí promotores de células de músculo liso (SMC), que localizan la expresión transgénica en la capa de músculo liso de los vasos sanguíneos, muy cerca del endotelio vascular (para una lista de promotores SMC, véase, por ejemplo, Beck et al., véase la Tabla 2B).

**[0102]** En ciertos aspectos, el promotor es un promotor específico de endotelio que incluye, pero no se limita al promotor Tie-2, el promotor ICAM-2 o el promotor PECAM. Los promotores descritos en este documento pueden ser de un animal vertebrado, que incluyen, pero no se limitan a, promotores de peces o mamíferos tales como tilapia, humano, cerdo, rata o ratón. En aspectos específicos, el promotor es un promotor ICAM-2 de un animal vertebrado, que incluye pero no se limita a promotores de peces o mamíferos tales como tilapia, ser humano, cerdo, rata o ratón. En aspectos específicos, el promotor es el promotor Tie-2 de ratón. En aspectos específicos, el promotor es el promotor ICAM-2 porcino. Se pueden incorporar elementos reguladores adicionales en el sistema de expresión del transgén, que incluyen elementos potenciadores. El potenciador puede ser un potenciador endotelial específico. Los potenciadores se pueden seleccionar, entre otros, de los siguientes: el potenciador Tie-2; el potenciador de ICAM-2; el potenciador PECAM, el potenciador pdx-1 y el potenciador de actina de pollo. El potenciador puede ser, por ejemplo, un potenciador pdx-1 o un potenciador de actina de pollo, o puede ser un elemento aislante, por ejemplo, un aislante de beta-globina de pollo para una expresión mejorada del transgén (Chung J.H., Bell C.A., Felsenfeld G., *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 1997 enero 21; 94 (2): 575 - 80). En aspectos específicos, el elemento potenciador utilizado es el potenciador Tie-2. En aspectos específicos, el promotor se usa en combinación con un elemento potenciador que es una región no codificadora o intrónica del ADN intrínsecamente asociada o localizada conjuntamente con el promotor. Los aspectos específicos particulares incluyen: el promotor Tie-2 combinado con el enganche Tie-2; el promotor ICAM-2 combinado con el potenciador ICAM-2; el promotor PECAM con el potenciador PECAM; y/o cualquier promotor divulgado aquí combinado con su elemento potenciador intrínsecamente asociado.

**[0103]** Como se usa en el presente documento, los términos "específico a endotelial", "expresión del transgén específico en el tejido endotelial", "específicamente expresa al menos un transgén en tejido endotelial" y similares, se entiende que estos términos se refieren a un transgén bajo control de un elemento regulador endotelial específico que permite la expresión restringida de un transgén en tejido y/o células endoteliales. La función y expresión transgénicas está restringida al tejido y/o células endoteliales.

**[0104]** "Elemento regulador endotelial específico" y similares se refieren a un promotor, potenciador o una combinación de los mismos en donde el promotor, potenciador o una combinación de los mismos conduce a la expresión restringida de un transgén en tejido y/o células endoteliales. El elemento regulador proporciona la función y expresión transgénicas restringidas al tejido y/o células endoteliales. La expresión del anticoagulante está restringida al endotelio y no está presente en otros tejidos porcinos. Para analizar la expresión específica de tejido, un experto en la materia puede usar técnicas para determinar el patrón de expresión relativa en células y tejidos endoteliales frente a otros tejidos y células. En un aspecto, la inmunohistoquímica puede usarse para analizar la expresión específica endotelial. En otro aspecto, habrá tinción inmunohistoquímica de las células que contienen el transgén bajo el control de elementos reguladores específicos del endotelio, mientras que las células sin el transgén no mostrarán la tinción. En otro aspecto, la PCR en tiempo real puede usarse para analizar la expresión específica endotelial. En un aspecto, el número de copias de ADN amplificado a partir del ARN total de células que contienen el transgén bajo el control de elementos reguladores específicos del endotelio será al menos un logaritmo mayor que las células sin el transgén. En otro aspecto, la citometría de flujo se puede usar para analizar la expresión específica endotelial. En un aspecto, la intensidad de fluorescencia de las células que contienen el transgén bajo control de elementos reguladores endoteliales específicos será de aproximadamente 95-100%, mientras que la intensidad de fluorescencia de las células sin el transgén será de aproximadamente 0-5%.

**[0105]** Además, la expresión puede estar presente en tejidos fetales, neonatales y maduros, cada uno de los cuales puede ser una fuente de material donante. En aspectos particulares, las células, y especialmente las células endoteliales, se derivan de un animal porcino transgénico y, en particular, un porcino transgénico que ha crecido hasta un tamaño suficiente para ser útil como donante. En ciertos aspectos, los animales sobreviven después de la edad de destete. En aspectos específicos, los animales tienen al menos seis meses de edad. En ciertos aspectos, el animal sobrevive para alcanzar la edad de crianza. En ciertos aspectos, el animal es un animal porcino de al menos 300 libras.

**[0106]** Se describe aquí un método para el tratamiento o la profilaxis de la disfunción orgánica que incluye administrar tejidos, órganos o células porcinas donantes a un hospedador que padece disfunción orgánica, en donde el material donante porcino exhibe al menos un transgén anticoagulante.

**[0107]** También se describe un método para el tratamiento o profilaxis de la córnea o la disfunción de retina incluyendo la administración de las células endoteliales de la córnea porcina donante a un huésped que padece la enfermedad del ojo, incluyendo córnea o disfunción retina, en donde las exposiciones de material donante porcino expresan al menos un transgén anticoagulante.

**[0108]** En una realización, el órgano donado es un corazón porcino. En otra realización, el órgano donado es un riñón porcino. En otra realización, el órgano donado es un pulmón porcino. En otra realización, el órgano donador es un hígado porcino. Las células del donante pueden ser células derivadas de hígado porcino, cortes de tejido hepático; o células hepáticas aisladas. En un aspecto particular, las células del donante son hepatocitos porcinos. En un aspecto particular, pueden usarse hepatocitos porcinos o cortes de tejido hepático porcino en un dispositivo médico.

**[0109]** En un aspecto particular, las células del donador porcino son células endoteliales de la córnea o la retina usadas como un injerto para tratar la disfunción de la córnea o la retina.

**[0110]** En otro aspecto particular, los tejidos del donante son vasos sanguíneos porcinos o tejidos vasculares usados como un injerto, para tratar enfermedades o defectos vasculares.

**[0111]** En un aspecto particular adicional, las células de donantes porcinos son células endoteliales usadas para sembrar injertos vasculares, o se pueden usar para sembrar durante procedimientos coronarios, tales como colocación de stents o cirugía de derivación. Los materiales de injerto vascular pueden ser aloinjertos (de origen humano) o dispositivos de bioingeniería, o cualquier otro material utilizado como injerto vascular.

**[0112]** En otros aspectos, las células proporcionadas en este documento pueden usarse en procedimientos de retransplante.

**[0113]** Aquí se describen métodos para tratar o prevenir la disfunción orgánica en primates que implican administración de los órganos, tejidos o células de la presente invención a los primates que lo necesitan. En una realización, el primate es un primate no humano, en un ejemplo no limitante, un mono. En otra realización, el primate es un ser humano. En realizaciones adicionales, los animales también pueden contener modificaciones genéticas para expresar un inmunomodulador. El inmunomodulador puede ser un gen inhibidor de la ruta del complemento y en realizaciones particulares se selecciona de CD55, CD59, CR1 y CD46 (MCP). El inhibidor del complemento puede ser CD46 humano (hCD46) en el que la expresión es a través de una construcción de minigenos (Véase Loveland et al., Xenotransplantation, 11 (2): 171-183. 2004). El inmunomodulador también puede ser un gen inmunosupresor que tiene un efecto modulador de células T, como CTLA4-Ig, o un inhibidor dominante negativo (regulador a la baja) del MHC de clase II (CIITA) u otros genes que modulan la expresión. de la función inmune mediada por células B o células T Recientemente se han producido cerdos transgénicos que expresan un mutante negativo dominante CIITA dirigido por un promotor CAG y se ha demostrado que tienen una expresión de SLA clase II regulada por disminución (después de estimulación con citocina) y una respuesta de células T humanas reducida (véase Hara et al., 2010 Am. J Transplant 2010 (Suplemento 4); 10: 187 (Abstract 503). En otras realizaciones, tales animales pueden modificarse adicionalmente para eliminar la expresión de genes que afectan a la función inmune.

**[0114]** En aspectos adicionales, los animales porcinos también pueden contener modificaciones genéticas para expresar un anticoagulante. El anticoagulante puede incluir, pero no se limita a, TFPI, hirudina, trombomodulina, EPCR y CD39. Además, los animales pueden modificarse genéticamente para inhibir la expresión de un CMP-Neu5Ac gen de hidroxilasa (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de Estados Unidos 2005-0223418), el gen de iGb3 sintasa (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de Estados Unidos 2005-0155095), y/o el gen de sintasa de Forsman (véase, por ejemplo, Patente de EE.UU. Publicación 2006-006 8479). Además, los animales pueden modificarse genéticamente para reducir la expresión de un procoagulante. En particular, en un aspecto, los porcinos están genéticamente modificados para reducir o eliminar la expresión de un gen procoagulante como el FGL2 (proteína de tipo fibrinógeno 2) (véase, por ejemplo, Marsden, et al., (2003) J din Invest. 112: 58 - 66; Ghanekar, y col. (2004) J Immunol. 172: 5693 - 701; Mendicino, y col. (2005) Circulation.112: 248 - 56; Mu, et al. (2007) Physiol. Genomics. 31 (1): 53 - 62). Cuando se expresa un transgen, esta expresión puede ser a través de un promotor ubicuo o específico de tejido y puede incluir elementos reguladores adicionales tales como potenciadores, aislantes, regiones de unión a matriz (MAR) y similares.

**[0115]** Para lograr estas modificaciones genéticas adicionales, en un aspecto, las células aisladas de un cerdo genéticamente modificado se pueden modificar adicionalmente para contener múltiples modificaciones genéticas. Estas células pueden usarse como donantes para producir cerdos con múltiples modificaciones genéticas mediante transferencia nuclear. En otros aspectos, los animales genéticamente modificados se pueden criar juntos para lograr múltiples modificaciones genéticas.

***Transgenes para apuntar al rechazo humeral agudo***

**[0116]** El xenoinjerto actualmente se ve obstaculizado por los problemas de rechazo graves y bien documentados. Este proceso se puede dividir en distintas etapas, la primera de las cuales ocurre minutos después del trasplante y

se llama "rechazo hiperagudo" (HAR). HAR se define por la presencia ubicua de altos títulos de anticuerpos naturales preformados que se unen al tejido extraño. Se cree que la unión de estos anticuerpos naturales a los epítomos diana en el endotelio del tejido del donante es el evento iniciador en HAR. Esta unión, minutos después de la perfusión del tejido del donante con la sangre receptora, es seguida por la activación del complemento, deposición de plaquetas y fibrina, y finalmente por edema intersticial y hemorragia en el órgano del donante, que provocan el rechazo del tejido en el receptor (Strahan y otros (1996) *Frontiers in Bioscience* 1, e34-41). El curso primario de HAR en humanos es el anticuerpo natural anti-Gal que comprende aproximadamente el 1% de anticuerpos en humanos y monos.

**[0117]** Este rechazo hiperagudo inicial está entonces reforzado por la respuesta vascular retardado (también conocido como rechazo agudo de xenoinjerto humoral (AHXR), xenorechazo vascular agudo (AVXR) o retardado rechazo de xenoinjerto (DXR)). La lisis y la muerte de las células endoteliales durante la respuesta hiperaguda se acompañan de edema y la exposición de las células adventicias, que expresan constitutivamente el factor tisular (TF) en su superficie. Se cree que el factor tisular es fundamental en el inicio de la cascada de coagulación in vivo, y su exposición al plasma desencadena las reacciones de coagulación. La trombina y el TNF-alfa se localizan alrededor del tejido dañado y esto induce una mayor síntesis y expresión de TF por las células endoteliales.

**[0118]** El entorno alrededor de las células endoteliales en reposo no favorece la coagulación. Varios inhibidores de la coagulación natural están asociados con los proteoglicanos extracelulares de las células endoteliales, como el inhibidor de la vía del factor tisular, la antitrombina III y la trombomodulina. El reconocimiento del tejido extraño por anticuerpos naturales xenorreactivos (XNA), sin embargo, causa la pérdida de estas moléculas.

**[0119]** Junto con la exposición y la inducción del factor tisular, el entorno anticoagulante alrededor de las células endoteliales se convierte así en procoagulante. Las regiones vascularizadas del xenoinjerto se convierten así en sitios de coágulos de sangre, una característica del tejido dañado. El flujo sanguíneo se altera y el órgano trasplantado se vuelve isquémico. Una descripción más completa de retraso en el rechazo vascular se puede encontrar en Bach et al. (1996) *Immunol Today*. 1996 Aug; 17 (8): 379-84.

**[0120]** La presente invención proporciona órganos, tejidos o células que pueden ser utilizadas en los xenotrasplantes para producir niveles bajos o nulos de uno o más de los siguientes: HAR, AHXR/AVXR/DXR y/o ACXR. Los órganos, tejidos o células pueden usarse en xenotrasplantes para producir niveles bajos o nulos de HAR y AHXR/AVXR. Los órganos, tejidos o células pueden usarse en xenotrasplantes para producir niveles bajos o nulos de HAR, AHXR/AVXR y ACXR. Los aspectos de la descripción incluyen diversas combinaciones de expresión reguladora del complemento, expresión inmunosupresora, expresión de anticoagulante, y/o expresión funcional aGT parcialmente o completamente disminuida en el tejido del donante.

**[0121]** En un aspecto, los animales porcinos, así como los órganos, tejidos y células de los mismos, se describen en la presente memoria y expresan uno o más transgenes. En otro aspecto, los animales porcinos, así como los órganos, tejidos y células de los mismos, se describen aquí y expresan uno o más transgenes seleccionados de entre los siguientes: al menos dos transgenes, al menos tres transgenes, al menos cuatro transgenes, al menos cinco transgenes, al menos seis transgenes, al menos siete transgenes y al menos ocho transgenes. Las células de los animales porcinos descritos en este documento pueden provocar una respuesta inmune disminuida por linfocitos humanos (ensayo de MLR) a dichas células porcinas. En otro aspecto, se muestra que las células que expresan transgenes inhiben la coagulación y la trombosis que se produce en el entorno del xenoinjerto.

### **Alfa 1,3 Galactosiltransferasa (aGT)**

**[0122]** Como se señaló anteriormente, el curso principal de HAR en los seres humanos es el anticuerpo natural, anti-galactosa alfa 1,3-galactosa (Gal), que comprende aproximadamente el 1% de los anticuerpos IgG en seres humanos y monos. Con la excepción de los monos, simios y humanos del Viejo Mundo, la mayoría de los mamíferos portan glicoproteínas en sus superficies celulares que contienen el epítipo Gal (Galili y col., *J. Biol. Chem.* 263: 17755-17762, 1988). Los seres humanos, simios y monos del viejo mundo no expresan Gal, sino que producen en grandes cantidades un anticuerpo anti-Gal de origen natural que causa una reacción hiperaguda inmediata tras el xenotrasplante en humanos de tejidos de animales que portan el epítipo Gal (Sandrin et al., *Proc. Natl Acad Sci EE.UU.* 1993 Dic 1; 90 (23): 11391 - 5, 1993; revisión por Sandrin y McKenzie, *Immunol Rev.* 1994 Oct; 141: 169 - 90).

**[0123]** Una variedad de estrategias se han aplicado para eliminar o modular la respuesta humoral anti-Gal causada por xenotrasplante, incluyendo la eliminación enzimática del epítipo con alfa-galactosidasas (Stone et al, *Transplantation*. 63: 640-645, 1997), eliminación específica de anticuerpo anti-gal (Ye et al., *Transplantation* 58: 330-337, 1994), tapado del epítipo con otros restos de carbohidrato, que no pudieron eliminar la expresión de aGT (Tanemura y col., *J. Biol. Chem.* 27321: 16421-16425, 1998 y Koike et al., *Xenotransplantation* 4: 147-153, 1997) y la introducción de proteínas inhibitoras complementarias (Dalmasso et al., *Clin.Exp.Immunol.* 86: 31-35), 1991, Dalmasso et al. *Transplantation* 52: 530 - 531 (1991)). C. Costa et al. (*FASEB J* 13, 1762 (1999)) informaron que la inhibición competitiva de aGT en cerdos transgénicos da como resultado solo una reducción parcial en los números de epítomos. Del mismo modo, S. Miyagawa et al. (*J. Biol. Chem* 276, 39310 (2000)) informaron que los intentos de

bloquear la expresión de epítomos gal en cerdos transgénicos N-acetilglucosaminiltransferasa III también dieron como resultado una reducción parcial de los números de epítomos gal y no extendieron significativamente la supervivencia del injerto en receptores de primates.

5 **[0124]** Se informaron de eliminaciones de alelos de un solo alelo del locus  $\alpha$ GT en células porcinas y animales vivos. Denning et al. (Nature Biotechnology 19: 559-562, 2001) informaron de la eliminación del gen diana de un alelo del gen  $\alpha$ GT en ovejas. Harrison et al. (Transgenic Research 11: 143-150, 2002) representó la producción de células de fibroblastos fetales porcinos somáticos heterocigotos  $\alpha$ GT. En 2002, Lai et al. (Science 295: 1089 - 1092, 2002) y Dai et al. (Nature Biotechnology 20: 251-255, 2002) informó de la producción de cerdos, en donde un alelo del gen  $\alpha$ GT se hizo con éxito inactivo. Ramsoondar et al. (Biol of Reproduc 69, 437-445 (2003)) informaron de la generación de cerdos heterocigóticos knockout  $\alpha$ GT que también expresan alfa-1,2-fucosiltransferasa (HT) humana, que expresaba los epítomos HT y  $\alpha$ GT. La publicación PCT N° WO 03/055302 para The Curators de la Universidad de Missouri confirma la producción de cerdos miniatura knockout  $\alpha$ GT heterocigotos para uso en xenotrasplantes en los que la expresión de  $\alpha$ GT funcional en el cerdo knock out se reduce en comparación con el tipo silvestre.

15 **[0125]** La Publicación PCT N° WO 94/21799 y la patente de EE.UU. N° 5,821,117 para el Austin Research Institute; La publicación PCT N° WO 95/20661 de Bresatec; y la publicación PCT N° WO 95/28412, la patente de EE.UU. N° 6.153.428, la patente de los EE.UU. N° 6.413.769 y la publicación EE.UU. N° 2003/0014770 de BioTransplant, Inc. y The General Hospital Corporation proporcionan una discusión de la producción de células porcinas  $\alpha$ GT negativas basadas en el ADNc del gen  $\alpha$ GT.

20 **[0126]** Un avance reciente importante en el campo de los xenotrasplantes fue la producción de los primeros cerdos vivos que carecen de cualquier expresión funcional de  $\alpha$ GT (Phelps et al Science 299: 411-414 (20 03); véase también la publicación PCT N° WO 04/028243 de Revivicor, Inc. y la publicación PCT N° WO 04/016742 de Immerge Biotherapeutics, Inc.).

25 **[0127]** Se desvelan animales, tejidos y células que carecen de expresión de  $\alpha$ GT (GTKO) funcional y expresan al menos un transgén adicional en el endotelio. El transgen adicional se selecciona típicamente de: 1) un inmunomodulador que incluye un inhibidor del complemento (es decir, CD46 (MCP), CD55, CD59, CRI y similares) o un inmunosupresor (es decir, CTLA-4, B7 y similares) o 2) un anticoagulante (es decir, TFPI, hirudina, trombomodulina, EPCR, CD39 y similares). También se describen animales, tejidos y células que carecen de cualquier expresión de  $\alpha$ GT funcional y expresan tanto al menos un inmunomodulador como al menos un anticoagulante en el endotelio. Animales, tejidos y células con un nivel reducido de expresión de  $\alpha$ GT funcional que expresan concurrentemente al menos uno de los siguientes en el endotelio: 1) un inmunomodulador que incluye un inhibidor de complemento (es decir, CD46, CD55, CD59, CRI y similares) o un inmunosupresor (es decir, CTLA-4, B7 y similares) o 2) un anticoagulante (es decir, TFPI, hirudina, trombomodulina, EPCR, CD39 y similares) son también divulgados. Se describen animales, tejidos y células que tienen un nivel reducido de expresión de  $\alpha$ GT funcional y expresan al menos un inmunomodulador y al menos un anticoagulante en el endotelio. El nivel de expresión completo o reducido de  $\alpha$ GT funcional se puede lograr por cualquier medio conocido por un experto en la técnica. Se describen animales porcinos en los que un alelo del gen  $\alpha$ GT se inactiva a través de un evento de dirección genética. Se describen animales porcinos en los que ambos alelos del gen  $\alpha$ GT se inactivan a través de un evento de dirección genética. En un aspecto, el gen puede ser dirigido a través de recombinación homóloga. En otros aspectos, el gen puede romperse, es decir, una porción del código genético puede alterarse, afectando de ese modo la transcripción y/o traducción de ese segmento del gen. Por ejemplo, la interrupción de un gen puede ocurrir a través de técnicas de sustitución, eliminación ("knock-out") o inserción ("knock-in"). Se pueden insertar genes adicionales para una proteína deseada o secuencia reguladora que modulan la transcripción de una secuencia existente.

30 **[0128]** Los alelos del gen  $\alpha$ GT pueden volverse inactivos, de tal manera que la enzima  $\alpha$ GT resultante ya no puede generar Gal en la superficie celular. En un aspecto, el gen  $\alpha$ GT puede transcribirse en ARN, pero no traducirse en proteína. En otro aspecto, el gen  $\alpha$ GT puede transcribirse en una forma truncada. Tal ARN truncado no puede traducirse o puede traducirse en una proteína no funcional. En un aspecto alternativo, el gen  $\alpha$ GT puede inactivarse de tal forma que no se produzca la transcripción del gen. En un aspecto adicional, el gen  $\alpha$ GT se puede transcribir y luego traducir a una proteína no funcional. En algunos aspectos, la expresión de  $\alpha$ GT activa puede reducirse mediante el uso de métodos alternativos, tales como los dirigidos a la transcripción o traducción del gen. Por ejemplo, la expresión puede reducirse mediante el uso de ARN antisentido o ARNsi dirigidos al gen  $\alpha$ GT nativo o a un ARNm del mismo. En otros aspectos, las recombinasas específicas de sitio se usan para dirigirse a una región del genoma para recombinación. Ejemplos de tales sistemas son el sistema CRE-lox y los sistemas Flp-Frt.

35 **[0129]** Los cerdos que poseen dos alelos inactivos del gen  $\alpha$ GT no son de origen natural. Anteriormente se descubrió que al intentar eliminar el segundo alelo del gen  $\alpha$ GT a través de una vía de selección genética, se identificó una mutación puntual que impedía que el segundo alelo produjera la enzima  $\alpha$ GT funcional. Por lo tanto, el gen  $\alpha$ GT puede volverse inactivo a través de al menos una mutación puntual. En un aspecto, un alelo del gen  $\alpha$ GT puede volverse inactivo a través de al menos una mutación puntual. En otro aspecto, ambos alelos del gen  $\alpha$ GT pueden volverse inactivos a través de al menos una mutación puntual. En un aspecto, esta mutación puntual puede ocurrir a través de un evento de orientación genética. En otro aspecto, esta mutación puntual puede ser natural. En

un aspecto adicional, las mutaciones se pueden inducir en el gen  $\alpha$ GT a través de un agente mutagénico.

[0130] En un aspecto específico, la mutación puntual puede ser una mutación T-a-G en la segunda base del exón 9 del gen  $\alpha$ GT. Los cerdos portadores de una mutación puntual natural en el gen  $\alpha$ GT permiten la producción de cerdos con deficiencia de  $\alpha$ GT libres de genes de resistencia a antibióticos y, por lo tanto, tienen el potencial de hacer un producto más seguro para uso humano. En otros aspectos, pueden existir al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos diez o al menos veinte mutaciones puntuales para volver inactivo el gen  $\alpha$ GT. En otros aspectos, los cerdos se dan a conocer en donde ambos alelos del gen  $\alpha$ GT contienen mutaciones puntuales que evitan cualquier expresión de enzima  $\alpha$ GT funcional. En un aspecto específico, se describen cerdos que contienen la mutación T-a-G en la segunda base del exón 9 en ambos alelos del gen  $\alpha$ GT.

[0131] Se divulga aquí un animal porcino, en el que ambos alelos del gen de  $\alpha$ GT se inactivan, donde un alelo se inactiva por un evento de dirección genética y el otro alelo se inactiva a través de una mutación. En un aspecto, se describe un animal porcino, en el que ambos alelos del gen  $\alpha$ GT se inactivan, por lo que un alelo se inactiva por un evento genético objetivo y el otro alelo se inactiva debido a la presencia de un punto T-a-G mutación en la segunda base del exón 9. En un aspecto específico, se describe un animal porcino, en el que ambos alelos del gen  $\alpha$ GT se inactivan, por lo que un alelo se inactiva a través de una construcción dirigida dirigida al exón 9 y el otro alelo es inactivado debido a la presencia de una mutación de punto T a G en la segunda base del exón 9.

## 20 **Immunomoduladores**

[0132] Los inmunomoduladores pueden ser reguladores del complemento e inmunosupresores.

### 25 **(i) Reguladores de complemento**

[0133] El complemento es el término colectivo para una serie de proteínas sanguíneas y es un mecanismo efector principal del sistema inmune. La activación del complemento y su depósito en las estructuras diana puede conducir a una lisis celular directa mediada por el complemento o puede conducir indirectamente a la destrucción celular o tisular debido a la generación de potentes moduladores de la inflamación y al reclutamiento y activación de células efectoras inmunes. Los productos de activación del complemento que median la lesión tisular se generan en diversos puntos de la ruta del complemento. La activación inapropiada del complemento en el tejido del huésped juega un papel importante en la patología de muchas enfermedades autoinmunes e inflamatorias, y también es responsable de muchos estados de enfermedad asociados con la bioincompatibilidad, por ejemplo, la inflamación post-cardiopulmonar y el rechazo de trasplantes. La deposición de los complementos en las membranas de las células huésped se previene mediante proteínas inhibitoras del complemento expresadas en la superficie celular.

[0134] El sistema del complemento comprende una colección de aproximadamente 30 proteínas y es uno de los principales mecanismos efectores del sistema inmune. La cascada del complemento se activa principalmente a través de las vías clásica (generalmente dependiente de anticuerpos) o alternativa (generalmente independiente de anticuerpos). La activación a través de cualquiera de las rutas conduce a la generación de convertasa C3, que es el complejo enzimático central de la cascada. La convertasa C3 escinde el suero C3 en C3a y C3b, el último de los cuales se une covalentemente al sitio de activación y conduce a la generación posterior de convertasa C3 (ciclo de amplificación). El producto de activación C3b (y también C4b generado únicamente a través de la vía clásica) y sus productos de degradación son opsoninas importantes y participan en la promoción de la lisis mediada por células de células diana (por fagocitos y células NK) así como del transporte y solubilización de complejos inmunes. Los productos de activación C3/C4 y sus receptores en diversas células del sistema inmune también son importantes para modular la respuesta inmune celular. Las convertasas C3 participan en la formación de convertasa C5, un complejo que escinde C5 para producir C5a y C5b. C5a tiene poderosas propiedades proinflamatorias y quimiotácticas y puede reclutar y activar células efectoras inmunes. La formación de C5b inicia la ruta del complemento terminal que da como resultado el ensamblaje secuencial de las proteínas del complemento C6, C7, C8 y (C9)<sub>n</sub> para formar el complejo de ataque a la membrana (CAM o C5b-9). La formación de CAM en una membrana celular diana puede dar como resultado una lisis celular directa, pero también puede provocar la activación celular y la expresión/liberación de diversos moduladores inflamatorios.

[0135] Existen dos amplias clases de inhibidores del complemento de membrana: inhibidores de la vía de activación del complemento (inhiben la formación de convertasa C3) e inhibidores de la vía del complemento terminal (inhiben la formación de CAM). Los inhibidores de membrana de la activación del complemento incluyen el receptor 1 del complemento (CR1), el factor acelerador de la descomposición (DAF o CD55) y la proteína del cofactor de la membrana (MCP o CD46). Todos ellos tienen una estructura proteica que consiste en un número variable de unidades repetitivas de aproximadamente 60-70 aminoácidos denominados repeticiones cortas de consenso (SCR) que son una característica común de las proteínas de unión C3/C4. Se han identificado homólogos de roedores de los inhibidores de la activación del complemento humano. La proteína Cr1 de roedor es un inhibidor ampliamente distribuido de la activación del complemento que funciona de manera similar a DAF y MCP. Los roedores también expresan DAF y MCP, aunque Cr1 parece ser funcionalmente el regulador más importante de la activación del complemento en roedores. Aunque no existe un homólogo de Cr1 encontrado en humanos, el estudio de Cr1 y su uso en modelos animales es clínicamente relevante.

**[0136]** El control de la ruta del complemento terminal y la formación de CAM en las membranas de las células hospedadoras se produce principalmente a través de la actividad de CD59, una glicoproteína de 20 kD ampliamente distribuida unida a las membranas plasmáticas por un ancla de glucosilfosfatidilinositol (GPI). CD59 se une a C8 y C9 en el ensamblaje de CAM y evita la inserción de la membrana.

**[0137]** Las células hospedadoras están protegidas de su propio complemento por proteínas reguladoras del complemento unidas a la membrana como DAF, MCP y CD59. Cuando un órgano se trasplanta a otra especie, los anticuerpos naturales en el receptor se unen al endotelio del órgano del donante y activan el complemento, iniciando así el rechazo rápido. Se ha sugerido previamente que, a diferencia de las células humanas, las del cerdo son muy susceptibles al complemento humano, y se pensó que esto se debía a que las proteínas reguladoras del complemento de la superficie de la célula de cerdo son ineficaces contra el complemento humano. Cuando un órgano se trasplanta a otra especie, los anticuerpos naturales en el receptor se unen al endotelio del órgano del donante y activan el complemento, iniciando así el rechazo rápido. Se han demostrado varias estrategias para prevenir o retrasar el rechazo, incluida la eliminación de anticuerpos IgM naturales y la descomplementación sistémica o la inhibición del complemento utilizando sCR1, heparina o inhibidor de C1.

**[0138]** Un enfoque alternativo al problema del rechazo consiste en expresar moléculas humanas, unidas a la membrana, reguladoras del complemento en cerdos transgénicos. Se han generado cerdos transgénicos que expresan el factor de aceleración de desintegración DAF (CD55), proteína co-factor de membrana MCP (CD46) e inhibidor de membrana de lisis reactiva, MIRL (CD59) (véase Klymchuk et al. Mol Reprod Dev (2010) 77: 209-221). Se ha demostrado que estos inhibidores humanos se expresan abundantemente en el endotelio vascular porcino. La perfusión ex vivo de corazones de animales control con sangre humana provocó la destrucción mediada por el complemento del órgano en minutos, mientras que los corazones obtenidos de animales transgénicos eran refractarios al complemento y sobrevivieron durante horas.

**[0139]** La justificación para la expresión de proteínas reguladoras del complemento humanas en los órganos de cerdo para "humanizar" como se indica más arriba se basa en la suposición de que las proteínas reguladoras del cerdo endógeno son ineficientes en la inhibición del complemento humano y por lo tanto contribuirá poco a la supervivencia del órgano en el contexto de xenotrasplante. La Patente de los EE.UU. 7.462.466 de Morgan et al. describe el aislamiento y la caracterización de análogos porcinos de varias de las proteínas reguladoras del complemento humano (CRP). Los estudios ilustraron que los órganos de cerdo que expresan moléculas de proteínas reguladoras del complemento humano eran resistentes al daño del complemento no porque expresaran moléculas de CRP humanas, sino porque expresaban cantidades mucho mayores de moléculas de CRP funcionales. Morgan et al. encontraron que la expresión incrementada de CRP porcina podría ser igualmente efectiva para proteger el órgano del donante del daño del complemento que conduce al rechazo hiperagudo como órganos donantes que expresan proteínas reguladoras del complemento humano.

**[0140]** El CD46 se ha caracterizado como una proteína con propiedades reguladoras capaces de proteger a la célula hospedadora contra ataques mediados por complemento activados a través de vías tanto clásicas como alternativas (Barilla-LaBarca, M. L. y col., J. Immunol. 168, 6298-6304 (2002)). hCD46 puede ofrecer protección contra la lisis del complemento durante la inflamación y el rechazo humoral mediado por bajos niveles de anticuerpos naturales o inducidos anti-Gal o anti-nonGal. Los cerdos transgénicos con la combinación de GTKO y expresión de CD46 proporcionaron supervivencia prolongada y función de corazones de xenoinjerto (cerdo a babuino) durante hasta 8 meses sin ninguna evidencia de rechazo inmunitario (Mohiuddin et al., Abstract TTS-1383. Transplantation 2010; 90 (supl): 325). Se describen animales porcinos, órganos, tejidos y células que expresan al menos un regulador de complemento y carecen de cualquier expresión de aGT funcional o expresan al menos uno de los siguientes en el endotelio:

1) un inmunosupresor (es decir, CTLA-4, B7 y similares) o 2) un anticoagulante (es decir, TFPI, hirudina, trombomodulina, EPCR, CD39 y similares). También se describen animales porcinos, órganos, tejidos y células que expresan al menos un regulador del complemento, carecen de expresión de aGT funcional y expresan al menos uno de los siguientes en el endotelio: 1) un inmunosupresor (es decir, CTLA-4, B7 y similares) o 2) un anticoagulante (es decir, TFPI, hirudina, trombomodulina, EPCR, CD39 y similares). También se describen animales, órganos, tejidos y células porcinos que expresan al menos un regulador del complemento, carecen de cualquier expresión de aGT funcional, expresan al menos un inmunosupresor (es decir, CTLA-4, B7 y similares) y expresan al menos un anticoagulante (es decir, TFPI, hirudina, trombomodulina, EPCR, CD39 y similares) en el endotelio. El regulador del complemento puede ser un inhibidor del complemento. El inhibidor del complemento puede ser un inhibidor de complemento de membrana. El inhibidor del complemento de membrana puede ser un inhibidor de la vía de activación del complemento (inhibir la formación de convertasa C3) o un inhibidor de la vía del complemento terminal (inhibir la formación de CAM). Los inhibidores de membrana de la activación del complemento incluyen el receptor 1 del complemento (CRI), el factor acelerador de la descomposición (DAF o CD55), la proteína de cofactor de la membrana (MCP o CD46) y similares. Los inhibidores de membrana de la ruta del complemento terminal pueden incluir CD59 y similares. En los casos en que se expresan reguladores del complemento, se pueden expresar dos o más reguladores del complemento diferentes.

**[0141]** Los reguladores del complemento pueden ser reguladores del complemento humano. Los reguladores del

complemento pueden ser reguladores del complemento porcino.

**[0142]** En un aspecto particular de la divulgación, el inhibidor del complemento (por ejemplo, CD46 o DAF) se expresa en cada célula donde normalmente se expresaría. En otra realización, el inhibidor del complemento se expresa de manera ubicua.

**[0143]** En una realización, los animales, órganos, tejidos o células descritas en la presente memoria pueden modificarse para expresar transgénicamente uno o más reguladores del complemento. Los animales, órganos, tejidos o células pueden modificarse para expresar un péptido regulador del complemento, un fragmento biológicamente activo o un derivado del mismo. En un aspecto, el péptido regulador del complemento es el regulador de complemento de longitud completa. En un aspecto adicional, el péptido regulador del complemento puede contener menos que la proteína reguladora del complemento de longitud completa.

**[0144]** Cualquier secuencia reguladora del complemento humano o porcino o parte biológicamente activa o fragmento de la misma conocida por los expertos en la técnica puede estar de acuerdo con las composiciones y métodos descritos en este documento. Se puede usar cualquier péptido regulador de complemento consenso de acuerdo con la presente descripción. Se puede usar cualquier fragmento u secuencia homóloga que muestre actividad similar como regulador del complemento.

## **(ii) Inmunosupresores**

**[0145]** Un transgén "inmunosupresor" es capaz de regular negativamente una respuesta inmune. Para cualquier tipo de procedimiento de trasplante, un equilibrio entre la eficacia y la toxicidad es un factor clave para su aceptación clínica.

**[0146]** Los agentes biológicos que bloquean las señales coestimuladoras clave de células T, en particular la ruta de CD28, tienen potencial para proteger xenoinjertos. Los ejemplos de agentes que bloquean la ruta de CD28 incluyen, pero sin limitación, CTLA4 soluble que incluye moléculas mutantes de CTLA4.

**[0147]** La activación de células T está implicada en la patogénesis del rechazo de trasplante. La activación de células T requiere al menos dos conjuntos de eventos de señalización. El primero se inicia por el reconocimiento específico a través del receptor de células T de un péptido antigénico combinado con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en células presentadoras de antígeno (APC5). El segundo conjunto de señales es antígeno inespecífico y es administrado por receptores coestimuladores de células T que interactúan con sus ligandos en APC. En ausencia de coestimulación, la activación de las células T se deteriora o aborta, lo que puede dar como resultado un estado de anergia clonal no respondedor específico del antígeno, o en la eliminación por muerte apoptótica. Por lo tanto, el bloqueo de la coestimulación de células T puede proporcionar un enfoque para suprimir las respuestas inmunes no deseadas de una manera específica de antígeno mientras que se preservan las funciones inmunes normales. (Dumont, FJ 2004 Therapy 1, 289-304).

**[0148]** De varias rutas coestimuladoras de células T identificadas hasta la fecha, la más destacada es la ruta CD28. CD28, una molécula de superficie celular expresada en células T, y sus contrarreceptores, las moléculas B7.1 (CD80) y B7.2 (CD86), presentes en células dendríticas, macrófagos y células B, han sido caracterizadas e identificadas como objetivos atractivos para interrumpir las señales coestimuladoras de células T. Una segunda molécula de superficie de células T homóloga a CD28 se conoce como proteína asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA4). CTLA4 es una molécula de señalización de la superficie celular, pero contrariamente a las acciones de CD28, CTLA4 regula negativamente la función de las células T. CTLA4 tiene una afinidad 20 veces mayor para los ligandos B7 que CD28. El gen para CTLA4 humano se clonó en 1988 y se mapeó cromosómicamente en 1990 (Dariavach y col., Eur. J. Immunol. 18: 1901-1905 (1988); Lafage-Pochitaloff y col., Immunogenetics 31: 198-201 (1990).), Patente de EE.UU. N° 5.977.318).

**[0149]** La ruta CD28/B7 se ha convertido en un objetivo atractivo para interrumpir las señales coestimuladoras de las células T. El diseño de un inhibidor CD28/B7 ha explotado el regulador negativo endógeno de este sistema, CTLA4. Una proteína de fusión de inmunoglobulina CTLA4 (CTLA4-Ig) se ha estudiado ampliamente como un medio para inhibir la coestimulación de células T. Se debe alcanzar un equilibrio difícil con cualquier terapia inmunosupresora; se debe proporcionar suficiente supresión para superar la enfermedad o el rechazo, pero una inmunosupresión excesiva inhibirá todo el sistema inmunitario. La actividad inmunosupresora de CTLA4-Ig se ha demostrado en estudios preclínicos de modelos animales de trasplante de órganos y enfermedad autoinmune. En ciertas realizaciones, LEA29Y se sustituye por CTLA4 cuando CTLA4 se incorpora como el inmunomodulador de la presente invención.

**[0150]** CTLA4 soluble recientemente se ha ensayado en pacientes humanos con insuficiencia renal, psoriasis y artritis reumatoide y se ha formulado como un fármaco desarrollado por Bristol-Myers Squibb (Abatacept, CTLA4-Ig soluble) que ha sido aprobado para el tratamiento de artritis reumatoide. Este fármaco es el primero en la nueva clase de moduladores selectivos de coestimulación de células T. Bristol-Myers Squibb también está llevando a cabo ensayos clínicos de fase II con Belatacept (LEA29Y) para trasplantes de aloinjerto de riñón. LEA29Y es una forma

mutada de CTLA4, que se ha diseñado para tener una mayor afinidad por los receptores B7 que la CTLA4 de tipo salvaje, fusionada a inmunoglobulina. Repligen Corporation también está llevando a cabo ensayos clínicos con su CTLA4-Ig para la púrpura trombocitopénica idiopática. La patente de los EE.UU. U5730403 titulada "Methods for protecting allogeneic islet trans-plant using soluble CTLA4 mutant molecules", describe el uso de moléculas mutantes de CTLA4-Ig y CTLA4 solubles para proteger los trasplantes de islotes alogénicos. Aunque CTLA-4 de un organismo puede unirse a B7 de otro organismo, la mayor avidéz se encuentra para B7 alogénico. Por lo tanto, aunque el CTLA-4 soluble del organismo donante puede unirse tanto al receptor B7 (en células normales) como al donante B7 (en células xenotrasplantadas), se une preferentemente a B7 en el xenoinjerto. Por lo tanto, en las realizaciones de la invención que comprenden animales porcinos o células para xenotrasplante, CTLA4 porcino es típico. La Publicación PCT N° WO 99/5 7266 de Imperial College describe una secuencia de CTLA4 porcina y la administración de CTLA4-Ig soluble para terapia de xenotrasplante. Vaughn A. y col., J Immunol (2000) 3175-3181, describen la unión y la función de CTLA4-Ig porcina soluble. La CTLA4-Ig porcina se une a B7 porcina (pero no humana), bloqueando CD28 en células T receptoras y haciendo que estas células T locales sean anérgicas sin causar inmunosupresión de células T globales (véase Mirenda y col., Diabetes 54: 1048-1055, 2005).

**[0151]** Hasta la fecha, gran parte de la investigación sobre CTLA4-Ig como un agente inmunosupresor se ha centrado en la administración de formas solubles de CTLA4-Ig para el paciente. Se han creado ratones transgénicos diseñados para expresar CTLA4-Ig y están sujetos a varias líneas de experimentación. Ronchese y col. la función del sistema inmune examinada generalmente después de la expresión de CTLA4 en ratones (Ronchese y col. J Exp Med (1994) 179: 809; Lane y col., J Exp Med. (1994) Mar 1; 179 (3): 819). Sutherland et al. (Transplantation 200069 (9): 1806-12) describieron el efecto protector de CTLA4-Ig secretada por aloinjertos transgénicos de páncreas fetal en ratones para evaluar los efectos de la CTLA4-Ig expresada transgénicamente en el trasplante de islotes alogénicos. Lui y col. (J Immunol Methods 2003 277: 171-183) informaron de la producción de ratones transgénicos que expresaban CTLA4-Ig bajo el control de un promotor específico mamario para inducir la expresión de CTLA4-Ig soluble en la leche de animales transgénicos para uso como un biorreactor.

**[0152]** La Publicación PCT N° WO 01/30966 de Alexion Pharmaceuticals Inc. describe constructos de ADN quimérico que contienen el inhibidor de células T CTLA-4 unido a la proteína del complemento CD59, así como células, tejidos y órganos porcinos transgénicos que contienen el mismo. La Publicación PCT N° WO2007035213 (Revivacor) describe animales porcinos transgénicos que han sido genéticamente modificados para expresar CTLA4-Ig.

**[0153]** Aunque se ha sugerido el desarrollo de animales que expresan CTLA4-Ig, estos animales están severamente inmunocomprometidos. Recientemente, se encontró que los cerdos producidos por Revivacor, Inc. que expresan CTLA4-Ig de forma ubicua usando un potenciador/promotor CAG (ubicuo) tienen un fenotipo inmunocomprometido y no eran viables en un entorno de cría típico (Phelps et al., 2009 Xenotransplantation. Nov-Dic; 16 (6): 477-85. Por lo tanto, existe la necesidad de expresar tales transgenes inmunosupresores de una manera específica de tejido, como en el endotelio de un xenoinjerto, donde los niveles altos pero localizados de expresión de proteína son posibles, sin cualquier problema fenotípico resultante en el animal transgénico.

**[0154]** Pueden expresarse inmunomoduladores adicionales, y en particular inmunosupresores en los animales, tejidos o células. Por ejemplo, los genes que se han inactivado en ratones para producir un fenotipo inmunocomprometido, se pueden clonar y alterar mediante la dirección de genes en cerdos. Algunos genes que se han dirigido en ratones y que pueden ser dirigidos para producir cerdos inmunocomprometidos incluyen beta 2-microglobulina (MHC clase I deficiencia, Koller et al., Science, 248: 1227-1230), TCR alfa, TCR beta (Mombaerts et al. al., Nature, 360: 225-231), RAG-1 y RAG-2 (Mombaerts y col., (1992) Cell 68, 869-877, Shinkai, y col., (1992) Cell 68, 855-867, US 5859307).

**[0155]** En una realización, los animales, órganos, tejidos o células de acuerdo con la presente invención pueden modificarse para expresar transgénicamente una proteína 4-inmunoglobulina asociada a linfocitos T citotóxicos (CTLA4). Los animales o células pueden modificarse para expresar el péptido CTLA4 o un fragmento biológicamente activo (por ejemplo, dominio extracelular, forma truncada del péptido en donde se ha eliminado al menos el dominio transmembrana) o derivado del mismo. El péptido puede ser, por ejemplo, humano o porcino. El péptido CTLA4 puede mutarse. Los péptidos mutados pueden tener mayor afinidad que el tipo salvaje para moléculas de B7 porcinas y/o humanas. El CTLA4 mutado puede ser CTLA4 (Glu104, Tyr29). El péptido CTLA4 puede modificarse de manera que se exprese intracelularmente. Otras modificaciones del péptido CTLA4 incluyen la adición de una señal de retención del retículo endoplásmico al extremo N o C. La señal de retención del retículo endoplásmico puede ser, por ejemplo, la secuencia KDEL. El péptido de CTLA4 se puede fusionar a un dominio de dimerización de péptido o una molécula de inmunoglobulina (Ig). Los péptidos de fusión de CTLA4 pueden incluir una secuencia enlazadora que puede unir los dos péptidos. En otro aspecto, a los animales que carecen de expresión de inmunoglobulina funcional, producidos de acuerdo con la presente descripción, se les puede administrar un péptido CTLA4 o una variante del mismo (pCTLA4-Ig o hCTLA4-Ig (Abatacept/Orencia, o Belatacept) como fármaco para suprimir su respuesta de células T. El péptido CTLA4 es el CTLA4 de longitud completa. En una realización adicional, el péptido CTLA4 puede contener menos que la proteína CTLA4 de longitud completa. En un aspecto, el péptido CTLA4 puede contener el dominio extracelular de un CTLA-4 En un aspecto particular, el péptido CTLA4 es el dominio extracelular de CTLA4. En otros aspectos, el CTLA4 es una forma mutada de CTLA4. En un aspecto, la forma mutada de CTLA4

puede tener una mayor afinidad que el tipo silvestre para el B7 porcino y/o humano. En un aspecto específico, el CTLA4 mutado puede ser CTLA4 humano (Glu104, Tyr29).

[0156] En un aspecto, el CTLA4 puede ser una forma truncada de CTLA4, en la que se ha eliminado al menos el dominio transmembrana de la proteína. El péptido CTLA4 puede modificarse de manera que se exprese intracelularmente. Se puede agregar una señal de retención de Golgi al extremo Nor C del péptido CTLA4. La señal de retención de Golgi puede ser la secuencia KDEL, que se puede agregar al terminal C o N del péptido CTLA4. El péptido CTLA4 puede fusionarse a un dominio de dimerización de péptido. El péptido CTLA4 se puede fusionar a una inmunoglobulina (Ig). En otro aspecto, los péptidos de fusión de CTLA4 pueden incluir una secuencia de enlace que puede unir los dos péptidos.

[0157] Cualquier secuencia de CTLA4 humana o porción biológicamente activa o fragmento de la misma conocida por un experto en la técnica puede estar de acuerdo con las composiciones y los métodos descritos en este documento. Los ejemplos no limitantes incluyen, pero no se limitan a, los siguientes números de acceso Genbank que describen secuencias de CTLA4 humanas: NM005214.2; BC074893.2; BC074842.2; AF414120.1; AF414120; AY402333; AY209009.1; BC070162.1; BC069566.1; L15006.1; AF486806.1; ACOI0138.6; AJ535718.1; AF225900.1; AF225900; AF411058.1; M37243.1; U90273.1; y/o

AF316875.1. Secuencias de nucleótidos adicionales que codifican péptidos de CTLA4 se pueden seleccionar entre las que incluyen, pero no se limitan a, los siguientes números de acceso de Genbank a partir de la base de datos EST: CD639535.1; A1733018.1; BM997840.1; BG536887.1; BG236211.1; BG058720.1; A1860i99.1; AW207094.1; AA210929.1; A1791416.1; BX1 13243.1; AW515943.1; BE837454.1; AA210902.1; BF329809.1; A1819438.1; BE837501.1; BE837537.1; y/o AA873138.1. Cualquier péptido consenso de CTLA4 puede usarse de acuerdo con la presente invención. Se puede usar cualquier fragmento u secuencia homóloga que muestre actividad similar a CTLA4. La secuencia de aminoácidos que exhibe actividad inhibidora de células T puede ser los aminoácidos 38 a 162 de la secuencia de CTLA4 porcina o los aminoácidos 38 a 161 de la secuencia de CTLA4 humana (véase, por ejemplo, la Publicación PCT N° WO 01/30966). En un aspecto, la porción utilizada debe tener al menos aproximadamente el 25% y preferiblemente al menos aproximadamente el 50% de la actividad de la molécula original. Los ácidos nucleicos y péptidos de CTLA4 se pueden fusionar con genes de inmunoglobulina y moléculas o fragmentos o regiones de los mismos. La referencia a las secuencias de CTLA4 incluye aquellas secuencias fusionadas a inmunoglobulinas. La Ig puede ser una Ig humana. La Ig puede ser IgG, en particular, IgG1. La Ig puede ser la región constante de IgG. La región constante puede ser la cadena C gamma 1 de IgG1. En un aspecto particular, el dominio extracelular de CTLA4 porcino se puede fusionar con Ig gamma C humana. En otra realización particular, el dominio extracelular de CTLA4 humano se puede fusionar a IgG1 o IgG4. En un aspecto particular adicional, el dominio extracelular de CTLA4 mutado (Glu 104, Tyr 29) se puede fusionar a IgG1.

### (iii) Otros inmunomoduladores

[0158] Otros inmunomoduladores que se pueden utilizar incluyen transactivadores de clase II (CIITA) y mutantes de los mismos, PDL1, PDL2, ligando inductor de apoptosis relacionado con factor a de necrosis tumoral (TRAIL), ligando Fas (FasL, CD95L) proteína asociada a integrina (CD47), HLA-E, HLA-DP, HLA-DQ o HLA-DR.

(a) CIITA: El transactivador de clase II (CIITA) es una proteína de dominio bi o multifuncional que actúa como un activador transcripcional y juega un papel crítico en la expresión de los genes MHC de clase II. Se ha demostrado previamente que una forma mutada del gen CIITA humano, que codifica una proteína que carece de los aminoácidos terminales, actúa como un potente supresor dominante negativo de la expresión de HLA clase II (Yun et al., Int Immunol., 1997). Oct; 9 (10): 1545-53). Los antígenos de MHC de clase II porcina son potentes estimuladores del reconocimiento directo de las células T por las células T CD4+ humanas y, por lo tanto, es probable que desempeñen un papel importante en las respuestas de rechazo a los donantes de cerdos transgénicos en la xenotrasplatación clínica. Se informó que una construcción de CIITA humana mutada era efectiva en células de cerdo, suprimiendo marcadamente la expresión constitutiva de MHC clase II porcina inducida por IFN $\gamma$ . Además, las líneas de células endoteliales vasculares porcinas transfectadas establemente que portan constructos CIITA humanos mutados no lograron estimular la xenorrecepción directa de células T por células T CD4+ humanas purificadas (Yun et al., Transplantation, 2000 Mar 15; 69 (5): 940-4) Los órganos, tejidos y células de animales transgénicos CIITA-DN podrían inducir respuestas de rechazo de células T muy reducidas en receptores humanos. En combinación con otros transgenes, la expresión transgénica de un CIITA mutado podría permitir la supervivencia del xenoinjerto a largo plazo con niveles de inmunosupresión clínicamente aceptables. En una realización, se puede usar un CIITA humano. En particular, un CIITA-DN humano. En otra realización, se puede usar un CIITA porcino. En particular, un CIITA-DN porcino.

(b) PDL1, PDL2: moléculas coestimuladoras típicas para la activación de células T son CD80/86 o CD40. Además de estos, en los últimos años se han encontrado vías coestimuladoras positivas, se han encontrado nuevas vías coestimuladoras que median las señales negativas y son importantes para la regulación de la activación de las células T. Una de estas rutas más nuevas es la ruta que consiste en el receptor de muerte programada 1 (PD-1) y sus ligandos, PD-L1 y PD-L2. El receptor PD-1 no se expresa en las células en reposo, sino que se regula positivamente después de la activación de las células T y B. PD-1 contiene un motivo de interruptor basado en tirosina de inmunorreceptor citoplasmático y la unión de PD-L1 o PD-L2 a PD-1 conduce a señales inhibitoras en células T. Los datos recientes sugieren que las vías de PD1/PDLigando pueden

desempeñar un papel en el control de los subconjuntos de células T que exhiben actividad reguladora. En ratones, se ha demostrado que las señales de PD-1 son necesarias para la actividad supresora de las células T reguladoras (Treg) y la generación de Treg adaptativa. Estas observaciones sugieren que PD-1/PDLig e interacciones no solo inhiben las respuestas de las células T, sino que también pueden provocar la inmunorregulación. Varias líneas de evidencia demuestran que las vías de PD-1/PDLigando pueden controlar el injerto y el rechazo de aloinjertos, lo que implica que estas moléculas son objetivos interesantes para la inmunomodulación después del trasplante de órganos. De hecho, la prolongación de la supervivencia del aloinjerto podría obtenerse mediante la transferencia del gen PDL1g a corazones de donantes en un modelo de trasplante de rata. Además, se ha informado que la mejora de la señalización de PD-1 mediante inyección de PD-L1g protege los injertos contra el rechazo en ratones. Datos recientes también muestran que la sobreexpresión de PD-L1G en injertos de islotes en ratones puede prolongar parcialmente la supervivencia del injerto de islotes. La expresión transgénica de PD-L1 o PD-L2 humana en células y tejidos de cerdo debería reducir las respuestas tempranas de células T anti-cerdo iniciadas a través de la vía directa de sensibilización (Plege et al., *Transplantation*, 15 de abril de 2009; 87 (7): 975-82). Por la inducción de Treg también podría ser posible controlar las células T sensibilizadas al xenoinjerto a través del mecanismo indirecto que se requiere para lograr una tolerancia duradera.

(c) TRAIL / Fas L: Expresión de ligandos inductores de apoptosis, tales como ligando Fas (FasL, CD95L) o ligando inductor de apoptosis relacionado con factor  $\alpha$  de necrosis tumoral (TRAIL, Apo-2L) pueden eliminar las células T atacando un xenoinjerto. TRAIL es una proteína de membrana de tipo II con un dominio extracelular homólogo al de otros miembros de la familia del factor de necrosis tumoral que muestra la mayor identidad de aminoácidos con FasL (28%). TRAIL ejerce su acción inductora de apoptosis de manera preferente sobre las células tumorales. En las células normales, la unión de los receptores TRAIL no conduce a la muerte celular. Estudios recientes han demostrado que los efectos citotóxicos de las células inmunes, incluidas las células T, las células asesinas naturales, los macrófagos y las células dendríticas, están mediados, al menos en parte, por TRAIL. La expresión de TRAIL humano en cerdos transgénicos puede proporcionar una estrategia razonable para proteger los tejidos de cerdo contra el rechazo mediado por células después del xenotrasplante a primates. La expresión estable de TRAIL humano se ha logrado en cerdos transgénicos y se ha demostrado que TRAIL expresado es biológicamente funcional in vitro (Klose et al., *Transplantation*, 27 de julio de 2005; 80 (2): 222-30).

(d) CD47: CD47, conocida como proteína asociada a integrina, es una glicoproteína de superficie celular de 50 kDa expresada de forma ubicua que sirve como ligando para proteína reguladora de señal (SIRP) $\alpha$  (también conocida como CD172a, SHPS-1), receptor inmune inhibidor en macrófagos. CD47 y SIRP $\alpha$  constituyen un sistema de comunicación célula-célula (el sistema CD47-SIRP $\alpha$ ) que desempeña papeles importantes en una variedad de procesos celulares que incluyen migración celular, adhesión de células B y activación de células T. Además, el sistema CD47-SIRP $\alpha$  está implicado en la regulación negativa de la fagocitosis por los macrófagos. El CD47 en la superficie de varios tipos de células (es decir, eritrocitos, plaquetas o leucocitos) puede proteger contra la fagocitosis de los macrófagos al unirse al receptor de macrófagos inhibidor de SIRP $\alpha$ . El papel de las interacciones CD47-SIRP $\alpha$  en el reconocimiento de sí mismo y la inhibición de la fagocitosis se ha ilustrado por la observación de que los macrófagos de ratón primarios de tipo salvaje fagocitan rápidamente los RBC no opioides obtenidos de ratones deficientes en CD47 pero no de ratones de tipo salvaje. También se ha informado que a través de sus receptores SIRP $\alpha$ , el CD47 inhibe tanto la fagocitosis mediada por el receptor de complemento Fc y como la del complemento. Se ha demostrado que el CD47 porcino no induce la fosforilación de tirosina SIRP $\alpha$  en la línea celular similar a macrófagos humanos, y la proteína de fusión CD47-Fc humana soluble inhibe la actividad fagocítica de los macrófagos humanos hacia las células porcinas. También se indicó que la manipulación de células porcinas para la expresión de CD47 humano reduce radicalmente la susceptibilidad de las células a la fagocitosis por macrófagos humanos (Ide et al., *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 2007 Mar 20; 104 (12): 5062-6). La expresión de CD47 humano en células porcinas podría proporcionar señalización inhibitoria a SIRP $\alpha$  en macrófagos humanos, proporcionando un enfoque para evitar el rechazo de xenoinjertos mediado por macrófagos.

(e) Respuesta de células NK. HLA-E/Beta 2 microglobulina y HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR:

Las células asesinas naturales (NK) humanas representan un obstáculo potencial para el xenotrasplante exitoso de cerdo a humano porque infiltran órganos de cerdo perfundidos con sangre humana ex vivo y lisan células porcinas in vitro tanto directamente como, en presencia de suero humano, mediante citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos. La autorreactividad de células NK se previene mediante la expresión de los ligandos de clase I del complejo de histocompatibilidad principal (MHC) de los receptores NK inhibidores en células autólogas normales. El receptor inhibidor CD94/NKG2A que se expresa en la mayoría de las células NK humanas activadas se une específicamente al antígeno leucocitario humano (HLA)-E. La molécula de MHC humana no clásica HLA-E es un potente ligando inhibidor para células NK portadoras de CD94/NKG2A y, a diferencia de las moléculas de MHC clásicas, no induce respuestas de células T alogénicas. HLA-E está montado en el retículo endoplasmático y transportado a la superficie de la célula como un complejo trimérico estable que consiste en la cadena pesada de HLA-E,  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$  2m), y un péptido derivado de la secuencia líder de algunas moléculas MHC de clase I. Se ha demostrado que la expresión de HLA-E proporciona una protección parcial contra la citotoxicidad de células NK humanas xenogénicas (Weiss et al., *Transplantation*, 2009 enero 15; 87 (1): 35-43). La expresión transgénica de HLA-E en órganos de cerdo tiene el potencial de aliviar sustancialmente el rechazo mediado por células NK humanas de xenoinjertos porcinos sin el riesgo de respuestas alogénicas. Además, los cerdos transgénicos que portan otros genes HLA se han generado con éxito con el objetivo de "humanizar" órganos, tejidos y células porcinas (Huang et al., *Proteomics*. 2006 Nov; 6 (21):

5815-25, véase también US6639122).

### **Anticoagulantes**

5 **[0159]** Los transgenes anticoagulantes se pueden introducir en animales porcinos. Dichos transgenes se pueden expresar específicamente en el endotelio porcino. En una realización de la presente divulgación, se puede usar el potenciador y promotor Tie-2. Se ha demostrado que el potenciador y promotor de Tie-2 proporciona una expresión génica específica de células vasculares endoteliales uniformes en ratones transgénicos embrionarios y adultos (Schlaeger et al., 1997 Proc Natl Acad Sci. 1 de abril; 94 (7): 3058- 63). En un ejemplo, el promotor y potenciador Tie-2 se utilizaron para construir un vector para dirigir la expresión de un anticoagulante, local y específicamente, en el endotelio de los animales transgénicos resultantes. En otra realización de la divulgación actual, se puede usar el promotor de ICAM-2 porcino y partes de su primer intrón que contiene actividad potenciadora (también denominado potenciador de ICAM-2). En un ejemplo, el promotor ICAM-2 porcino, y porciones de su primer intrón que contiene actividad potenciadora (también denominado "potenciador de ICAM-2" en este documento) (Godwin et al., 2006. Xenotransplantation, Nov; 13 (6): 514-21) para construir un segundo vector para dirigir la expresión de un anticoagulante, localmente y específicamente, en el endotelio de los animales transgénicos resultantes.

20 **[0160]** En ciertas realizaciones de la presente invención, el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) se puede utilizar como anticoagulante, TFPI es un polipéptido de cadena única que puede inhibir de forma reversible el factor Xa (Xa) y la trombina (Factor IIa) y por tanto, inhibe Coagulación dependiente de TF para una revisión de TFPI, véase Crawley y Lane (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2008, 28 (2): 233-42). Dorling y col. generaron ratones transgénicos que expresan una proteína de fusión que consiste en los tres dominios Kunitz de TFPI humano unidos a los dominios transmembrana/citoplásmico de CD4 humano, con una cola de selectina P para dirigirse a gránulos de almacenamiento intracelular de Weibel-Palade (Chen D, et al. Am J Transplant 2004; 4: 1958 - 1963). La visualización dependiente de la activación resultante de TFPI en el endotelio fue suficiente para inhibir por completo el rechazo humoral agudo mediado por trombosis de xenoinjertos cardíacos de ratón por ratas tratadas con ciclosporina. También se sugirió que la regulación efectiva de la coagulación puede prevenir el rechazo crónico. Se obtuvieron resultados similares con corazones de ratón transgénico que expresan una proteína de fusión hirudina/CD4/P-selectina, lo que indica que la inhibición de la generación o actividad de trombina era la clave para la protección en este modelo.

35 **[0161]** En ciertas realizaciones, la hirudina puede usarse como el anticoagulante de la presente invención. La hirudina es un péptido de origen natural en las glándulas salivales de las sanguijuelas medicinales (como Hirudo medicinalis) y es un potente inhibidor de la trombina. Dorling y colaboradores (Chen et al., J. Transplant. 2004 Dic; 4 (12): 1958-63) también generaron ratones transgénicos que expresan proteínas de fusión de hirudina unidas a la membrana, y trasplantaron sus corazones en ratas (ratón-rata Xeno-Tx). En contraste con el control de corazones de ratones no transgénicos, que fueron rechazados en 3 días, el 100% de los órganos de ambas cepas de ratones transgénicos fueron completamente resistentes al rechazo humoral y sobrevivieron durante más de 100 días cuando se produjo el rechazo mediado por células T inhibido por administración de ciclosporina A. Riesbeck y col., (Circulation, 1998 Dic. 15; 98 (24): 2744-52) también exploraron la expresión de las proteínas de fusión de hirudina en células de mamíferos como una estrategia para la prevención de la trombosis intravascular. La expresión en las células redujo los niveles locales de trombina e inhibió la formación de fibrina. Por lo tanto, la hirudina es otro transgén anticoagulante de interés para prevenir los efectos tromboticos presentes en los xenotrasplantes.

45 **[0162]** En otras ciertas realizaciones, la trombosmodulina se puede usar como el anticoagulante de la presente invención. La trombosmodulina (TM) funciona como un cofactor en la activación inducida por trombina de la proteína C en la ruta del anticoagulante formando un complejo estequiométrico 1: 1 con trombina. El receptor de la proteína C de la célula endotelial (EPCR) es una proteína de membrana tipo I N-glicosilada que aumenta la activación de la proteína C. El papel de estas proteínas en el sistema anticoagulante de la proteína C es revisado por Van de Wouwer et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004 Aug; 24 (8): 1374-83. Varios grupos han explorado la expresión de estos y otros transgenes anticoagulantes para abordar potencialmente las barreras de coagulación al xenotrasplante (revisado por Cowan y D'Apice, Cur Opin Organ Transplant. 2008 Abr; 13 (2): 178-83). Esmon y colaboradores (Li y col., J Thromb Haemost. 2005 Jul; 3 (7): 1351-9) sobreexpresaron EPCR en el endotelio de ratones transgénicos y mostraron que dicha expresión protegía a los ratones del desafío trombotico. Iino et al. (J Thromb Haemost, mayo de 2004; 2 (5): 833-4), sugirió la expresión ex vivo de TM en islotes de donantes a través de la terapia génica como un medio para prevenir las complicaciones tromboticas en el trasplante de islotes.

60 **[0163]** En ciertas realizaciones, CD39 puede usarse como el anticoagulante de la presente invención. CD39 es una difosfatohidrolasa de trifosfato de nucleósido (NTPDasa) vascular principal, y convierte ATP y ADP en AMP y finalmente en adenosina. La adenosina extracelular desempeña un papel importante en la trombosis y la inflamación, y por lo tanto se ha estudiado por su papel beneficioso en el trasplante (revisado por Robson et al., Semin Thromb Hemost, abril de 2005; 31 (2): 217-33). Estudios recientes han demostrado que CD39 tiene un efecto importante en la reducción de la respuesta inflamatoria (Beldi et al., Front Biosci, 2008, 13: 2588 - 2603). Los ratones transgénicos que expresan hCD39 exhibieron una agregación plaquetaria alterada, tiempos de hemorragia prolongados y resistencia a tromboembolismo sistémico en un modelo de trasplante de corazón (Dwyer y col., J Clin Invest, mayo de 2004; 113 (10): 1440-6). También se demostró que expresan CD39 en islotes pancreáticos y

cuando se incuban con sangre humana, estos islotes retrasaron significativamente el tiempo de coagulación en comparación con los islotes de tipo salvaje (Dwyer et al., *Transplantation*, 2006 15 de agosto; 82 (3): 428 - 32). Los esfuerzos preliminares para expresar hCD39 en niveles elevados a partir de un sistema de promotor constitutivo en cerdos transgénicos mostraron alta letalidad postnatal (Revivacor, Inc., datos no publicados). Por lo tanto, existe la necesidad de expresar transgenes anticoagulantes en cerdos de una manera que no comprometa el bienestar del animal, y aún así proporcione niveles adecuados de expresión para el xenotrasplante inclínical de utilidad.

### Transgenes citoprotectores

[0164] La presente invención puede incluir transgenes citoprotectores ("citoprotectores"). Se considera que transgenes citoprotectores incluyen antiapoptóticos, antioxidantes y antiinflamatorios. Ejemplos incluyen:

(a) A20: En ciertas realizaciones, A20 puede usarse como el transgén citoprotector de la presente invención. A20 proporciona actividad antiinflamatoria y antiapoptótica. Los órganos trasplantados vascularizados pueden protegerse contra la activación de células endoteliales y el daño celular mediante moléculas antiinflamatorias, anticoagulantes y/o antiapoptóticas. Entre los genes con gran potencial para la modulación del rechazo vascular agudo (AVR) está el gen humano A20 (hA20) que se identificó por primera vez como factor inducible de factor de necrosis tumoral (TNF) en células endoteliales de vena umbilical humana. El A20 humano tiene una doble función citoprotectora al proteger las células endoteliales de la apoptosis e inflamación mediada por TNF, mediante el bloqueo de varias caspasas, y el factor nuclear de factor de transcripción KB, respectivamente. Se han producido lechones transgénicos A20 viables y en estos animales la expresión de hA20 se restringió a músculo esquelético, corazón y PAECs que estaban protegidos contra la apoptosis mediada por TNF por expresión de hA20 y al menos parcialmente contra la muerte celular mediada por CD95 (Fas) L. Además, los cardiomiocitos de los cerdos clonados con hA20-transgénicos estaban parcialmente protegidos contra los ataques cardíacos (Oropeza et al., *Xenotransplantation*, 2009 Nov; 16 (6): 522-34).

(b) HO-1: En ciertas realizaciones, HO puede usarse como el transgén citoprotector de la presente invención. HO proporciona actividad antiinflamatoria, antiapoptótica y antioxidante. Las hemo oxigenasas (HO), enzimas limitantes de la velocidad en el catabolismo del hemo, también denominadas HSP32, pertenecen a los miembros de las proteínas de choque térmico, en las que el anillo se divide en hierro ferroso, monóxido de carbono (CO) y biliverdina que luego se convierte en bilirrubina por reductasa de biliverdina. Se han clonado tres isoformas de HO, que incluyen HO-1, HO-2 y HO-3. La expresión de HO-1 es altamente inducible, mientras que HO-2 y HO-3 se expresan constitutivamente (Maines M.D. y col., *Annual Review of Pharmacology & Toxicology* 1997; 37: 517-554, y Choi AM et al., *American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology* 1996; 15: 9-19). Un análisis de ratones HO-1 -/- sugiere que el gen que codifica HO-1 regula la homeostasis del hierro y actúa como un gen citoprotector con potentes efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antiapoptóticos (Poss KD et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 94: 10925-10930, Poss KD et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 94: 10919-10924, y Soares MP et al. al., *Nature Medicine* 1998; 4: 1073 - 1077). Se han descrito recientemente hallazgos similares en un informe de caso de deficiencia de HO-1 en humanos (Yachie A y col., *Journal of Clinical Investigation* 1999; 103: 129-135). Los mecanismos moleculares responsables de los efectos citoprotectores de HO-1, incluyendo antiinflamatorios, antioxidantes y antiapoptóticos, están mediados por sus productos de reacción. La expresión de HO-1 puede ser modulada in vitro e in vivo por protoporfirinas con diferentes metales. Las protoporfirinas de cobalto (CoPP) y las protoporfirinas de hierro (FePP) pueden regular positivamente la expresión de HO-1. Por el contrario, las protoporfirinas de estaño (SnPP) y las protoporfirinas de zinc (ZnPP) inhiben la actividad de HO-1 a nivel de proteína. Recientemente, se ha demostrado que la expresión de HO-1 suprime el rechazo de trasplantes de corazón de ratón a rata (Sato K y col., *J. Immunol.* 2001; 166: 4185-4194), protege las células de los islotes de la apoptosis, y mejora la función in vivo de las células de los islotes después del trasplante (Pileggi A y col., *Diabetes* 2001; 50: 1983-1991). También se ha demostrado que la administración de HO-1 mediante transferencia genética proporciona protección contra la lesión pulmonar inducida por hipoxia (Otterbein L.E. y col., *J Clin Invest* 1999; 103: 1047-1054), la regulación positiva de HO-1 protege genéticamente los hígados de rata Zucker grasos de la lesión por isquemia/reperfusión (Amersi F y col., *J Clin Invest* 1999; 104: 1631-1639) y la ablación o expresión del gen HO-1 modula la apoptosis tubular renal inducida por cisplatino (Shiraishi F et al., *Am J Physiol Renal Physiol* 2000; 278: F726 - F736). En modelos animales transgénicos, se demostró que la sobreexpresión de HO-1 evita las respuestas inflamatorias y vasculares pulmonares a la hipoxia (Minamino T y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 2001; 98: 8798-8803) y protege el corazón contra la isquemia y la lesión por reperfusión (aún S.F., et al., *Cir Res* 2001; 89: 168-173). Se han producido cerdos portadores de un transgén HO-1, sin embargo, no se informaron los efectos clínicos relacionados con su uso en xenotrasplantes (US7378569).

(c) FAT-1: en ciertas realizaciones, se puede usar FAT-1 como el transgén citoprotector de la presente invención. FAT-1 proporciona actividad antiinflamatoria. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) juegan un papel en la inhibición de la inflamación (clase n-3). Las células de los mamíferos carecen de desaturasa que convierte n-6 en PUFA n-3. En consecuencia, los ácidos grasos n-3 esenciales se deben suministrar con la dieta. Sin embargo, a diferencia de los mamíferos, el nematodo de vida libre *Caenorhabditis elegans* expresa una desaturasa de ácido graso n-3 que introduce un doble enlace en ácidos grasos n-6 en la posición n-3 de las cadenas hidrocarbonadas para formar PUFA n-3. Se generaron ratones transgénicos que expresan el gen *gras-1* de *C. elegans* y, en consecuencia, pueden convertir de manera eficiente AGPI dietéticos de la serie 6 en AGPI de serie 3, como EPA

(20: 5 n-3) y DHA (22-6 n-3). (Kang y col., Nature. 2004 Feb 5; 427 (6974): 504). Otro grupo produjo un modelo de ratón transgénico en el que los codones del ADNc de la grasa 1 se optimizaron adicionalmente para una traducción eficaz en sistemas de mamíferos; la producción endógena de PUFA n-3 se logró mediante la sobreexpresión de un gen desaturasa de ácidos grasos n-3 de *C. elegans*, *mfat-1*. Este grupo mostró que el aumento celular de PUFA n-3 y la reducción de PUFA n-6 a través de la expresión transgénica de *mfat-1* potenciaron la secreción de insulina estimulada por glucosa, aminoácidos y GLP-1 en islotes pancreáticos aislados de los ratones, y hizo que los islotes fueran muy resistentes a la muerte celular inducida por citocinas (Wei et al., Diabetes, 2010 Feb; 59 (2): 471-8).

(d) Receptor de TNF-alfa soluble (sTNFR1): En ciertas realizaciones, se puede usar sTNFR1 como el transgén citoprotector de la presente invención. El factor de necrosis tumoral (TNF, cachexina o cachectina y formalmente conocido como factor de necrosis tumoral alfa) es una citocina involucrada en la inflamación sistémica y es un miembro de un grupo de citoquinas que estimulan la reacción de fase aguda. El papel principal del TNF está en la regulación de las células inmunes. El TNF es capaz de inducir muerte celular apoptótica, para inducir inflamación. El receptor 1 de TNF-alfa soluble (sTNFR1) es un dominio extracelular de TNFR1 y un antagonista de TNF-alfa (Su et al., 1998. Arthritis Rheum. 41, 139-149). La expresión transgénica de sTNFR1 en xenoinjertos puede tener efectos antiinflamatorios beneficiosos.

**[0165]** SOD se puede usar como los transgenes citoprotectores de la presente descripción. En otros aspectos, la catalasa puede usarse como transgenes citoprotectores. Otros citoprotectores con propiedades antioxidantes relevantes incluyen, sin limitación, SOD y catalasa. El oxígeno es la molécula esencial para todos los organismos aeróbicos y desempeña un papel predominante en la generación de ATP, es decir, la fosforilación oxidativa. Durante este proceso, las especies de oxígeno reactivo (ROS), incluido el anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se producen como subproductos. En los hombres, un sistema de defensa antioxidante equilibra la generación de ROS. La dismutasa de superóxido (SOD) y la catalasa son dos enzimas con propiedades antioxidantes. SOD cataliza la dismutación de radicales de superóxido a peróxido de hidrógeno, este último se convierte en agua por catalasa y peroxidasa de glutatión. El daño celular resultante de la generación de ROS puede ocurrir en un entorno de trasplante. Por lo tanto, existe un interés en expresar genes anti-oxidantes ex vivo de forma ortogénica en tejidos de donantes. La transferencia génica ex vivo de EC-SOD y catalasa fue antiinflamatoria en un modelo de rata de artritis inducida por antígeno (Dai et al., Gene Ther. 2003 Apr, 10 (7): 550-8). Además, la administración de genes EC-SOD y/o catalasa a través de la vena porta atenuó notablemente la lesión I/R hepática en un modelo de ratón (He et al., Liver Transpl. 2006 Dic; 12 (12): 1869-79). Además, ciertos anticoagulantes también proporcionan actividad antiinflamatoria que incluye trombomodulina, EPCR y CD39.

#### ***Producción de animales genéticamente modificados***

**[0166]** Los animales genéticamente modificados se pueden producir mediante cualquier método conocido por los expertos en la materia, que incluyen, entre otros, la reproducción selectiva, la transferencia nuclear, la introducción de ADN en oocitos, espermatozoides, cigotos o blastómeros, o mediante el uso de células madre embrionarias. Se pueden identificar modificaciones genéticas en animales que luego se reproducen para formar una manada de animales con un conjunto deseado de modificaciones genéticas (o una modificación genética única). Esta progenie se puede criar más para producir diferentes o el mismo conjunto de modificaciones genéticas (o modificación genética única) en su progenie. Este ciclo de mejoramiento para animales con modificación(es) genética(s) deseada(s) puede continuar por el tiempo que se desee. "Rebaño" en este contexto puede comprender múltiples generaciones de animales producidos a lo largo del tiempo con las mismas o diferentes modificaciones genéticas. "Rebaño" también puede referirse a una sola generación de animales con las mismas o diferentes modificaciones genéticas.

**[0167]** Las células útiles para la modificación genética (a través de, por ejemplo, pero sin limitación, recombinación homóloga) incluyen, a modo de ejemplo, células epiteliales, células neuronales, células epidérmicas, queratinocitos, células hematopoyéticas, melanocitos, condrocitos, linfocitos (linfocitos B y T), eritrocitos, macrófagos, monocitos, células mononucleares, fibroblastos, células del músculo cardíaco y otras células musculares, etc. Además, las células utilizadas para producir el animal genéticamente modificado (a través, por ejemplo, pero no limitado a, transferencia nuclear) se puede obtener de diferentes órganos, por ejemplo, piel, pulmón, páncreas, hígado, estómago, intestino, corazón, órganos reproductivos, vejiga, riñón, uretra y otros órganos urinarios, etc. Las células se pueden obtener de cualquier célula o órgano del cuerpo, incluidas todas las células somáticas o germinales.

**[0168]** Adicionalmente, las células animales que pueden modificarse genéticamente pueden obtenerse a partir de una variedad de diferentes órganos y tejidos tales como, entre otros, piel, mesénquima, pulmón, páncreas, corazón, intestino, estómago, vejiga, vasos sanguíneos, riñón, uretra, órganos reproductivos y una preparación desagregada de un embrión, feto o animal adulto, en su totalidad o en parte. En una realización de la invención, las células se pueden seleccionar del grupo que consiste, a modo no taxativo, en células epiteliales, fibroblastos, neuronas, queratinocitos, células hematopoyéticas, melanocitos, condrocitos, linfocitos (B y T), macrófagos., monocitos, células mononucleares, células del músculo cardíaco, otras células musculares, células de la granulosa, células del cumulus, células epidérmicas, células endoteliales, islotes de células de Langerhans, células sanguíneas, células precursoras de la sangre, células óseas, células precursoras de los huesos, células madre neuronales, primordiales células madre, células madre adultas, células madre mesenquimales, hepatocitos, queratinocitos, células

5 endoteliales de la vena umbilical, células endoteliales aórticas, células endoteliales microvasculares, fibroblastos, células estrelladas hepáticas, células del músculo liso aórtico, miocitos cardíacos, neuronas, células de Kupffer, lisas  
 10 células musculares, células de Schwann y células epiteliales, eritrocitos, plaquetas, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos, adipocitos, condrocitos, islotes pancreáticos células, células tiroideas, células paratiroideas, células parótidas, células tumorales, células gliales, astrocitos, glóbulos rojos, glóbulos blancos, macrófagos, células  
 15 células epiteliales, células somáticas, células pituitarias, células suprarrenales, células del cabello, células de vejiga, células de riñón, células de retina, células de barra, células de cono, células cardíacas, células marcapasos, células de bazo, células presentadoras de antígeno, células de memoria, células T, células B, células plasmáticas, células musculares, células ováricas, células uterinas, células prostáticas, células epiteliales vaginales, espermatozoides, células testiculares, células germinales, óvulos, células de leydig, células peritubulares, células de Sertoli, células de luteína, 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 un aspecto alternativo, pueden usarse células madre embrionarias. Se puede emplear una línea de células madre embrionarias o se pueden obtener células madre embrionarias recientemente de un huésped, como un animal porcino. Las células pueden cultivarse en una capa adecuada de alimentación de fibroblastos o crecer en presencia del factor inhibidor de la leucemia (LIF).

20 **[0169]** Las células madre embrionarias son un tipo de célula germinal preferido, puede emplearse una línea de células madre embrionarias o pueden obtenerse células madre embrionarias a partir de un huésped, tal como un animal porcino. Las células pueden cultivarse en una capa adecuada de alimentación de fibroblastos o crecer en presencia del factor inhibidor de la leucemia (LIF).

25 **[0170]** Las células de interés particular incluyen, entre otros linajes, las células madre, por ejemplo, células madre hematopoyéticas, células madre embrionarias, células madre mesenquimales, etc., los islotes de Langerhans, células de la médula adrenal que pueden secretar dopamina, osteoblastos, osteoclastos, células epiteliales, células endoteliales, leucocitos, por ejemplo, linfocitos B y T, células mielomonocíticas, etc., neuronas, células gliales, células ganglionares, células retinianas, células hepáticas, por ejemplo, hepatocitos, células de la médula ósea, queratinocitos, células del folículo piloso y células de mioblastos (musculares).

30 **[0171]** En una realización particular, las células pueden ser fibroblastos o células similares a fibroblastos que tienen una morfología o un fenotipo que no se distingue de los fibroblastos, o una esperanza de vida antes de la senescencia de al menos 10 o al menos 12 o al menos 14 o en al menos 18 o al menos 20 días, o una esperanza de vida suficiente para permitir la recombinación homóloga y la transferencia nuclear de un núcleo no senescente; en una realización específica, las células pueden ser fibroblastos fetales. Las células de fibroblastos son un tipo de célula somática adecuada porque se pueden obtener de fetos en desarrollo y animales adultos en grandes cantidades. Estas células pueden propagarse fácilmente in vitro con un tiempo de duplicación rápido y pueden propagarse clonalmente para su uso en procedimientos de dirección de genes. Las células que se utilizarán pueden ser de un animal fetal, o pueden ser neonatales o de un animal adulto de origen. Las células pueden ser maduras o inmaduras y diferenciadas o no diferenciadas.

**Recombinación homóloga**

45 **[0172]** La recombinación homóloga permite modificaciones específicas de sitio en genes endógenos y, por lo tanto, pueden diseñarse nuevas alteraciones en el genoma. Un paso primario en la recombinación homóloga es el intercambio de cadena de ADN, que implica un emparejamiento de un dúplex de ADN con al menos una cadena de ADN que contiene una secuencia complementaria para formar una estructura de recombinación intermedia que contiene ADN heterodúplex (véase, por ejemplo, Radding, CM (1982) Ann Rev. Genet. 16: 405; Patente de EE.UU. N° 4.888.274). El ADN heterodúplex puede tomar varias formas, incluyendo una cadena triple de ADN que contiene  
 50 forma triple en la que una única cadena complementaria invade el ADN dúplex (Hsieh y col., (1990) Genes and Development 4: 1951; Rao et al., (1991) PNAS 88:2984)), y cuando dos cadenas de ADN complementarias se emparejan con un dúplex de ADN, puede formarse una unión de recombinación clásica de Holliday o estructura de chi (Holliday, R. (1964) Genet. Res. 5: 282), o un bucle de doble D ("Diagnostic Applications of Double-D Loop Formation", documento de patente de los EE.UU. N° de serie 07/755.462, presentada el 4 de septiembre de 1991). Una vez formada, una estructura heterodúplex puede resolverse mediante rotura e intercambio de cadena, de modo que la totalidad o una porción de una cadena de ADN invasora se empalma en un dúplex de ADN receptor, añadiendo o reemplazando un segmento del dúplex de ADN receptor. Alternativamente, una estructura heterodúplex puede dar como resultado la conversión génica, en la que una secuencia de una cadena invasora se transfiere a un dúplex de ADN receptor reparando bases mal emparejadas usando la cadena invasora como molde (Genes, 3ª Ed. (1987) Lewin, B., John Wiley, Nueva York, NY; Lopez y otros (1987) Nucleic Acids Res. 15: 5643). Ya sea por el mecanismo de ruptura y unión o por el mecanismo o mecanismos de conversión génica, la formación de ADN heterodúplex en articulaciones homólogas puede servir para transferir información de secuencia genética de una molécula de ADN a otra.

65 **[0173]** La capacidad de recombinación homóloga (conversión génica y la hebra clásica rotura/reincorporación) para transferir información de la secuencia genética entre moléculas de ADN hace la recombinación homóloga dirigida un

método poderoso en la ingeniería genética y la manipulación de genes.

**[0174]** En la recombinación homóloga, el ADN entrante interactúa con un sitio en el genoma que contiene una secuencia de ADN sustancialmente homóloga y se integra en él. En la integración no homóloga ("aleatoria" o "ilícita"), el ADN entrante no se encuentra en una secuencia homóloga en el genoma sino que se integra en otro lugar, en una de una gran cantidad de ubicaciones potenciales. En general, los estudios con células eucariotas superiores han revelado que la frecuencia de la recombinación homóloga es mucho menor que la frecuencia de la integración aleatoria. La relación de estas frecuencias tiene implicaciones directas para la "dirección de genes" que depende de la integración a través de recombinación homóloga (es decir, recombinación entre el "ADN objetivo" exógeno y el correspondiente "ADN diana" en el genoma). La presente invención puede usar recombinación homóloga para inactivar un gen o insertar y regular por incremento o activar un gen en células, tales como las células descritas anteriormente. El ADN puede comprender al menos una porción del/de los gen(es) en el locus particular con la introducción de una alteración en al menos una, opcionalmente ambas copias, del (de los) gen(es) nativo(s), para prevenir la expresión del producto génico funcional. La alteración puede ser una inserción, eliminación, reemplazo, mutación o combinación de los mismos. Cuando la alteración se introduce en una sola copia del gen inactivado, las células que tienen una única copia no mutada del gen diana se amplifican y pueden someterse a una segunda etapa de orientación, donde la alteración puede ser la misma o diferente de la primera alteración, generalmente diferente, y cuando está involucrada una eliminación, o reemplazo, puede superponerse al menos una porción de la alteración originalmente introducida. En esta segunda etapa de direccionamiento, puede usarse un vector de direccionamiento con los mismos brazos de homología, pero que contiene marcadores de selección de mamífero diferentes. Los transformantes resultantes se criban para determinar la ausencia de un antígeno diana funcional y el ADN de la célula se puede cribar adicionalmente para asegurar la ausencia de un gen diana de tipo silvestre. Alternativamente, la homocigosidad en cuanto a un fenotipo puede lograrse criando huéspedes heterocigotos para la mutación.

**[0175]** Varios documentos describen el uso de una recombinación homóloga en células de mamífero. Ilustrativos de estos documentos son Kucherlapati et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81: 3153 - 3157; Kucherlapati et al. (1985) Mol. Cell. Bio. 5: 714 - 720; Smithies et al. (1985) Nature 317: 230 - 234; Wake et al. (1985) Mol. Cell. Bio. 8: 2080 - 2089; Ayares et al. (1985) Genetics 111: 375 - 388; Ayares et al. (1986) Mol. Cell. Bio. 7: 1656 - 1662; Song et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 84: 6820 - 6824; Thomas et al. (1986) Cell 44: 419 - 428; Thomas y Capecchi, (1987) Cell 51: 503 - 512; Nandi et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 85: 3845 - 3849; y Mansour et al. (1988) Nature 336: 348 - 352; Evans y Kaufman, (1981) Nature 294: 146 - 154; Doetschman et al. (1987) Nature 330: 576 - 578; Thoma y Capecchi, (1987) Cell 51: 503 - 512; Thompson et al. (1989) Cell 56: 316 - 321.

### ***Knockdown de genes /Knockout a través de ARNi***

**[0176]** Una tecnología alternativa para alterar la expresión de un gen es la interferencia de ARN. El ARN interferente (ARNi o ARNip) se describió originalmente en el organismo modelo *C. elegans* (Fire et al., Nature 391: 806-811 (1998), patente de los EE.UU. N° 6.506.559 de Fire et al.). La Patente de EE.UU. N° 6.573.099 y la Publicación PCT N° WO 99/49029 de Benitec Australia Ltd. reivindican construcciones genéticas aisladas que son capaces de retrasar, reprimir o reducir de otro modo la expresión de un gen diana en una célula animal que se transfecta con la construcción genética., en donde la construcción genética contiene al menos dos copias de una secuencia de gen estructural. La secuencia del gen estructural se describe como una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a al menos una región del gen diana, y en donde al menos dos copias de la secuencia del gen estructural se colocan operativamente bajo el control de una única secuencia promotora de tal manera que al menos una copia de la secuencia del gen estructural se coloca operativamente en la orientación con sentido bajo el control de la secuencia promotora. En el campo del xenotrasplante, el ADN construye la expresión motriz de los ARNip y se usó para destruir la expresión de retrovirus endógeno porcino (PERV) en cerdos transgénicos, véase, por ejemplo, Ramsoondar et al., Xenotransplantation. 2009 de mayo a junio; 16 (3): 164-80; Dieckhoff et al., Xenotransplantation. 2008 Feb; 15 (1): 36-45). También se ha usado tecnología de ARNip para destruir alfa1,3 galactosiltransferasa en células porcinas in vitro (Zhu et al., Transplantation, 15 de febrero de 2005; 79 (3): 289-96).

### ***Inserción aleatoria***

**[0177]** El ADN que codifica las secuencias transgénicas puede insertarse aleatoriamente en el cromosoma de una célula. La integración aleatoria puede resultar de cualquier método de introducción de ADN en la célula conocida por un experto en la técnica. Esto puede incluir, pero no se limita a, electroporación, sonoporación, uso de una pistola de genes, lipotransfección, transfección de fosfato de calcio, uso de dendrímeros, microinyección, el uso de vectores virales que incluyen adenovirus, AAV y vectores retrovirales, y ribozimas del grupo II. El ADN que codifica la proteína puede diseñarse para incluir un gen indicador de manera que la presencia del transgén o su producto de expresión se pueda detectar a través de la activación del gen informador. Puede usarse cualquier gen informador conocido en la técnica, tal como los descritos anteriormente. Al seleccionar en cultivo celular aquellas células en las que se ha activado el gen indicador, se pueden seleccionar células que contienen el transgén. En otros aspectos, el ADN que codifica el transgén se puede introducir en una célula mediante electroporación. En otros aspectos, el ADN se puede introducir en una célula mediante lipofección, infección o transformación. La electroporación y/o lipofección pueden usarse para transfectar células de fibroblastos. Las células de fibroblastos transfectadas se pueden usar como

donantes nucleares para transferencia nuclear para generar animales transgénicos como se conoce en la técnica y se describe a continuación.

5 **[0178]** Las células que se han teñido para la presencia de un gen informador se pueden clasificar entonces por FACS para enriquecer la población celular de modo que tenemos un mayor porcentaje de células que contienen el ADN que codifica el transgén de interés. En otras realizaciones, las células clasificadas por FACS pueden cultivarse luego durante un período de tiempo, tal como 12, 24, 36, 48, 72, 96 o más horas o durante un período de tiempo tal que permita que el ADN se integre para producir una población de células transfectadas estables.

10 **Vectores para producir animales transgénicos**

15 **[0179]** Las construcciones de vector de dirección de ácido nucleico se pueden diseñar para llevar a cabo la recombinación homóloga en las células. En una realización, un vector de direccionamiento se diseña usando una "trampa poli(A)". A diferencia de una trampa de promotor, un vector de trampa poli(A) captura un espectro más amplio de genes, incluidos los no expresados en la célula diana (es decir, fibroblastos o células ES). Un vector de trampa poliA incluye un promotor constitutivo que dirige la expresión de un gen marcador seleccionable que carece de una señal poliA. El reemplazo de la señal poliA es un sitio donador de empalme diseñado para empalmar en exones aguas abajo. En esta estrategia, el ARNm del gen marcador seleccionable se puede estabilizar al atrapar una señal poliA de un gen endógeno independientemente de su estado de expresión en las células diana. En un aspecto, se construye un vector de direccionamiento que incluye un marcador seleccionable que es deficiente en señales para la poliadenilación.

25 **[0180]** Estos vectores de direccionamiento pueden introducirse en células de mamífero por cualquier método adecuado que incluye, pero no se limita a, transfección, transformación, transducción mediada por virus o infección con un vector viral. Los vectores de direccionamiento pueden contener un brazo de recombinación en 3' y un brazo de recombinación en 5' (es decir, una secuencia flanqueante) que es homólogo a la secuencia genómica de interés. Los brazos de recombinación 3' y 5' pueden diseñarse de modo que flanqueen los extremos 3' y 5' de al menos una región funcional de la secuencia genómica. La selección de una región funcional puede volverla inactiva, lo que da como resultado la incapacidad de la célula para producir proteína funcional. En otro aspecto, la secuencia de ADN homóloga puede incluir una o más secuencias de intrón y/o exón. Además de las secuencias de ácido nucleico, el vector de expresión puede contener secuencias marcadoras seleccionables, tales como, por ejemplo, secuencias de genes mejorados de Proteína Fluorescente Verde (eGFP), secuencias de iniciación y/o potenciador, secuencias poli A de cola, y/o nucleicos secuencias de ácido que proporcionan la expresión de la construcción en células hospedadoras procariontas y/o eucariotas. El marcador seleccionable puede localizarse entre la secuencia del brazo de recombinación 5' y 3'.

40 **[0181]** La modificación de un locus diana de una célula puede producirse por introducción de ADN en las células, donde el ADN tiene homología con el locus diana e incluye un gen marcador, lo que permite la selección de células que comprenden la construcción integrada. El ADN homólogo en el vector diana se recombinará con el ADN cromosómico en el locus diana. El gen marcador puede estar flanqueado en ambos lados por secuencias de ADN homólogas, un brazo de recombinación 3' y un brazo de recombinación 5'. Los métodos para la construcción de vectores de direccionamiento se han descrito en la técnica, véase, por ejemplo, Dai et al., Nature Biotechnology 20: 251-255, 2002; WO 00/51424.

45 **[0182]** Una variedad de enzimas puede catalizar la inserción de ADN extraño en un genoma huésped. Las integrasas virales, transposasas y recombinasas específicas de sitio median en la integración de genomas de virus, transposones o bacteriófagos en los genomas del huésped. Una amplia colección de enzimas con estas propiedades se puede derivar de una amplia variedad de fuentes. Los retrovirus combinan varias características útiles, que incluyen la relativa simplicidad de sus genomas, la facilidad de uso y su capacidad para integrarse en el genoma de la célula huésped, permitiendo la expresión del transgén a largo plazo en las células transducidas o en su progenie. Por lo tanto, se han utilizado en una gran cantidad de protocolos de terapia génica. Los vectores basados en vectores Lentivirus, han sido candidatos atractivos tanto para la terapia génica como para aplicaciones transgénicas, como el virus asociado a sdeno, que es un virus pequeño de ADN (parvovirus) que se co-replica en células de mamífero junto con virus auxiliares como adenovirus, herpes virus simplex o citomegalovirus humano. El genoma vírico consiste esencialmente en solo dos ORF (rep, una proteína no estructural, y un límite, una proteína estructural) a partir de los cuales (al menos) siete polipéptidos diferentes se derivan mediante corte y empalme alternativo y uso alternativo del promotor. En presencia de un virus auxiliar, las proteínas rep median en la replicación del genoma de AAV. La integración, y por lo tanto una infección de virus latente, se produce en ausencia de virus auxiliar. Los transposones también son de interés. Estos son segmentos de ADN móvil que se pueden encontrar en una variedad de organismos. Aunque los transposones activos se encuentran en muchos sistemas e insectos procariontes, no existen transposones naturales funcionales en los vertebrados. El transposón del elemento P de Drosophila se ha utilizado durante muchos años como herramienta de ingeniería del genoma. El transposón de la bella durmiente se estableció a partir de copias de transposones no funcionales que se encuentran en peces salmónidos y es significativamente más activo en células de mamífero que los transposones procariontes o de insectos. Las recombinasas específicas de sitio son enzimas que catalizan el intercambio de cadena de ADN entre segmentos de ADN que poseen solo un grado limitado de homología de secuencia. Se unen a secuencias de

reconocimiento que tienen entre 30 y 200 nucleótidos de longitud, rompen la cadena principal del ADN, intercambian las dos dobles hélices de ADN implicadas y religan el ADN. En algunos sistemas de recombinación específicos de sitio, un solo polipéptido es suficiente para realizar todas estas reacciones, mientras que otras recombinasas requieren un número variable de proteínas accesorias para cumplir estas tareas. Las recombinasas específicas de sitio pueden agruparse en dos familias de proteínas con distintas propiedades bioquímicas, a saber, recombinasas de tirosina (en las que el ADN se une covalentemente a un residuo de tirosina) y recombinasas de serina (donde se produce unión covalente en un residuo de serina). Las enzimas más populares utilizadas para los enfoques de modificación del genoma son Cre (una recombinasa de tirosina derivada del bacteriófago PI de *E. coli*) e integrasa fC31 (una recombinasa de serina derivada del fago *Streptomyces* fC31). Varias otras recombinasas específicas de sitio derivadas de bacteriófagos (que incluyen Flp, integrasa lambda, recombinasa de bacteriófago HK022, integrasa de bacteriófago R4 y integrasa de fago TP901-1) se han utilizado con éxito para mediar las inserciones génicas estables en genomas de mamíferos. Recientemente, se ha purificado una recombinasa específica de sitio del bacteriófago de *Streptomyces*. La recombinasa fC31 es un miembro de la familia de resolvasa y media en la integración del fago. En este proceso, el sitio attP del bacteriófago se recombina con el sitio attB correspondiente en el genoma bacteriano. El cruce genera dos sitios, attL y attR, que ya no son un objetivo para la acción recombinasa, en ausencia de proteínas accesorias. La reacción también tiene lugar en células de mamífero y, por lo tanto, puede usarse para mediar en la integración de genes terapéuticos específicos del sitio. La especificidad del sitio de las recombinasas de tirosina ha sido difícil de modificar mediante la ingeniería de proteínas directa debido a que el dominio catalítico y el dominio de reconocimiento de ADN están estrechamente entrelazados. Por lo tanto, los cambios en la especificidad suelen ir acompañados de una pérdida de actividad. Las recombinasas de serina podrían ser más susceptibles de ingeniería y un derivado hiperactivo de la resolvasa de Tn3 se modificó mediante el intercambio de la DBD natural por un dominio de dedos de zinc del factor de transcripción Zif268 con dedos de cinc humanos. La especificidad del sitio de ADN de la proteína quimérica resultante, denominada Z-resolvasa, se cambió a la de Zif268. Las proteínas con dedos de cinc pueden modificarse mediante la evolución de proteínas *in vitro* para reconocer cualquier secuencia de ADN, por lo tanto, este enfoque podría permitir el desarrollo de recombinasas quiméricas que pueden integrar genes terapéuticos en ubicaciones genómicas precisas. Los métodos para potenciar o mediar la recombinación incluyen la combinación de recombinación específica de sitio y recombinación homóloga, vector mediado por AAV y recombinación mediada por nucleasa de dedo de cinc (ref: Geurts et al., *Science*, 325: 433, 2009)

**[0183]** El término "vector", como se usa aquí, se refiere a una molécula de ácido nucleico (preferiblemente ADN) que proporciona una propiedad biológica o bioquímica útil para un ácido nucleico insertado. Los "vectores de expresión" de acuerdo con la invención incluyen vectores que son capaces de potenciar la expresión de una o más moléculas que se han insertado o clonado en el vector, tras la transformación del vector en una célula. Los ejemplos de tales vectores de expresión incluyen, fagos, secuencias de replicación autónoma (ARS), centrómeros y otras secuencias que pueden replicarse o replicarse *in vitro* o en una célula, o transportar un segmento de ácido nucleico deseado a una ubicación deseada dentro de una célula de un animal. Los vectores de expresión útiles en la presente invención incluyen vectores derivados de cromosomas, episomas y virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos o bacteriófagos, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como cósmidos y fagotsidos o vectores basados en virus tales como adenovirus, AAV, lentivirus. Un vector puede tener uno o más sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción en los que las secuencias se pueden cortar de una manera determinable sin pérdida de una función biológica esencial del vector, y en las que se puede unir un fragmento de ácido nucleico para provocar su replicación, y clonación. Los vectores pueden proporcionar además sitios de cebador, por ejemplo, para PCR, sitios de iniciación y/o regulación transcripcional y/o de traducción, señales de recombinación, replicones, marcadores seleccionables, etc. Claramente, métodos de inserción de un fragmento de ácido nucleico deseado que no requieren el uso de recombinación homóloga, transposiciones o enzimas de restricción (tales como, pero sin limitación, clonación UDG de fragmentos de PCR (Patente de EE.UU. Nº 5.334.575), clonación de PCR marca TA Cloning® (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) también puede aplicarse para clonar un ácido nucleico en un vector para uso de acuerdo con la presente invención.

**[0184]** Las células homocigóticas en un locus diana se pueden producir mediante la introducción de ADN en las células, donde el ADN tiene homología con el locus diana e incluye un gen marcador, lo que permite la selección de células que comprenden la construcción integrada. El ADN homólogo en el vector diana se recombinará con el ADN cromosómico en el locus diana. El gen marcador puede estar flanqueado en ambos lados por secuencias de ADN homólogas, un brazo de recombinación 3' y un brazo de recombinación 5'. Los métodos para la construcción de vectores de direccionamiento se han descrito en la técnica, véase, por ejemplo, Dai et al. (2002) *Nature Biotechnology* 20: 251 - 255; WO 00/51424, Figura 6; y *Gene Targeting: A Practical Approach*. Joyner, A. Oxford University Press, Estados Unidos; 2ª ed. 15 de febrero de 2000.

**[0185]** Varios constructos se pueden preparar para la recombinación homóloga en un locus diana. Habitualmente, la construcción puede incluir al menos 25 bp, 50 bp, 100 bp, 500 bp, 1 kbp, 2 kbp, 4 kbp, 5 kbp, 10 kbp, 15 kbp, 20 kbp o 50 kbp de secuencia homóloga con el locus diana.

**[0186]** Varias consideraciones pueden estar implicadas en la determinación del grado de homología de secuencias de ADN diana, tales como, por ejemplo, el tamaño del locus diana, la disponibilidad de secuencias, la eficacia relativa de dobles eventos de cruce en el locus diana y la similitud de la secuencia diana con otras secuencias. El

ADN 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 a modificar. La secuencia sustancialmente isogénica puede ser al menos aproximadamente 95%, 97-98%, 99,0-99,5%, 99,6-99,9%, o 100% idéntica a la secuencia diana correspondiente (excepto por las modificaciones de secuencia deseadas). El ADN diana y el ADN diana preferiblemente pueden compartir tramos de ADN de al menos aproximadamente 75, 150 o 500 pares de bases que son 100% idénticos. En consecuencia, el ADN dirigido puede derivarse de células estrechamente relacionadas con la línea celular a la que se dirige; o el ADN diana puede derivarse de células de la misma línea celular o animal que las células a las que se dirige.

**[0187]** Los genes marcadores seleccionables adecuados incluyen, pero no se limitan a: genes que confieren la capacidad de crecer en ciertos sustratos de medios, tales como el gen tk (quinasa de timidina) o el gen HPRT (hipoxantina) que confieren la capacidad de crecer en Medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina); el gen bacteriano gpt (guanina/xantina fosforribosiltransferasa) que permite el crecimiento en medio MAX (ácido micofenólico, adenina y xantina). Véase Song et al. (1987) Proc. Nat'l Acad. Sci. EE.UU. 84: 6820-6824. Véase también Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, véase el capítulo 16. Otros ejemplos de marcadores seleccionables incluyen: genes que confieren resistencia a compuestos tales como antibióticos, genes que confieren la capacidad de crecer en los sustratos seleccionados, genes que codifican proteínas que producen señales detectables tales como luminiscencia, tales como proteína verde fluorescente, proteína fluorescente verde potenciada (eGFP). Se conoce y está disponible 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, (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1: 327 - 341); y el gen de resistencia a la higromicina (hyg) (Nucleic Acids Research 11: 6895-6911 (1983), y Te Riele y otros (1990) Nature 348: 649-651). Los genes informadores adicionales útiles en los métodos de la presente invención incluyen sintasa de acetohidroxiácido (AHAS), fosfatasa alcalina (AP), beta galactosidasa (LacZ), beta glucuronidasa (GUS), acetiltransferasa de cloranfenicol (CAT), proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente roja (RFP), proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente cian (CFP), peroxidasa de rábano picante (HRP), luciferasa (Luc), sintasa de nopalina (NOS), sintasa de octopina (OCS) y sus derivados. Están disponibles múltiples marcadores seleccionables que confieren resistencia a ampicilina, bleomicina, cloranfenicol, gentamicina, higromicina, canamicina, lincomicina, blastidina, zeocina, metotrexato, fosfotricina, puromicina y tetraciclina. Los métodos para determinar la supresión de un gen informador son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, métodos fluorométricos (por ejemplo, espectroscopía de fluorescencia, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), microscopía de fluorescencia), determinación de resistencia a antibióticos.

**[0188]** También se pueden usar combinaciones de marcadores seleccionables. Para usar una combinación de marcadores, el gen HSV-tk se puede clonar de manera que esté fuera del ADN diana (otro marcador seleccionable podría colocarse en el flanco opuesto, si se desea). Después de introducir la construcción de ADN en las células a las que se va a dirigir, las células se pueden seleccionar con los antibióticos apropiados. Los marcadores seleccionables también se pueden usar para la selección negativa. Los mercados de selección negativa generalmente matan las células en las que se expresan, ya sea porque la expresión es tóxica por sí misma o produce un catalizador que conduce a metabolitos tóxicos, como la quinasa de timidina de virus tipo 1 del herpes simple (HSV-tk) o la toxina A de difteria, el marcador de selección negativa se incorpora al vector de direccionamiento de modo que se pierde después de un evento de recombinación preciso. De manera similar, los marcadores seleccionables convencionales tales como GFP pueden usarse para selección negativa usando, por ejemplo, clasificación FACS.

**[0189]** Las deleciones pueden ser al menos aproximadamente 50 pb, más habitualmente al menos aproximadamente 100 pb, y generalmente no más de aproximadamente 20 kpb, donde la eliminación puede incluir normalmente al menos una parte de la región codificante que incluye una parte de o uno o más exones, una porción de uno o más intrones, y pueden incluir o no una porción de las regiones flanqueantes no codificantes, particularmente la región 5 no codificante (región reguladora de la transcripción). Por lo tanto, la región homóloga puede extenderse más allá de la región de codificación en la región 5' no codificante o alternativamente en la región 3 no codificante. Las inserciones generalmente no pueden superar los 10 kbp, generalmente no superan los 5 kbp, generalmente son de al menos 50 bp, más generalmente de al menos 200 bp.

**[0190]** La(s) región(es) de homología puede(n) incluir mutaciones, donde las mutaciones pueden inactivar adicionalmente el gen diana, en el suministro para un desplazamiento del marco, o cambiando un aminoácido clave, o la mutación puede corregir un alelo disfuncional, etc. Por lo general, la mutación puede ser un cambio sutil, que no exceda aproximadamente el 5% de las secuencias flanqueantes homólogas o incluso un único cambio de nucleótido tal como una mutación puntual en un sitio activo de un exón. Cuando se desea la mutación de un gen, el gen marcador puede insertarse en un intrón, para ser escindido del gen diana tras la transcripción.

**[0191]** Varias consideraciones pueden estar implicadas en la determinación del grado de homología de secuencias de ADN diana, tales como, por ejemplo, el tamaño del locus diana, la disponibilidad de secuencias, la eficacia relativa de dobles eventos de cruce en el locus diana y la similitud de la secuencia diana con otras secuencias. El ADN 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 a modificar. La secuencia

sustancialmente isogénica puede ser al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 97% o al menos aproximadamente 98% o al menos aproximadamente 99% o entre 95 y 100%, 97-98%, 99,0-99,5%, 99,6-99,9 %, o 100% idéntico a la secuencia diana correspondiente (excepto para las modificaciones de secuencia deseadas). En una realización particular, el ADN diana y el ADN diana pueden compartir tramos de ADN de al menos aproximadamente 75, 150 o 500 pares de bases que son 100% idénticos. En consecuencia, el ADN dirigido puede derivarse de células estrechamente relacionadas con la línea celular a la que se dirige; o el ADN diana puede derivarse de células de la misma línea celular o animal que las células a las que se dirige.

**[0192]** La construcción se puede preparar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, se pueden unir varios fragmentos, se pueden introducir en vectores apropiados, clonar, analizar y luego manipular más hasta que se haya logrado la construcción deseada. Se pueden realizar diversas modificaciones a la secuencia, para permitir el análisis de restricción, la escisión, la identificación de sondas, etc. Se pueden introducir mutaciones silenciosas, según se desee. En diversas etapas, pueden emplearse análisis de restricción, secuenciación, amplificación con la reacción en cadena de la polimerasa, reparación del cebador, mutagénesis in vitro, etc.

**[0193]** 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. Se puede emplear un marcador, igual o diferente al marcador que se utilizará para la inserción, que se puede eliminar antes de la introducción en la célula diana. Una vez que se ha completado el vector que contiene la construcción, se puede manipular adicionalmente, tal como mediante eliminación de las secuencias bacterianas, linealización, introduciendo una deleción corta en la secuencia homóloga. Después de la manipulación final, la construcción se puede introducir en la célula.

**[0194]** Las técnicas que pueden usarse para permitir la entrada de la construcción de ADN o ARN a la célula huésped incluyen coprecipitación de fosfato/ADN de calcio, microinyección de ADN en el núcleo, electroporación, fusión de protoplastos bacterianos con células intactas, transfección, lipofección, infección, bombardeo de partícula, transferencia génica mediada por esperma, o cualquier otra técnica conocida por un experto en la técnica. El ADN o ARN puede ser de ADN monocatenario o bicatenario, lineal o circular, relajado o superenrollado. Para diversas técnicas para transfectar células de mamífero, véase, por ejemplo, Keown et al., *Methods in Enzymology* vol. 185, págs. 527 - 537 (1990).

**[0195]** Los siguientes vectores se proporcionan a modo de ejemplo. Bacteriano: pBs, pQE-9 (Qiagen), phagescript, PsiX174, 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 (Farmacia). Además, se pueden usar otros plásmidos y vectores siempre que sean replicables y viables en el huésped. Los vectores conocidos en la técnica y los disponibles comercialmente (y variantes o derivados de los mismos) pueden modificarse de acuerdo con la invención para incluir uno o más sitios de recombinación para uso en los métodos descritos en este documento. Dichos vectores pueden obtenerse, por ejemplo, de Vector Laboratories Inc., Invitrogen, Promega, Novagen, NEB, Clontech, Boehringer Mannheim, Pharmacia, EpiCenter, OriGenes Technologies Inc., Stratagene, PerkinElmer, Pharmingen y Research Genetics. Otros vectores de interés incluyen vectores de expresión eucarióticos tales como pFastBac, pFastBacHT, pFastBacDUAL, pSFV y pTet-Splice (Invitrogen), pEUK-C1, pPUR, pMAM, pMAMneo, pBI101, pBI121, pDR2, pCMVEBNA y pYACneo (Clontech), pSVK3, pSVL, pMSG, pCH110 y pKK232-8 (Pharmacia, Inc.), p3'SS, pXT1, pSG5, pPCAB, pMbac, pMC1neo, y pOG44 (Stratagene, Inc.), y pYES2, pAC360, pBlueBacHis A, B, y C, pVL1392, pBlueBacIII, pCDM8, pcADN1, pZeoSV, pcADN3 pREP4, pCEP4 y pEBVHis (Invitrogen, Corp.) y variantes o derivados de los mismos.

**[0196]** Otros vectores incluyen pUC18, pUC19, pBlueScript, pSPORT, cósmidos, fagémidos, CAL (cromosomas artificiales de levadura), CAB (cromosomas artificiales bacterianos), PI (fago de *Escherichia coli*), pQE70, pQE60, pQE9 (cuarentenario), vectores pBS, vectores PhageScript, vectores BlueScript, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A (Stratagene), pcADN3 (Invitrogen), pGEX, pTrsfus, pTrc99A, pET-5, pET-9, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia), pSPORT1, pSPORT2, pCMVSPORT2.0 y pSY-SPORT1 (Invitrogen) y variantes o derivados de los mismos. También se pueden usar vectores virales, tales como vectores lentivirales (véase, por ejemplo, el documento WO 03/059923; Tiscornia y col., *PNAS* 100: 1844-1848 (2003)).

**[0197]** Vectores adicionales de interés incluyen pTrxFus, pThioHis, pLEX, pTrcHis, pTrcHis2, pRSET, pBlueBacHis2, pcADN3.1/His, pcADN3.1 (-)/Myc-His, pSecTag, pEBVHis, pPIC9K, pPIC3.5K, pAO81S, pPICZ, pPICZA, pPICZB, pPIC-ZC, pGAPZA, pGAPZB, pGAPZC, pBlueBac4.5, pBlueBacHis2, pMelBac, pSinRep5, pSinHis, pIND, pIND (SP1), pV-gRXR, pcADN2.1, pYES2, pZerO1.1, pZerO-2.1, pCR-Blunt, pSE280, pSE380, pSE420, pVL1392, pVL1393, pCDM8, pcADN1.1, pcADN1.1/Amp, pcADN3.1, pcADN3.1/Zeo, pSe, SV2, pRc/CMV2, pRc/RSV, pREP4, pREP7, pREP8, pREP9, pREP10, pCEP4, pEBVHis, pCR3.1, pCR2.1, pCR3.1-Uni, y pCRBac de Invitrogen;  $\lambda$  ExCell,  $\lambda$  gt11, pTrc99A, pKK223-3, pGEX-1  $\lambda$  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-32L1C, pET-30LIC, pCAB-2cp LIC, pCABgus-2cp LIC, pT7Blue-2 LIC, pT7Blue-2,  $\lambda$  SCREEN-1,  $\lambda$  BlueSTAR, pET-3abcd, pET-7abc, pET9abcd, pET 11abcd, 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 (+), pCAB-1, pCABgus-1, pCAB4x-1, pCABgus4x-1, pCAB-3cp, pCABgus-2cp, pCABsurf-1, plg, señal 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, pGADIO, pGilda, pEZM3, pEGFP, pEGFP-1, pEGFP-N, pEGFP-C, pEBFP, pGFPuv, pGFP, p6xHis-GFP, pSEAP2-Básico, pSEAP2-Contral, pSEAP2-Promotor, pSEAP2-Potenciador, p  $\beta$  gal-Básico, p $\beta$ gal-Control, p $\beta$ gal-Promotor, p $\beta$ gal-Potenciador, pCMV, pTet-Off, pTet-On, pTK-Hyg, pRetro-Off, pRetro-On, pIRESneo, pIRESHyg, pLXSN, pLNCX, pLAPSN, pMAMneo, pMAMneo-CAT, pMAMneo-LUC, pPUR, pSV2neo, pYEX4T-1/2/3, pYEX-S1, pCABPAK- His, pCABPAK8/9, pAcUW31, BacPAK6, pTriplEx,  $\lambda$ gt10,  $\lambda$ gt11, pWE15 y  $\lambda$ TripleEx de Clontech; Lambda ZAP II, pBK-CMV, pBK-RSV, p Bluescript 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, pOPRS-VI/MCS, pOPI3 CAT, pXT1, pSG5, pPCAB, pMbac, pMCIneo, pMCIneo PoliA, pOG44, pOG45, pFRT $\beta$ GAL, pNEO $\beta$ GAL, pRS403, pRS404, pRS405, pRS406, pRS413, pRS414, pRS415 y pRS416 de Stratagene.

**[0198]** Vectores adicionales incluyen, 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.

## **Promotores**

**[0199]** Las construcciones de vectores usadas para producir los animales de la invención pueden incluir secuencias reguladoras, que incluyen, por ejemplo, un promotor, unido de forma operativa a la secuencia. Un gran número de vectores y promotores adecuados son conocidos por los expertos en la técnica, y están disponibles comercialmente.

**[0200]** Aquí se describen animales, órganos, tejidos y células que expresan un transgén, y en particular un transgén inmunógeno o anticoagulante, en el endotelio. Para dirigir la expresión a un tejido particular, el animal se desarrolla utilizando un vector que incluye un promotor específico para la expresión génica endotelial.

**[0201]** En un aspecto, la construcción de ácido nucleico contiene una secuencia reguladora operativamente ligada a la secuencia transgénica a expresar. La secuencia reguladora puede ser una secuencia promotora. El promotor puede ser un promotor regulable. En tales sistemas, los fármacos, por ejemplo, pueden usarse para regular si el péptido se expresa en el animal, tejido u órgano. Por ejemplo, se puede evitar la expresión mientras que el órgano o tejido es parte del cerdo, pero la expresión se induce una vez que el cerdo se ha trasplantado al ser humano durante un período de tiempo para superar la respuesta inmune celular. Además, el nivel de expresión puede controlarse mediante un sistema promotor regulable para garantizar que no se produzca la inmunosupresión del sistema inmune del receptor. El sistema promotor regulable se puede seleccionar de, pero no se limita a, los siguientes sistemas génicos: un promotor de metalotioneína, inducible por metales tales como el cobre (véase Lichtlen y Schaffner, *Swiss Med Wkly.*, 2001, 131 (45-46) : 647-52); un sistema regulado por tetraciclina (véase Imhof et al., *J Gene Med.*, 2000, 2 (2): 107 - 16); un sistema regulado por ecdisona (véase Saez y col., *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 2000, 97 (26): 14512-7); un promotor inducible de citocromo P450, tal como el promotor CYP1A1 (véase Fujii-Kuriyama y col., *FASEB J.*, 1992, 6 (2): 706-10); un sistema inducible de mifepristona (véase Sirin y Park, *Gene.*, 2003, 323: 67-77); un sistema activado por cumarina (véase Zhao et al., *Hum Gene Ther.*, 2003, 14 (17): 1619 - 29); un sistema inducible por macrólidos (que responde a antibióticos macrólidos tales como rapamicina, eritromicina, claritromicina y roxitromicina) (véase Weber et al., *Nat Biotechnol.*, 2002, 20 (9): 901 - 7; Wang et al., *Mol Ther.*, 2003, 7 (6): 790 - 800); un sistema inducido por etanol (véase Garoosi y col., *J Exp Bot.*, 2005, 56 (416): 163542; Roberts y col., *Plant Physiol.*, 2005, 138 (3): 1259 - 67); un sistema inducible por estreptogramina (véase Fussenegger et al., *Nat Biotechnol.*, 2000 18 (11): 1203-8) un sistema inducible electrófilo (véase Zhu y Fahl, *Biochem Biophys Res Commun.*, 2001, 289 (1): 212- 9); y un sistema inducible por nicotina (véase Malphettes et al., *Nucleic Acids Res.*, 2005, 33 (12): e107).

**[0202]** En realizaciones particulares, el promotor es un promotor específico de tejido tal como los descritos en este documento. El promotor específico de tejido se puede usar en particular para la expresión de un anticoagulante o inmunosupresor. El promotor específico de tejido es más preferiblemente un promotor endotelial específico. En una realización, el promotor específico endotelial es el promotor Tie-2 de ratón (véase, por ejemplo, Schlaeger y col., 1997 *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 1 de abril; 94 (7): 3058-63). En otra realización, el promotor endotelial específico es el promotor ICAM-2 porcino (véase, por ejemplo, Godwin et al., 2006. *Xenotransplantation*, Nov; 13 (6): 514-21). En otras realizaciones, se obtiene un elemento potenciador usado en la construcción de ácido nucleico para facilitar el aumento de la expresión del transgén de una manera específica de tejido. Los potenciadores son elementos externos que alteran drásticamente la eficiencia de la transcripción de genes (*Molecular Biology of the Gene*, Cuarta Edición, págs. 708-710, Benjamin Cummings Publishing Company, Menlo Park, CA©1987). En ciertas realizaciones, el animal expresa un transgén bajo el control de un promotor en combinación con un elemento potenciador. En realizaciones particulares, el animal incluye un elemento promotor específico endotelial, tal como un promotor de ICAM-2 porcino o Tie-2 murino, y además incluye un elemento potenciador. En algunas realizaciones, el promotor se usa en combinación con un elemento potenciador que es una región no codificadora o intrónica del ADN intrínsecamente asociada o localizada con el promotor. En una realización específica, el elemento potenciador es

Tie-2 usado en combinación con el promotor Tie-2. En otra realización específica, el elemento potenciador es ICAM-2 usado en combinación con el promotor ICAM-2. En otras realizaciones, el promotor puede ser un promotor ubicuo. Los promotores ubicuos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: promotores virales como CMV, SV40. Los promotores adecuados también incluyen promotor beta-actina, promotor gamma-actina, promotores GAPDH, H<sub>2</sub>K, ubiquitina y el promotor rosa.

### **Selección de células transgénicas**

**[0203]** En algunos casos, las células transgénicas tienen modificaciones genéticas que son el resultado de inserción o integración transgénica dirigida (es decir, mediante recombinación homóloga) en el genoma celular. En algunos casos, las células transgénicas tienen modificaciones genéticas que son el resultado de una integración no dirigida (aleatoria) en el genoma celular. Las células se pueden cultivar en un medio seleccionado adecuadamente para identificar las células que proporcionan la integración adecuada. Aquellas células que muestran el fenotipo deseado pueden analizarse adicionalmente por análisis de restricción, electroforesis, análisis Southern, reacción en cadena de polimerasa u otra técnica conocida en la técnica. Al identificar fragmentos que muestran la inserción apropiada en el sitio del gen diana (o, en aplicaciones no dirigidas, donde las técnicas de integración aleatoria han producido el resultado deseado), se pueden identificar las células en las que la recombinación homóloga (o los eventos de integración no dirigidos deseados) ha ocurrido para inactivar o modificar el gen diana.

**[0204]** La presencia del gen marcador seleccionable establece la integración de la construcción diana en el genoma del huésped. Aquellas células que muestran el fenotipo deseado pueden analizarse posteriormente mediante análisis de restricción, electroforesis, análisis Southern, reacción en cadena de la polimerasa, etc. para analizar el ADN con el fin de establecer si se produjo una recombinación homóloga o no homóloga. Esto puede determinarse empleando sondas para el inserto y luego secuenciación de las regiones 5' y 3' que flanquean al inserto para detectar la presencia del gen que se extiende más allá de las regiones flanqueantes del constructo o identificar la presencia de una delección, cuando tal delección es presentada. También se pueden usar cebadores que son complementarios a una secuencia dentro de la construcción y complementarios a una secuencia fuera de la construcción y en el locus diana. De esta forma, solo se pueden obtener dúplex de ADN que tengan ambos cebadores presentes en las cadenas complementarias si se ha producido recombinación homóloga. Por ejemplo, al demostrar la presencia de las secuencias de cebador o la secuencia de tamaño esperado, se respalda la aparición de recombinación homóloga.

**[0205]** La reacción en cadena de la polimerasa usada para seleccionar eventos de recombinación homóloga se describe en Kim y Smithies, (1988) *Nucleic Acids Res.* 16: 8887 - 8903; y Joyner et al. (1989) *Nature* 338: 153 - 156.

**[0206]** Las líneas celulares obtenidas a partir de la primera ronda de selección dirigida (o de integración no dirigida (aleatoria) en una ubicación deseada) son probablemente heterocigóticas para el alelo integrado. La homocigosidad, en la que ambos alelos se modifican, se puede lograr de varias maneras. Un enfoque consiste en hacer crecer una serie de células en las que se ha modificado una copia y luego someter estas células a otra ronda de segmentación (o integración no dirigida (aleatoria)) usando un marcador seleccionable diferente. Alternativamente, los homocigotos se pueden obtener reproduciendo animales heterocigotos para el alelo modificado. En algunas situaciones, puede ser deseable tener dos alelos modificados diferentes. Esto se puede lograr por rondas sucesivas de la orientación génica (o integración aleatoria) o mediante la reproducción de heterocigotos, cada uno de los cuales lleva uno de los alelos modificados deseados. En ciertas realizaciones, al menos un elemento del animal se obtiene por selección de una mutación que se produce espontáneamente en un alelo, en particular para desarrollar un animal homocigótico. En ciertas realizaciones, se usa una técnica de selección para obtener células knock-out homólogas de células heterocigóticas por exposición a niveles muy altos de un agente de selección. Dicha selección puede ser, por ejemplo, mediante el uso de un antibiótico tal como geneticina (G418).

**[0207]** Las células que se han transfectado o han recibido de otro modo un vector apropiado se pueden seleccionar o identificar mediante análisis de genotipo o fenotipo. En una realización, las células se transfectan, crecen en un medio seleccionado apropiadamente para identificar las células que contienen el vector integrado. La presencia del gen marcador seleccionable indica la presencia de la construcción transgénica en las células transfectadas. Aquellas células que muestran el fenotipo deseado pueden analizarse posteriormente mediante análisis de restricción, electroforesis, análisis Southern, reacción en cadena de la polimerasa, etc. para analizar el ADN con el fin de verificar la integración de transgén(es) en el genoma de las células huésped. También se pueden usar cebadores que son complementarios a la(s) secuencia(s) transgénica(s). La reacción en cadena de la polimerasa usada para seleccionar eventos de recombinación homóloga e integración aleatoria es conocida en la técnica, véase, por ejemplo, Kim y Smithies, *Nucleic Acids Res.* 16: 8887 - 8903, 1988; y Joyner et al., *Nature* 338: 153-156, 1989. La combinación específica de un potenciador de poliovirus mutante y un promotor de quinasa de timidina para conducir el gen de la neomicina ha demostrado ser activo tanto en células madre embrionarias como en células EC por Thomas y Capecchi, supra, 1987; Nicholas y Berg (1983) en *Teratocarcinoma Stem Cell*, eds. Siver, Martin y Strikland (Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY (páginas 469-497), y Linney y Donerly, *Cell* 35: 693-699, 1983.

**[0208]** Las células que se han sometido a recombinación homóloga se pueden identificar mediante varios métodos. En una realización, el método de selección puede detectar la ausencia de una respuesta inmune contra la célula, por

ejemplo, por un anticuerpo anti-gal humano. En otras realizaciones, el método de selección puede incluir la evaluación del nivel de coagulación en sangre humana cuando se expone a una célula o tejido. La selección mediante resistencia a antibióticos se ha utilizado con mayor frecuencia para la detección. Este método puede detectar la presencia del gen de resistencia en el vector de direccionamiento, pero no indica directamente si la integración fue un evento de recombinación dirigida o una integración aleatoria. Alternativamente, el marcador puede ser un gen marcador fluorescente tal como GFP o RFP, o un gen que es detectable en la superficie celular mediante clasificación celular o análisis de FAC. Cierta tecnología, como Poli A y la tecnología de trampa de promotor, aumentan la probabilidad de eventos específicos, pero nuevamente, no brindan evidencia directa de que se haya logrado el fenotipo deseado. Además, las formas negativas de selección se pueden utilizar para seleccionar para la integración dirigida; en estos casos, el gen de un factor letal para las células (p. ej. Tk o toxina diftérica A) se inserta de tal forma que solo los eventos específicos permiten que la célula evite la muerte. Las células seleccionadas mediante estos métodos pueden someterse a ensayo en cuanto a interrupción génica, integración del vector y, finalmente, agotamiento del gen. En estos casos, dado que la selección se basa en la detección de la integración del vector de direccionamiento y no en el fenotipo alterado, solo se pueden detectar los knockouts dirigidos, no las mutaciones puntuales, los reordenamientos o truncamientos de genes u otras modificaciones de este tipo.

**[0209]** La caracterización se puede llevar a cabo adicionalmente mediante las siguientes técnicas, que incluyen, pero no se limitan a: análisis de PCR, análisis de transferencia Southern, análisis de transferencia Northern, ensayos de unión a lectina específica, y/o análisis de secuenciación. La caracterización fenotípica también se puede lograr, incluyendo la unión de anticuerpos anti-ratón en diversos ensayos que incluyen inmunofluorescencia, inmunocitoquímica, ensayos ELISA, citometría de flujo, transferencia Western, pruebas para la transcripción de ARN en células tales como por RT-PCR.

**[0210]** Los animales o células GTKO contienen modificaciones genéticas adicionales. Las modificaciones genéticas pueden incluir algo más que una selección homóloga, pero también pueden incluir integraciones aleatorias de genes exógenos, mutaciones, deleciones e inserciones de genes de cualquier tipo. Las modificaciones genéticas adicionales se pueden realizar modificando genéticamente las células obtenidas a partir de las células y animales transgénicos descritos en la presente invención o criando los animales descritos en la presente memoria con animales que se han modificado genéticamente adicionalmente. Dichos animales pueden modificarse para eliminar la expresión de al menos un alelo del gen  $\alpha$ GT, el gen de la hidroxilasa CMP-Neu5Ac (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N° 7.368.284), el gen de la sintasa iGb3 (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de EE.UU. N° 2005/0155095), y/o el gen de sintasa Forssman (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de EE.UU. N° 2006/0068479). En aspectos adicionales, los animales descritos en este documento también pueden contener modificaciones genéticas para expresar fucosiltransferasa, sialiltransferasa y/o cualquier miembro de la familia de las glucosiltransferasas. Para lograr estas modificaciones genéticas adicionales, las células pueden modificarse para contener múltiples modificaciones genéticas. En otros aspectos, los animales se pueden criar juntos para lograr múltiples modificaciones genéticas. En un aspecto específico, los animales, tales como cerdos, que carecen de expresión de inmunoglobulina funcional, producidos de acuerdo con el proceso, secuencias y/o constructos descritos en este documento, pueden criarse con animales, tales como cerdos, que carecen de expresión de  $\alpha$ GT (por ejemplo, como se describe en el documento WO 04/028243).

**[0211]** En otro aspecto, la expresión de genes adicionales responsables del rechazo de xenoinjertos se puede eliminar o reducir. Dichos genes incluyen, pero no se limitan al gen de hidroxilasa CMP-NEUAc, el gen de sintasa isoGlobósido 3 y el gen de sintasa de Forssman.

**[0212]** Además, los genes o proteínas relacionadas con complemento de codificación de ADNc, que son responsables de la supresión de la lisis mediada por complemento también se puede expresar en los animales y tejidos. Dichos genes incluyen, pero no se limitan a, CD59, DAF (CD55) y CD46 (véase, por ejemplo, WO 99/53042; Chen et al., Xenotransplantation, Volumen 6, Número 3, página 194-agosto de 1999, que describe cerdos que expresan Transgenes CD59/DAF; Costa C y col., Xenotransplantation 2002 enero; 9 (1): 45 - 57, que describe cerdos transgénicos que expresan CD59 y H-transferasa humana; Zhao L et al.; Diamond L E et al. Transplantation. 2001 15 de enero; 71 (1): 132-42, que describe un CD46 humano cerdos transgénicos).

**[0213]** Las modificaciones adicionales pueden incluir la expresión de compuestos, tales como anticuerpos, que disminuyen la expresión de una molécula de adhesión celular por las células, tal como se ha descrito 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 estimulación simultánea por la señal 2, tal como mediante administración al receptor de órgano de una forma soluble de CTLA-4 del organismo donador xenogénico, por ejemplo como se describe en el documento WO 99/57266, titulado "Immunosuppression by blocking T cell co-stimulation signal 2 (B7/CD28 interaction)".

### **Transferencia Nuclear**

**[0214]** Los animales transgénicos modificados genéticamente tales como ungulados o cerdos descritos en este documento pueden producirse usando cualquier técnica adecuada conocida en la técnica. Estas técnicas incluyen, pero no se limitan a, microinyección (por ejemplo, de pronúcleos), transferencia génica mediada por espermatozoides,

electroporación de óvulos o cigotos y/o trasplante nuclear. La transferencia génica mediada por esperma puede usarse para producir los ungulados genéticamente modificados descritos en este documento. Los métodos y composiciones descritos en este documento para insertar transgenes pueden usarse para modificar genéticamente células de esperma a través de cualquier técnica descrita en este documento o conocida en la técnica. Los espermatozoides modificados genéticamente se pueden utilizar para impregnar a un receptor femenino mediante inseminación artificial, inyección de esperma intracitoplásmico o cualquier otra técnica conocida. El espermatozoide se puede incubar con el ácido nucleico exógeno durante un período de tiempo suficiente. Los periodos de tiempo suficientes incluyen, por ejemplo, de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 5 minutos, típicamente de aproximadamente 45 segundos a aproximadamente 3 minutos, más típicamente de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 2 minutos.

**[0215]** El uso potencial de las células de esperma como vectores para la transferencia de genes se sugirió por primera vez por Brackeff et al., Proc., Natl. Acad. Sci. EE.UU. 68: 353 - 357 (1971). Esto fue seguido por informes de la producción de ratones y cerdos transgénicos después de la fertilización in vitro de ovocitos con esperma que habían sido incubados por ADN desnudo (véase, por ejemplo, Lavitrano et al., Cell 57: 717-723 (1989) y Gandolfi y col., Journal of Reproduction and Fertility Abstract Series 4, 10 (1989)), aunque otros laboratorios no pudieron repetir estos experimentos (véase, por ejemplo, Brinster y col., Cell 59: 239-241 (1989) y Gavora et al. al., Canadian Journal of Animal Science 71: 287 - 291 (1991)). Desde entonces, se ha logrado una transferencia génica mediada por esperma exitosa en pollo (véase, por ejemplo, Nakanishi e Iritani, Mol. Reprod. Dev. 36: 258 - 261 (1993)); ratones (véase, por ejemplo, Maione, Mol. Reprod. Dev. 59: 406 (1998)); y cerdos (véase, por ejemplo, Lavitrano y col., Transplant, Proc. 29: 3508-3509 (1997); Lavitrano y col., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 99: 14230-5 (2002); Lavitrano et al. al., Mol. Reprod. Dev. 64 - 284 - 91 (2003)). Técnicas similares también se describen en la patente de los EE.UU. N° 6.376.743; emitido el 23 de abril de 2002; Publicaciones de Patente de EE.UU. N° 20010044937, publicada el 22 de noviembre de 2001 y 20020108132, publicada el 8 de agosto de 2002). La inyección intracitoplasmática de esperma se puede usar para producir los ungulados genéticamente modificados descritos en este documento. Esto se puede lograr coinsertando un ácido nucleico exógeno y un espermatozoide en el citoplasma de un ovocito no fertilizado para formar un ovocito fertilizado transgénico, y permitiendo que el ovocito transgénico fertilizado se desarrolle en un embrión transgénico y, si se desea, en una descendencia viva. Los espermatozoides pueden ser una cabeza de esperma alterada por la membrana o una cabeza de esperma desmembranizada. La etapa de inserción de monedas puede incluir la subetapa de preincubar los espermatozoides con el ácido nucleico exógeno durante un período de tiempo suficiente, por ejemplo, de aproximadamente 30 segundos a aproximadamente 5 minutos, típicamente de aproximadamente 45 segundos a aproximadamente 3 minutos, más típicamente de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 2 minutos. La inserción de la esperma y el ácido nucleico exógeno en el ovocito puede ser a través de microinyección. El ácido nucleico exógeno mezclado con el esperma puede contener más de un transgén, para producir un embrión que es transgénico para más de un transgén como se describe aquí. La inyección intracitoplásmica de espermatozoides puede realizarse mediante cualquier técnica conocida en la técnica, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 6.376.743.

**[0216]** Cualquier técnica adicional conocida en la técnica se puede usar para introducir el transgén en animales. Tales técnicas incluyen, pero no se limitan a microinyección pronuclear (véase, por ejemplo, Hoppe, PC y Wagner, TE, 1989, Patente de EE.UU. N° 4.873.191); transferencia génica mediada por retrovirus en líneas germinales (véase, por ejemplo, Van der Putten y col., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 82: 6148-6152); orientación genética en células madre embrionarias (véase, por ejemplo, Thompson et al., 1989, Cell 56: 313-321; Wheeler, MB, 1994, WO 94/26884); electroporación de embriones (véase, por ejemplo, Lo, 1983, Mol Cell. Biol. 3: 1803-1814); pistola celular; transfección; transducción; infección retroviral; infección adenoviral; infección asociada a adenovirus; transferencia de genes mediada por liposomas; transferencia de ADN desnudo; y transferencia génica mediada por esperma (véase, por ejemplo, Lavitrano et al., 1989, Cell 57: 717-723); etc. Para una revisión de tales técnicas, véase, por ejemplo, Gordon, 1989, Transgenic Animals, Intl. Rev. Cytol. 115: 171-229. En particular, la expresión de genes de fusión de CTLA4 y/o CTLA4-Ig en ungulados se puede lograr a través de estas técnicas. La microinyección de las construcciones que codifican el transgén puede usarse para producir los animales transgénicos. El constructo o vector de ácido nucleico puede microinyectarse en los pronúcleos de un cigoto. El constructo o vector puede inyectarse en los pronúcleos masculinos de un cigoto. El constructo o vector puede inyectarse en los pronúcleos femeninos de un cigoto. El constructo o vector puede inyectarse a través de transferencia génica mediada por esperma.

**[0217]** La microinyección del constructo de transgén o vector puede incluir los siguientes pasos: superovulación de una hembra donante; extracción quirúrgica del huevo, fertilización del huevo; inyección de la unidad de transcripción transgénica en los pronúcleos del embrión; e introducción del embrión transgénico en el tracto reproductivo de una madre huésped pseudopreñada, generalmente de la misma especie. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.873.191, Brinster, y col. 1985. PNAS 82: 4438; Hogan, et al., en "Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1986. Robertson, 1987, en Robertson, ed. "Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells a Practical Approach" IRL Press, Evnsham. Oxford, Inglaterra. Pedersen, et al., 1990. "Transgenic Techniques in Mice--A Video Guide", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY Los cerdos transgénicos se producen rutinariamente mediante la microinyección de una construcción o vector de transgén en embriones de cerdo. En una realización, la presencia del transgén puede detectarse aislando ADN genómico del tejido de la cola de cada lechón y sometiendo aproximadamente 5 microgramos de este ADN

genómico a análisis de hibridación de ácido nucleico con una sonda específica de transgén. En una realización particular, los animales transgénicos se pueden producir de acuerdo con cualquier método conocido por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en Bleck et al., *J. Anim. Sci.*, 76: 3072 [1998]; también se describe en la patente de los EE.UU. N<sup>os</sup> 6.872.868; 6.066.725; 5.523.226; 5.453.457; 4.873.191; 4.736.866; y/o publicación PCT N<sup>o</sup> WO/9907829. El método de microinyección pronuclear puede incluir enlazar al menos aproximadamente 50, 100, 200, 300, 400 o 500 copias de la construcción o vector que contiene el transgén de la presente divulgación a un promotor de elección, por ejemplo, como se describe aquí, y luego el ADN extraño se puede inyectar a través de una aguja de vidrio fino en huevos fertilizados. El ADN se puede inyectar en el pronúcleo masculino del cigoto. Los cigotos de cerdo son opacos y la visualización de las estructuras nucleares puede ser difícil. Los pronúcleos o núcleos de cigotos de cerdo se pueden visualizar después de la centrifugación, por ejemplo, a 15.000 g por 3 mm. La inyección del pronúcleo se puede llevar a cabo bajo magnificación y uso de un aparato de microinyección estándar. El cigoto puede sostenerse con una pipeta de contención roma y la zona pelúcida, la membrana plasmática y la envoltura pronuclear pueden penetrarse con una pipeta de inyección. La pipeta de contención roma puede tener un diámetro pequeño, por ejemplo, aproximadamente 50  $\mu$ m. La pipeta de inyección puede tener un diámetro más pequeño que la pipeta de retención, por ejemplo, aproximadamente 15  $\mu$ m. La integración del ADN se produce durante la replicación como una función reparadora del ADN del huésped. Estos huevos, que contienen el ADN extraño, pueden luego implantarse en madres sustitutas para la gestación del embrión según cualquier técnica conocida por los expertos en la materia. La microinyección pronuclear se puede realizar en el cigoto 12 horas después de la fertilización. La captación de dichos genes puede retrasarse durante varios ciclos celulares. La consecuencia de esto es que, dependiendo del ciclo celular de captación, solo algunos linajes celulares pueden transportar el transgén, lo que da como resultado una descendencia en mosaico. Si se desea, los animales de mosaico pueden ser criados para formar verdaderos animales transgénicos de línea germinal.

**[0218]** En otros aspectos, las células de ungulados tales como las células porcinas que contienen transgenes se pueden usar como células donantes para proporcionar el núcleo para la transferencia nuclear a oocitos enucleados para producir animales transgénicos clonados. La célula ungulada no necesita expresar la proteína de transgén para ser útil como célula donadora para transferencia nuclear. En una realización, la célula porcina puede modificarse por ingeniería genética para expresar un transgén a partir de una construcción o vector de ácido nucleico que contiene un promotor. Alternativamente, las células porcinas pueden manipularse genéticamente para expresar el transgén bajo el control de un promotor endógeno mediante recombinación homóloga. En una realización, la secuencia de ácido nucleico transgénica puede insertarse en el genoma bajo el control de un promotor específico de tejido, potenciador específico de tejido o ambos. En otra realización, la secuencia de ácido nucleico transgénico puede insertarse en el genoma bajo el control de un promotor ubicuo. Se describen vectores de direccionamiento, que están diseñados para permitir la recombinación homóloga dirigida en células somáticas. Estos vectores de direccionamiento pueden transformarse en células de mamífero para dirigirse a los genes endógenos de interés mediante recombinación homóloga. En una realización, la construcción de direccionamiento inserta tanto la secuencia de nucleótidos transgénicos como un gen creador seleccionable en el gen endógeno para estar en el marco de lectura con la secuencia corriente arriba y producir una proteína de fusión activa. Las células se pueden transformar con las construcciones usando los métodos descritos en la presente memoria y se seleccionan por medio del marcador seleccionable y luego se seleccionan por la presencia de recombinantes.

**[0219]** Se divulga aquí un método para clonar un ungulado tal como un cerdo que contiene ciertos transgenes mediante transferencia nuclear de células somáticas. En general, el cerdo puede producirse mediante un proceso de transferencia nuclear que comprende los siguientes pasos: obtener células de cerdo diferenciadas deseadas para uso como fuente de núcleos donantes; obtener oocitos de un cerdo; dichos oocitos enucleados; transferir la célula diferenciada deseada o núcleo celular al oocito enucleado, por ejemplo, mediante fusión o inyección, para formar unidades de transferencia nuclear (NT); activar la unidad NT resultante; y transferir dicha unidad NT cultivada a un cerdo huésped de modo que la unidad NT se desarrolle en un feto.

**[0220]** Las técnicas de transferencia nuclear o las técnicas de trasplante nuclear son conocidas en la técnica (véase, por ejemplo, Dai y col., *Nature Biotechnology* 20: 251-255; Polejaeva y col., *Nature* 407: 86-90 (2000); Campbell, et al., *Theriogenology* 68 Suppl 1: S214-3 1 (2007); Vajta, y col., *Reprod Fertil Dev* 19 (2): 403 - 23 (2007); Campbell y otros (1995) *Theriogenology*, 43: 181; Collas, et al. (1994) *Mol. Report Dev.*, 38: 264 - 267; Keefer et al. (1994) *Biol. Reprod.*, 50: 935 - 939; Sims y otros (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.*, EE.UU., 90: 6143-6147; WO 94/26884; WO 94/24274, y WO 90/03432, patentes de EE.UU. N<sup>os</sup> 4.944.384, 5.057.420, WO 97/07669, WO 97/07668, WO 98/30683, WO 00/22098, WO 004217, WO 00/51424, WO 03/055302, WO 03/005810, patentes de EE.UU. N<sup>o</sup> 6.147.276, 6.215.041, 6.235.969, 6.252.133, 6.258.998, 5.945.577, 6.525.243, 6.548.741 y Phelps et al. (*Science* 299: 411 - 414 (2003)).

**[0221]** Un núcleo de célula donante, que se ha modificado para que contenga un transgén de la presente invención, se transfiere a un ovocito porcino receptor. El uso de este método no está restringido a un tipo de célula de donante particular. La célula del donante puede ser como se describe en Wilmut et al. (1997) *Nature* 385: 810; Campbell et al. (1996) *Nature* 380: 64 - 66; o Cibelli et al. (1998) *Science* 280: 1256 - 1258. En principio, pueden emplearse todas las células de cariotipo normal, incluidas las células somáticas embrionarias, fetales y adultas que pueden usarse con éxito en la transferencia nuclear. Los fibroblastos fetales son una clase particularmente útil de células donantes. Los métodos generalmente adecuados de transferencia nuclear se describen en Campbell et al. (1995)

Theriogenology 43: 181, Collas et al. (1994) Mol. Reprod. Dev. 38: 264 - 267, Keefer et al. (1994) Biol. Reprod. 50: 935 - 939, Sims et al. (1993) Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU. 90: 6143 - 6147, WO-A-9426884, WO-A-9424274, WO-A-9807841, WO-A-9003432, Pat. de EE.UU. N° 4.994.384 y la patente de EE.UU. N° 5.057.420, Campbell et al., (2007) Theriogenology 68 Suppl 1, S214 - 231, Vatja et al., (2007) Reprod Fertil Dev 19, 403 - 423). También se pueden usar células donantes diferenciadas o al menos parcialmente diferenciadas. Las células donantes también pueden ser, pero no tienen que serlo, en cultivo y pueden permanecer quietas. Las células del donante nuclear que están inactivas son células que pueden inducirse para que entren en reposo o que existan en estado inactivo in vivo. Los métodos de la técnica anterior también han usado tipos de células embrionarias en procedimientos de clonación (véase, por ejemplo, Campbell et al. (1996) Nature, 380: 64-68) y Stice et al. (1996) Biol. Reprod., 20 54: 100-110). En un aspecto particular, las células fibroblásticas, tales como las células fibroblásticas porcinas pueden modificarse genéticamente para contener el transgén de interés.

**[0222]** Los métodos para el aislamiento de oocitos son bien conocidos en la técnica. Esencialmente, esto puede comprender aislar ovocitos de los ovarios o el tracto reproductivo de un cerdo. Una fuente de ovocitos porcinos fácilmente disponible es el material de matadero. Para la combinación de técnicas tales como la ingeniería genética, la transferencia nuclear y la clonación, los ovocitos generalmente deben madurarse in vitro antes de que estas células puedan usarse como células receptoras para la transferencia nuclear, y antes de que puedan ser fertilizadas por la célula espermática para convertirse en embrión. Este proceso generalmente requiere recolectar ovocitos inmaduros (profase I) de ovarios de mamíferos, por ejemplo, ovarios bovinos obtenidos en un matadero, y madurar los ovocitos en un medio de maduración antes de la fertilización o enucleación hasta que el ovocito alcance la etapa de metafase II, que en el caso de ovocitos bovinos generalmente se produce alrededor de 18-24 horas después de la aspiración y en el caso del porcino generalmente ocurre a aproximadamente 35-55 horas. Este período de tiempo se conoce como el período de maduración".

**[0223]** Un ovocito en etapa de metafase II puede ser el ovocito receptor, en esta etapa se cree que el oocito puede estar o está suficientemente "activado" para tratar el núcleo introducido como lo hace un espermatozoide fecundante. Los ovocitos en etapa metafase II, que se han madurado in vivo, se han utilizado con éxito en técnicas de transferencia nuclear. Esencialmente, los ovocitos metafásicos II maduros se pueden recolectar quirúrgicamente de cerdos no superovulados o superovulados 35 a 48, o 39-41, horas después del comienzo del estro o después de la inyección de gonadotropina coriónica humana (hCG) u hormona similar.

**[0224]** Después de un período de maduración de tiempo fijo, los oocitos pueden enuclearse. Antes de la enucleación, los ovocitos se pueden eliminar y colocar en un medio apropiado, como HECM o TCM199 que contiene 1 miligramo por mililitro de hialuronidasa antes de la eliminación de las células del cumulus. Los oocitos despojados se pueden cribar en busca de cuerpos polares, y los ovocitos en metafase II seleccionados, como se determina por la presencia de cuerpos polares, se usan a continuación para la transferencia nuclear. La enucleación sigue.

**[0225]** La enucleación puede realizarse por métodos conocidos, tales como los descritos en la patente de EE.UU. N° 4.994.384. Por ejemplo, los ovocitos en metafase II pueden colocarse en HECM, opcionalmente conteniendo 7-10 microgramos por mililitro de citocalasina B, para enucleación inmediata, o pueden colocarse en un medio adecuado, por ejemplo, un medio de cultivo embrionario como CR1aa, más 10% suero de vaca estro, y luego enucleado más tarde, por ejemplo, no más de 24 horas más tarde o 16-18 horas más tarde.

**[0226]** La enucleación se puede llevar a cabo microquirúrgicamente usando una micropipeta para eliminar el cuerpo polar y el citoplasma adyacente. Los oocitos se pueden cribar para identificar aquellos de los cuales se han enucleado con éxito. Una forma de cribar los ovocitos consiste en teñir los ovocitos con 3-10 microgramos por mililitro de colorante Hoechst 33342 en medio de retención adecuado, y luego ver los oocitos bajo irradiación ultravioleta durante menos de 10 segundos. Los oocitos que se han enucleado con éxito pueden colocarse entonces en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, CR1aa más suero al 10%.

**[0227]** Una única célula de mamífero de la misma especie que el oocito enucleado puede transferirse luego al espacio perivitelino del oocito enucleado usado para producir la unidad NT. La célula de mamífero y el oocito enucleado se pueden usar para producir unidades NT de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células pueden fusionarse por electrofusión. La electrofusión se logra proporcionando un pulso de electricidad que es suficiente para causar una descomposición transitoria de la membrana plasmática. Esta descomposición de la membrana plasmática es muy corta porque la membrana se reforma rápidamente. Por lo tanto, si se provocan la descomposición de dos membranas adyacentes y después de la reformación, las bicapas lipídicas se entremezclan, se pueden abrir 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 los EE.UU. N° 4.997.384 por Prather et al. Se puede usar una variedad de medios de electrofusión que incluyen, por ejemplo, sacarosa, manitol, sorbitol y solución tamponada de fosfato. Por ejemplo, los medios de fusión pueden comprender una solución 280 milimolar (mM) de manitol, que contiene 0,05 mM MgCl<sub>2</sub> y CaCl<sub>2</sub> 0,001 mM (Walker et al, Cloning and Stem Cells. 2002; 4 (2): 105-12) La fusión también se puede lograr usando el virus Sendai como un agente fusogénico (Graham, Wister Inot. Symp. Monogr., 9, 19, 1969). Además, el núcleo se puede inyectar directamente en el oocito en lugar de usar la fusión de electroporación. Véase, por ejemplo, Collas y Barnes, (1994) Mol. Reprod. Dev., 38: 264-267. Después de la fusión, las unidades NT fusionadas

resultantes se colocan entonces en un medio adecuado hasta la activación, por ejemplo, medio CR1aa. Típicamente, la activación puede efectuarse poco después, por ejemplo, menos de 24 horas después, o aproximadamente 4 - 9 horas más tarde para NT bovina y 1 - 4 horas más tarde para NT porcina.

5 **[0228]** La unidad NT puede ser activada por métodos conocidos. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, el cultivo de la unidad NT a temperatura subfisiológica, aplicando en esencia un choque de temperatura frío o realmente frío a la unidad NT. Esto se puede hacer más cómodamente cultivando la unidad NT a temperatura ambiente, que es fría en relación con las condiciones de temperatura fisiológica, a las cuales los embriones están normalmente expuestos. Alternativamente, la activación se puede lograr mediante la aplicación de agentes de activación conocidos. Por ejemplo, se ha demostrado que la penetración de los ovocitos por los espermatozoides durante la fecundación activa los ovocitos de preludio para producir un mayor número de embarazos viables y múltiples terneros genéticamente idénticos después de la transferencia nuclear. Además, se pueden usar tratamientos como descargas eléctricas y químicas para activar embriones NT después de la fusión. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.496.720 de Susko-Parrish et al. Adicionalmente, la activación puede efectuarse simultánea o secuencialmente aumentando los niveles de cationes divalentes en el ovocito y reduciendo la fosforilación de las proteínas celulares en el ovocito. Esto generalmente puede efectuarse introduciendo cationes divalentes en el citoplasma del oocito, por ejemplo, magnesio, estroncio, bario o calcio, por ejemplo, en forma de un ionóforo. Otros métodos para aumentar los niveles de cationes divalentes incluyen el uso de descargas eléctricas, el tratamiento con etanol y el tratamiento con quelantes enjaulados. La fosforilación se puede reducir mediante métodos conocidos, por ejemplo, mediante la adición de inhibidores de quinasas, por ejemplo, inhibidores de serina-treonina quinasa, tales como 6-dimetilaminopurina, estaurosporina, 2-aminopurina y esfingosina. Alternativamente, la fosforilación de proteínas celulares puede inhibirse mediante la introducción de una fosfatasa en el oocito, por ejemplo, fosfatasa 2A y fosfatasa 2B.

25 **[0229]** Las unidades NT activadas pueden cultivarse luego hasta que alcancen un tamaño adecuado para transferirlas a una hembra receptora, o alternativamente, pueden transferirse inmediatamente a una hembra receptora. Los medios de cultivo adecuados para el cultivo y la maduración de embriones son bien conocidos en la técnica. Ejemplos de medios conocidos, que pueden usarse para el cultivo y mantenimiento de embriones, incluyen suero de ternero fetal F-10+10% de Ham's, medio de cultivo tisular 199 (TCM-199) + suero de ternera fetal al 10%, tiroides-albúmina-lactato-piruvato (TALP), solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS), medio de Eagle's Whitten, PZM, NCSU23 y NCSU37. Véase Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas I.M., Iwamura S. Biol Reprod. (2002) enero; 66 (1): 112-9 y Petters R.M., Wells K D. J Reprod Fertil Suppl. 1993; 48: 61-73.

35 **[0230]** Posteriormente, la unidad o unidades de NT cultivadas pueden lavarse y luego colocarse en un medio adecuado contenido en placas de pocillos que pueden contener opcionalmente una capa de alimentación confluyente adecuada. Las capas alimentadoras adecuadas incluyen, a modo de ejemplo, fibroblastos y células epiteliales. Las unidades NT se cultivan en la capa alimentadora hasta que las unidades NT alcanzan un tamaño adecuado para la transferencia a una hembra receptora, o para obtener células que pueden usarse para producir colonias celulares. Las unidades NT pueden cultivarse hasta al menos aproximadamente 2 a 400 células, aproximadamente 4 a 128 células, o al menos aproximadamente 50 células. Alternativamente, las unidades NT pueden transferirse inmediatamente a una hembra receptora.

45 **[0231]** Los métodos para la transferencia de embriones y el manejo del animal receptor son procedimientos estándar usados en la industria de transferencia de embriones. Las transferencias sincronas son importantes para el éxito, es decir, la etapa del embrión NT está en sincronía con el ciclo estral de la hembra receptora. Véase, por ejemplo, Siedel, G. E., Jr. (1981) "Critical review of embryo transfer procedures with cattle in Fertilization and Embryonic Development in Vitro, L. Mastroianni, Jr. y J. D. Biggers, ed., Plenum Press, Nueva York, N.Y., página 323. La transferencia de embriones porcinos puede realizarse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Para referencia, véase Youngs et al., "Factors Influencing the Success of Embryo Transfer in the Pig", Theriogenology (2002) 56: 1311-1320.

#### ***Producción de animales multi-transgénicos que contienen transgenes endoteliales específicos (endo)***

55 **[0232]** Los animales (o fetos) se pueden producir de acuerdo con los siguientes medios, que incluyen, pero no se limitan al grupo seleccionado de: transferencia nuclear (NT), reproducción natural, rederivación a través de NT usando células de una línea celular existente, feto, o animales como donantes nucleares, opcionalmente añadiendo transgenes adicionales a estas células antes de NT, transferencia nuclear secuencial, tecnologías de reproducción artificial (ART) o cualquier combinación de estos métodos u otros métodos conocidos en la técnica. En general, "criar" se refiere a cualquier medio de reproducción, incluidos los medios naturales y artificiales. Además, la presente descripción proporciona toda la progenie de animales producidos por los métodos descritos en este documento. Se entiende que dicha progenie puede convertirse en homocigótica para los genes descritos en este documento.

65 **[0233]** En un aspecto, las células se aíslan de animales que carecen de expresión de GT (GTKO) y son transgénicos para CD46 (GTKO/CD46). Estas células se modifican adicionalmente con un transgén de TM endotelial específico, y las células transgénicas resultantes se usan como donantes nucleares para generar animales transgénicos GTKO/CD46/TM a través de NT.

**[0234]** En otro aspecto, las células GTKO/CD46 se modifican adicionalmente con un transgén CD39 endotelial específico, y las células transgénicas resultantes se usan como donantes nucleares para generar animales transgénicos GTKO/CD46/CD39 a través de NT.

5 **[0235]** En un aspecto adicional, las células GTKO/CD46 se modifican adicionalmente con un transgén de EPCR endotelial específico, y las células transgénicas resultantes se usan como donantes nucleares para generar animales transgénicos GTKO/CD46/EPCR a través de NT.

10 **[0236]** En un aspecto adicional, las células GTKO/CD46 se modifican adicionalmente con transgenes TM y EPCR endoteliales específicos, y las células transgénicas resultantes se usan como donantes nucleares para generar animales transgénicos GTKO/CD46/TM/EPCR a través de NT.

15 **[0237]** En otro aspecto, los animales GTKO/CD46/TM se aparean con animales GTKO/CD46/CD39 para generar animales GTKO/CD46/TM/CD39 a través de la reproducción.

20 **[0238]** En un aspecto, las células se aíslan de animales que carecen de expresión de GT (GTKO) y también son transgénicos para CD46 y DAF (expresión constitutiva). Estas células transgénicas GTKO/CD46/DAF se modifican adicionalmente con uno o más transgenes específicos endoteliales (ESTR), tales como ESTR incluyen, pero no se limitan a, los anticoagulantes, inmunosupresores y/o transgenes citoprotectores descritos aquí, y las células transgénicas resultantes se usan como donantes nucleares para generar animales transgénicos GTKO/CD46/DAF/ESTR a través de NT.

25 **[0239]** En otro aspecto, las células se aíslan de animales que carecen de expresión de GT (GTKO) y también son transgénicos para CD46 y CIITA (expresión constitutiva). Estas células transgénicas GTKO/CD46/CIITA se modifican adicionalmente con uno o más transgenes específicos endoteliales (ESTR), tales como ESTR incluyen, pero no se limitan a, los anticoagulantes, inmunosupresores y/o transgenes citoprotectores descritos en este documento, y las células transgénicas resultantes son usadas como donantes nucleares para generar animales transgénicos GTKO/CD46/CIITA/ESTR a través de NT.

30 **[0240]** En un aspecto adicional, las células se aíslan de animales que carecen de expresión de GT (GTKO) y son transgénicos para CD46, DAF y CIITA (expresión constitutiva). Estas células GTKO/CD46/DAF/CIITA se modifican adicionalmente con uno o más transgenes específicos endoteliales (ESTR), tales ESTR incluyen, pero no se limitan a, los anticoagulantes, inmunosupresores y/o transgenes citoprotectores descritos en este documento, y las células transgénicas resultantes son usadas como donantes nucleares en NT para generar animales transgénicos  
35 GTKO/CD46/DAF/CIITA ESTR.

**[0241]** En otro aspecto, los animales GTKO/CD46/DAF/CIITA se crían en animales transgénicos GTKO/CD46/endo para generar animales transgénicos GTKO/CD46/DAF/CIITA ESTR.

40 **[0242]** En otro aspecto, los animales GTKO/CD46/TM se crían con animales transgénicos GTKO/CD46/DAF/CIITA para generar animales GTKO/CD46/TM/DAF/CIITA.

45 **[0243]** En un aspecto adicional, los animales GTKO/CD46 que contienen adicionalmente un transgén específico endotelial se crían a animales transgénicos GTKO/CD46/DAF/CIITA para generar animales transgénicos GTKO/CD46/DAF/CIITA/ESTR por cría.

50 **[0244]** En otro aspecto, las células aisladas de animales GTKO/CD46/TM se modifican adicionalmente con un transgén inmunosupresor, tal como pCTLA4lg. Las células transgénicas resultantes se usan como donantes nucleares para generar animales GTKO/CD46/TM/CTLA4lg a través de NT.

**[0245]** En ciertos aspectos, las células aisladas de animales GTKO/CD46/TM se modifican adicionalmente con uno o más transgenes inmunomoduladores o anticoagulantes, y las células resultantes que contienen cuatro o más transgenes se usan como donantes nucleares para generar animales multitransgénicos a través de NT.

55 **[0246]** En aspectos adicionales, cualquiera de los animales multitransgénicos incorporados aquí puede ser criado de forma natural, o usando tecnologías reproductivas artificiales para generar animales multitransgénicos con modificaciones genéticas adicionales a través de la cría.

60 **[0247]** Además, las células aisladas a partir de cualquiera de los animales multitransgénicos (o fetos) incorporados en el presente documento pueden usarse en más NT a reimpulsar animales, o para añadir otras modificaciones genéticas para su genoma seguido de NT para generar animales multitransgénicos contienen modificaciones genéticas adicionales vía NT.

***Xenoinjertos de órganos enteros***

65 **[0248]** Existe una escasez crítica de órganos humanos para el trasplante de órganos. Solo en los Estados Unidos,

aproximadamente 110.000 pacientes están en listas de espera para recibir órganos, y sin embargo solo 30.000 órganos estarán disponibles de donantes fallecidos. Casi 20 pacientes mueren cada día (7.000 por año) a la espera de un órgano (Cooper y Ayares, 2010 International Journal of Surgery, In Press, doi: 10.1016/j.ijso.2010.11.002). El suministro de órganos humanos para su uso en alotrasplantes nunca satisfará completamente las necesidades de la población. Se necesita con urgencia una nueva fuente de órganos de donantes.

**[0249]** Los xenotrasplantes podrían abordar eficazmente la escasez de órganos de donantes humanos. Los xenotrasplantes también se suministran ventajosamente (i) de una manera predecible, que no es de emergencia; (ii) producido en un ambiente controlado; y (iii) disponible para caracterización y estudio previo al trasplante.

**[0250]** Dependiendo de la relación entre las especies donantes y receptores, el xenotrasplante se puede describir como concordante o discordante. Las especies concordantes son especies filogenéticamente estrechamente relacionadas (p. ej., ratón a rata). Las especies discordantes no están estrechamente relacionadas (p. ej., cerdo a ser humano). Los cerdos han sido el foco de la mayoría de las investigaciones en el área de xenotransplante, ya que el cerdo comparte muchas características anatómicas y fisiológicas con humanos. Los cerdos también tienen períodos de gestación relativamente cortos, pueden criarse en ambientes libres de patógenos y pueden no presentar los mismos problemas éticos asociados con animales que no se usan comúnmente como fuentes alimenticias (por ejemplo, primates). Se ha revisado el trasplante de órganos porcinos completos en primates no humanos (véase, por ejemplo, Ekser et al., Transplant Immun. 2009 21: 87-92; Ekser y Cooper. Expert Rev Clin Immunol. 2010 Mar; 6 (2): 219-30; Mohiuddin, M. PLoS Med. 2007 Mar 27; 4 (3): e75; Pierson et al., Xenotransplantation. 2009 Sep-Oct; 16 (5): 263-80). Para el uso terapéutico de órganos porcinos para estar disponible para su uso en el tratamiento médico humano, se deben obtener mejores resultados en ensayos preclínicos de primates no humanos, seguidos de la duplicación o la mejora de estos resultados en ensayos clínicos en humanos. Los cerdos de la presente invención pueden proporcionar una fuente de órganos de donantes porcinos para abordar estos requisitos.

**[0251]** En aspectos adicionales, los órganos según la presente descripción pueden seleccionarse de entre los siguientes: corazón, pulmón, hígado, riñón, intestino, bazo y páncreas. En un aspecto, los órganos xenotransplantados de la presente invención pueden sobrevivir y funcionar en el receptor como un aloinjerto. En otros aspectos, los órganos descritos en este documento se pueden usar como órganos de puente hasta que esté disponible un órgano humano. El órgano puente se puede utilizar en un destinatario durante al menos 3 días. En otras realizaciones, el órgano puente puede usarse en un receptor un período de tiempo seleccionado de entre los siguientes: al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 14, 21, 28 días.

### **Corazones**

**[0252]** En una realización, los corazones obtenidos de animales de la presente invención se pueden usar preclínicamente y clínicamente para mejorar los resultados en xenotrasplantes cardíacos. Los trasplantes de corazón pueden ser heterotópicos (no relacionados con la vida: el órgano endógeno permanece en su lugar) u ortotópicos (que sostienen la vida, donde el corazón se reemplaza por un corazón donado). Los trasplantes de corazón pueden ser heterotópicos o ortotópicos. En estudios de xenotrasplantes de primates no humanos, la mayoría hasta la fecha han sido injertos heterotópicos, pero en estudios posteriores y en el uso clínico en humanos, los corazones se trasplantarán ortotópicamente. Los corazones de los cerdos de la invención, cuando se trasplantan a un primate, pueden funcionar durante al menos seis meses en la mayoría de los primates. La mayoría de los primates pueden ser al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80% o al menos un 90% de primates. Los corazones trasplantados pueden funcionar durante un período de tiempo de al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, al menos 15 meses, al menos 18 meses, al menos 21 meses, al menos 24 meses, al menos 36 meses o al menos 48 meses. Dichos trasplantes pueden ser heterotópicos u ortotópicos.

**[0253]** En un aspecto, los corazones de los cerdos de la invención, cuando se trasplantan ortotópicamente a un ser humano, pueden funcionar durante hasta 9 meses.

**[0254]** Usando cerdos GTKO y nuevos agentes inmunosupresores, se logró la supervivencia de 2 a 6 meses de xenotrasplantes heterotópicos del corazón (Kuwaki y col., Nat Med 2005: 11: 29-31; Tseng et al., Transplantation 2005: 80: 1493-500). Los cerdos transgénicos con la combinación de GTKO y expresión de CD46 se ensayaron recientemente en un modelo de corazón heterotópico (cerdo a babuino) y proporcionaron supervivencia prolongada y función de corazones de xenoinjerto durante hasta 8 meses. (Mohiuddin et al., Abstract TTS-1383. Transplantation 2010; 90 (supl): 325).

**[0255]** En estudios de xenotrasplante de corazón de primate no humano, se ha producido un fallo del injerto debido al desarrollo de una microangiopatía trombótica que da como resultado la oclusión vascular y la lesión isquémica circundante. Los corazones de los cerdos de la presente invención, que expresan transgenes anticoagulantes en el endotelio vascular disminuirán o evitarán que se produzcan eventos trombóticos, tales como, por ejemplo, coagulopatía consuntiva y microangiopatía trombótica, y sirven para proteger el xenoinjerto de la lesión. En un aspecto, los corazones de los cerdos descritos en este documento pueden disminuir los eventos trombóticos. En otro aspecto, los corazones de los cerdos descritos en este documento pueden prevenir los eventos trombóticos.

Para ver las revisiones del progreso en este campo del xenotrasplante cardíaco en los últimos 20 años, consulte, por ejemplo, Zhu et al, J Heart Lung Transplant. 2007 Mar; 26 (3): 210-8 y Ekser and Cooper, Curr Opin Organ Transplant. 2008 Oct; 13 (5): 531-5. El uso de corazones de donantes porcinos como un trasplante puente también se ha detallado (Cooper and Teuteberg J Heart Lung Transplant. 2010 Agosto; 29 (8): 838-40).

**[0256]** Los aspectos adicionales abarcan los cerdos de la presente invención que contienen más modificaciones genéticas, por ejemplo, transgenes inmunosupresores, por ejemplo, la expresión endotelial de transgenes inmunosupresores, tales como CTLA4-Ig, permite el uso de un régimen inmunosupresor clínicamente relevante para ser utilizado en la xenotransplatación cardíaca.

**[0257]** En otros aspectos, el corazón porcino se puede transferir a un primate y puede funcionar en el primate durante al menos 6 meses. En otro aspecto, el corazón porcino se puede transferir a un primate y puede funcionar en el primate durante al menos 9 meses. En un aspecto adicional, el corazón porcino se puede transferir a un primate y puede funcionar en el primate durante al menos 12 meses. En un aspecto adicional, el corazón porcino puede transferirse a un primate y puede funcionar en el primate durante al menos 18 meses. El primate puede ser un mono, un babuino o un humano. Al menos 6, 8 o 10 primates pueden analizarse con el corazón porcino. Los corazones de los cerdos de la invención, cuando se trasplantan a un primate pueden servir como un puente hacia un alotrasplante. Los corazones se pueden usar como órganos puente durante un tiempo seleccionado pero no limitado a al menos 1 mes, al menos 2 meses o al menos 3 meses. El corazón porcino se puede utilizar como un puente de trasplante y funcionar en el primate durante al menos 9 meses, al menos 12 meses o al menos 15 meses. El primate puede ser un primate no humano o un ser humano.

**[0258]** Para detalles sobre el procedimiento de trasplante, véase, por ejemplo, Handbook of Animal Models in Transplantation Research, editado por DV Cramer, L. Podesta, L. Makowka 1994 CRC Press, por ejemplo, Capítulos 3, 7, 8, 9 y 14; Cooper et al "Report of the Xenotransplantation Advisory Committee of the International Society for Heart and Lung Transplantation", diciembre de 2000, The Journal of Heart and Lung Transplantation, pp 1125-1165.

### **Riñones**

**[0259]** El uso de cerdos GTKO y/o cerdos transgénicos que sobreexpresan genes inhibidores de complemento humano para xenotrasplantes de riñón ha superado en gran medida el problema de HAR, sin embargo sigue habiendo problemas con xeno-riñones siendo rechazados a través de AHXR. Yamada et al, (Nat Med. 2005 enero; 11 (1): 32-4) obtuvieron una supervivencia de >80 días en dos mandriles. La histología de muchos de los riñones mostró una estructura preservada, pero el régimen inmunosupresor relativamente intensivo requerido para prolongar la supervivencia del injerto resultó en complicaciones. Los datos menos alentadores en el modelo GT-KO de cerdo a babuino fueron informados por Chen et al (Nat Med 2005: 11: 1295-8) donde, en contraste con los estudios de Yamada et al., no se previno una respuesta de anticuerpos antinonGal. y AHXR resultó en falla del injerto.

**[0260]** Los riñones de los cerdos multi-transgénicos de la invención pueden disminuir o eliminar la xenorrecepción, exhibiendo mejores resultados cuando se usa como un trasplante discordante. En un aspecto, los riñones de los cerdos de la invención permanecen funcionales en un primate no humano y no presentan xenorrecepción durante 6 meses o más. En otro aspecto, los riñones de los cerdos de la invención permanecen funcionales en un ser humano durante un año o más. Los riñones trasplantados de la presente invención pueden funcionar durante un período de tiempo de al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, al menos 15 meses, al menos 18 meses, al menos 21 meses, al menos 24 meses, al menos 36 meses o al menos 48 meses. Dichos trasplantes pueden ser heterotópicos u ortotópicos.

**[0261]** Adicionalmente, los riñones de cerdos de la presente invención que contienen modificaciones genéticas adicionales, por ejemplo, transgenes inmunosupresores tales como CTLA4-Ig, permitirán que se usen niveles de inmunosupresión clínicamente aceptables, lo que conduce a menos complicaciones como resultado del tratamiento.

**[0262]** Los aspectos adicionales abarcan los cerdos de la presente invención que contienen más modificaciones genéticas, por ejemplo, transgenes inmunosupresores, por ejemplo, la expresión endotelial de transgenes inmunosupresores, tales como CTLA4-Ig, permite el uso de un régimen inmunosupresor clínicamente relevante para ser utilizado en el xenotrasplante renal. El riñón porcino se puede transferir a un primate y puede funcionar en el primate durante al menos 6 meses, al menos 9 meses, al menos 12 meses o al menos 18 meses. El primate puede ser un mono, un babuino o un humano. Al menos 6, al menos 8 o al menos 10 primates pueden analizarse con el riñón porcino. El riñón porcino se puede utilizar como un puente de trasplante y funcionar en el primate durante al menos 9, al menos 12 o al menos 15 meses.

**[0263]** Para detalles sobre el procedimiento de trasplante, véase, por ejemplo, Handbook of Animal Models in Transplantation Research, editado por DV Cramer, L. Podesta, L. Makowka 1994 CRC Press, por ejemplo, Capítulos 3, 7, 8, 9 y 14.

### **Páncreas**

**[0264]** En ciertas realizaciones, se puede usar el páncreas de los cerdos multi-transgénicos de la invención. Dicho páncreas puede disminuir o eliminar la xenorrecepción y mostrar mejores resultados cuando se usa como un trasplante discordante. Un xenotrasplante renal que usa riñones de los cerdos de la invención se puede combinar con un trasplante de islotes pancreáticos o de páncreas. Por ejemplo, esto se realiza actualmente en alotrasplantes para tratar pacientes con diabetes tipo 1 y enfermedad renal crónica tardía (revisado por Wiseman, Curr Diab Rep. 2010 Oct; 10 (5): 385-91; Adv Chronic Kidney Dis. 2009 Jul; 16 (4): 278 - 87). El páncreas porcino se puede transferir a un primate y puede funcionar en el primate durante al menos 6, al menos 9, al menos 12 o al menos 18 meses. El primate puede ser un mono, un mandril o un humano. Al menos 6, al menos 8 o al menos 10 primates pueden analizarse con el páncreas porcino. El páncreas porcino se puede utilizar como un puente de trasplante y funcionar en el primate durante al menos 9, al menos 12 o al menos 15 meses. Los usos del páncreas porcino descritos en la presente memoria se pueden usar en combinación con un trasplante de riñón.

**[0265]** Los aspectos adicionales abarcan los cerdos de la presente invención que contienen más modificaciones genéticas, por ejemplo, transgenes inmunosupresores, por ejemplo, la expresión endotelial de transgenes inmunosupresores, tales como CTLA4-Ig, permite el uso de un régimen inmunosupresor clínicamente relevante para ser utilizado en xenotrasplante pancreático/renal.

**[0266]** Para más detalles sobre el procedimiento de trasplante, véase, por ejemplo, Handbook of Animal Models in Transplantation Research, editado por DV Cramer, L. Podesta, L. Makowka, 1994 CRC Press, por ejemplo, Capítulos 3, 7, 8 y 9 y 14.

**Pulmones**

**[0267]** El xenotrasplante de pulmones porcinos se revisa brevemente en Ekser et al., Transplant Immun. 2009 21: 87-92, pero hay pocos datos disponibles. Los pulmones de los cerdos de la presente invención, permitirán un mayor progreso preclínico y clínico. Los pulmones trasplantados de la presente invención pueden ser un par completo de pulmón o pulmón. Los pulmones trasplantados de la presente invención pueden funcionar durante un período de tiempo de al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 6 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, al menos 15 meses, al menos 18 meses, al menos 21 meses, al menos 24 meses, al menos 36 meses o al menos 48 meses. Dichos trasplantes pueden ser heterotópicos u ortotópicos. El pulmón porcino se puede transferir a un primate y puede funcionar en el primate durante al menos 6, al menos 9, al menos 12 o al menos 18 meses. El primate puede ser un mono, un babuino o un humano. Al menos 6, al menos 9 o al menos 10 primates pueden analizarse con el pulmón porcino. Los pulmones de los cerdos de la invención, cuando se trasplantan a un primate pueden servir como puente a un alotrasplante. Los pulmones se pueden usar como órganos puente durante un tiempo seleccionado, pero no limitado a, al menos, 7 días, al menos 14 días, al menos 21 días o al menos 1 mes. El pulmón porcino se puede utilizar como un puente de trasplante y funcionar en el primate durante al menos 3 meses, al menos 4 meses o al menos 6 meses. El pulmón se puede utilizar como un órgano puente durante 3-6 meses. El primate puede ser un primate no humano o un ser humano.

**[0268]** En un aspecto particular, se proporcionan pulmones de animales porcinos transgénicos que carecen de cualquier expresión de alfa 1,3-galactosiltransferasa funcional (GTKO) y expresan específicamente al menos un transgén en tejido endotelial. En otro aspecto, los pulmones se proporcionan a partir de cerdos transgénicos que carecen de expresión de alfa 1,3 galactosiltransferasa (GTKO) funcional y expresan al menos un inhibidor del complemento y expresan específicamente al menos un transgen en tejido endotelio seleccionado del grupo que consiste en anticoagulantes, inmunomoduladores y citoprotectores. En un aspecto específico, se proporcionan pulmones de cerdos transgénicos con las siguientes modificaciones genéticas: GTKO, expresión ubicua de al menos un inhibidor del complemento, expresión endotelial específica de al menos tres anticoagulantes y al menos un inmunomodulador. El animal también puede expresar al menos un elemento citoprotector. En un aspecto particularmente específico, se proporciona un pulmón de un cerdo transgénico en el que el cerdo tiene las siguientes modificaciones genéticas: GTKO, DAF, CD46 y expresión endotelial específica de CD39, TM, EPCR, TFPI, CIITA-DN. En un aspecto adicional, el animal también puede expresar A20 y HO-1.

**[0269]** Los aspectos adicionales abarcan los cerdos de la presente invención que contienen más modificaciones genéticas, por ejemplo, transgenes inmunosupresores, por ejemplo, la expresión endotelial de transgenes inmunosupresores, tales como CTLA4-Ig, permite el uso de un régimen inmunosupresor clínicamente relevante para ser utilizado en la xenotransplatación pulmonar.

**[0270]** Para detalles sobre el procedimiento de trasplante, véase, por ejemplo, Handbook of Animal Models in Transplantation Research, editado por D.V. Cramer, L. Podesta, L. Makowka 1994 CRC Press, por ejemplo, Capítulos 3, 7, 8, 9 y 14; Cooper et al "Report of the Xenotransplantation Advisory Committee of the International Society for Heart and Lung Transplantation", diciembre de 2000, The Journal of Heart and Lung Transplantation, pp 1125-1165.

**Hígados**

[0271] El uso de hígados porcinos en xenotrasplantes ha sido revisado por Hara (Liver Transpl. 2008 Abr; 14 (4): 425-34) y los hígados porcinos de cerdos GTKO/CD46 han mostrado recientemente parámetros de la función hepática en el rango casi normal (Ekser et al, Transplantation, 2010 Sep 15; 90 (5): 483-93). En la clínica humana, es más probable que los hígados porcinos se usen como un trasplante de puente hasta que un hígado humano derivado esté disponible para el trasplante. Este uso de hígados de los cerdos de la invención se detalla en la siguiente sección. Los hígados trasplantados de la presente invención pueden funcionar durante un período de tiempo de al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, al menos 15 meses, al menos 18 meses, al menos 21 meses, al menos 24 meses, al menos 36 meses o al menos 48 meses. Dichos trasplantes pueden ser heterotópicos u ortotópicos. Los hígados de la presente invención se pueden usar como un trasplante de puente. El hígado porcino se puede utilizar como un puente de trasplante y funcionar en el primate durante al menos 2 semanas, al menos 3 semanas o al menos 4 semanas. El hígado porcino se puede utilizar como un puente de trasplante y funcionar en el primate durante al menos 2 semanas, al menos 6 semanas, al menos 8 semanas o al menos 12 semanas.

[0272] Aspectos adicionales abarcan cerdos de la presente invención que contienen modificaciones genéticas adicionales, por ejemplo, transgenes inmunosupresores, por ejemplo, la expresión endotelial de transgenes inmunosupresores, tales como CTLA4-Ig, permite el uso de un régimen inmunosupresor clínicamente relevante para ser utilizado en la xenotransplatación hepática.

[0273] Para detalles sobre el procedimiento de trasplante, véase, por ejemplo, Handbook of Animal Models in Transplantation Research, editado por D.V. Cramer, L. Podesta, L. Makowka 1994 CRC Press, por ejemplo, Capítulos 3, 7, 8, 9 y 14.

#### **Otras aplicaciones de Xenoinjertos**

[0274] Además de su uso para el reemplazo terapéutico de órganos completos, los tejidos y células de órganos porcinos de la invención tienen aplicaciones terapéuticas adicionales.

[0275] Por ejemplo, los hígados porcinos de la invención se pueden usar como puente para un alotrasplante. El uso de hígados de cerdo para trasplantes de puentes se revisa en profundidad por Ekser et al. (2009. Transplantation. Nov 15 88 (9): 1041-1049). En las realizaciones de la invención, los xenoinjertos de hígado porcino pueden funcionar y servir para estabilizar a un paciente que sufre insuficiencia hepática durante al menos 5 días, al menos 7 días, al menos 14 días, al menos 21 días o al menos 30 días. Dichos trasplantes se pueden usar como puente hasta que esté disponible un hígado alotrasplante adecuado.

[0276] Las células y los tejidos de hígado porcino de la invención también pueden usarse en dispositivos de hígado bioartificial (BAL). Los dispositivos BAL se utilizan para proporcionar apoyo hepático temporal para salvar a un paciente con un deterioro rápido de la función hepática a un trasplante de hígado ortotópico o para dar tiempo a la regeneración del hígado. Existen varios grupos que desarrollan dispositivos hepáticos bioartificiales, por ejemplo, Circe Biomedical (Lexington, MA), Vitagen (La Jolla, CA), Excorp Medical (Oakdale, MN) y Algenix (Shoreview, MN). El dispositivo Circe Biomedical integra células hepáticas viables con membranas biocompatibles en un sistema extracorpóreo de asistencia hepática bioartificial. Anteriormente desarrollada por Circe y Arbios, esta tecnología, HepaMate™, ahora está siendo desarrollada por Hepalife (<http://www.hepalifebiosystems.com/clinical-trials.php>). El dispositivo ELAD (Extracorporeal Liver Assist Device) de Vitagen es un cartucho de fibra hueca de dos cámaras que contiene una línea celular de hígado humano cultivado (C3A). El cartucho contiene una membrana semipermeable con un límite de peso molecular caracterizado: esta membrana permite la compartimentación física de la línea celular humana cultivada y el ultrafiltrado del paciente. Algenix proporciona un sistema en el que un sistema de soporte hepático externo utiliza células hepáticas porcinas. Los hepatocitos porcinos individuales pasan a través de una membrana para procesar las células sanguíneas humanas. El dispositivo de Excorp Medical contiene un biorreactor de membrana de fibra hueca (con corte de 100 kDa) que separa la sangre del paciente de aproximadamente 100 gramos de hepatocitos porcinos primarios que han sido cosechados de cerdos libres de patógenos y criados a propósito. La sangre pasa a través de un cilindro lleno de fibras de polímero huecas y una suspensión que contiene miles de millones de células de hígado de cerdo. Las fibras actúan como una barrera para evitar que las proteínas y los subproductos celulares de las células del cerdo entren en contacto directo con la sangre del paciente, pero permiten el contacto necesario entre las células para que las toxinas en la sangre puedan eliminarse. En ciertas realizaciones, las células porcinas de la invención, usadas en un dispositivo BAL, pueden funcionar y servir para estabilizar a un paciente que sufre insuficiencia hepática durante hasta 7 días, hasta 14 días o hasta 30 días hasta que esté disponible un hígado alotrasplante adecuado. Otros usos de hígados, tejidos o células de porcino de la invención, incluso en dispositivos de hígado artificial extracorpóreos, en procedimientos de perfusión hepática extracorpórea, y para el trasplante de células hepáticas, como puente a un alotrasplante ortotópico, o para apoyar la función y regeneración hepática del paciente (como detallado, por ejemplo, en Ekser et al., 2009. Transplantation, Nov 15 88 (9): 1041-1049) también se incluyen aquí.

[0277] Las células endoteliales aisladas de la córnea de animales porcinos de la invención se pueden usar como injerto para tratar la disfunción de la córnea. Los procedimientos de trasplante quirúrgico óptico conocidos como queratoplastia endotelial (EK) reemplazan el endotelio de córnea disfuncional con material donante. Un

procedimiento conocido como queratoplastia endotelial lamelar profunda (DLEK) se ha utilizado ampliamente desde su introducción (Terry, MA, *Cataract and Refractory Surgery Today*, febrero de 2004, p.1-3). Para una revisión actual de los diversos procedimientos EK, véase Melles, septiembre de 2006 *Cornea Volumen 25 (8): 879-881*.

5 **[0278]** Las células endoteliales aisladas de la retina de los animales porcinos de la invención se pueden utilizar como un injerto para tratar la disfunción retina, para el tratamiento de enfermedades, incluyendo la degeneración macular aguda o retinopatía inducida por diabetes. Las células endoteliales retinianas pueden usarse en el tratamiento de la disfunción retiniana, de la degeneración macular aguda o de la retinopatía inducida por la diabetes.

10 **[0279]** Los tejidos y células porcinas de los animales de la invención se pueden usar como injertos vasculares. La fuente clínica actual de materiales de injerto vascular se limita a: vasos tomados del paciente (autólogos), bancos de tejidos (aloinjerto), materiales derivados de animales y altamente procesados para eliminar antígenos y células viables, o materiales sintéticos. También se han realizado esfuerzos para desarrollar materiales de injerto vascular de bioingeniería, sin embargo, los desafíos permanecen en este campo en desarrollo, y tales injertos aún no están  
15 clínicamente disponibles (Campbell y Campbell, *Curr Pharm Biotechnol.* 2007 Feb; 8 (1): 43-50). Para una revisión exhaustiva de los materiales existentes de injertos vasculares y sus aplicaciones, véase, por ejemplo, Leon L y Greisler HP. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2003 Nov; 1 (4): 581-94. Si bien el injerto autólogo es el método de elección, muchos pacientes no tienen vasos adecuados disponibles para injertos autólogos. Los aloinjertos derivados de humanos a partir de bancos de tejidos presentan un riesgo de transmisión de enfermedades al receptor (Eastlund T. *Cell Transplant*, 1995 Sep-Oct; 4 (5): 455-77). Los materiales animales altamente procesados han  
20 mostrado problemas con la durabilidad y la inmunogenicidad (Lehalle B, Geschier C, Fiévé G, Stoltz JF. *J Vasc Surg.* 1997 Abr; 25 (4): 751-2).

**[0280]** Tejidos vasculares y células de los animales porcinos de la invención pueden proporcionar un suministro alternativo seguro de los injertos vasculares. Los injertos vasculares se pueden seleccionar del grupo que incluye válvulas cardíacas, vena femoral, arteria femoral, arteria aortoiliaca, vena safena, aorta ascendente, arteria pulmonar, aorta torácica, arteria pulmonar, arteria mamaria interna, arteria radial o cualquier otro vaso que  
25 actualmente se usa terapéuticamente como un injerto o aloinjerto autólogo. Se puede utilizar una sola sección valvular del tronco pulmonar principal como un parche de cúspide única ([www.AccessLifeNetHealth.org](http://www.AccessLifeNetHealth.org)). los materiales vasculares de los animales de la invención se pueden usar para reemplazo, derivación, parchado o reparación para tratar un defecto o enfermedad vascular. Los injertos vasculares de los animales porcinos de la invención se pueden usar para cirugía reconstructiva vascular, cirugía de derivación coronaria o injerto arterial o venoso. Los injertos vasculares descritos en la presente memoria se pueden usar para tratar una enfermedad seleccionada del grupo que incluye, pero sin limitación, aterosclerosis, enfermedad de la arteria coronaria,  
30 enfermedad vascular periférica y aneurisma aórtico. En otras realizaciones, los injertos vasculares descritos en este documento pueden usarse para cirugía de derivación vascular periférica. Los injertos descritos en este documento pueden usarse para tratar la enfermedad arterial periférica, la isquemia crítica de las extremidades o cualquier otra oclusión vascular. Las células endoteliales porcinas también se pueden usar para sembrar injertos vasculares, o se pueden usar para sembrar durante procedimientos coronarios, tales como colocación de stents o cirugía de bypass. Los materiales de injerto vascular pueden ser aloinjertos (de origen humano) o dispositivos de bioingeniería, o cualquier otro material utilizado como injerto vascular. Los detalles sobre el uso de células endoteliales para la siembra después de procedimientos coronarios se pueden encontrar, por ejemplo, en Kipshidze et al., *J. Am. Coll. Cardiol.* 2004; 44; 733-739 y se pueden encontrar detalles sobre la construcción de injertos vasculares y métodos de siembra de células endoteliales, por ejemplo, en Sarkar y col., *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2007 Jul; 82  
40 (1): 100-8 y Villalona et al., *Tissue Eng Parte B Rev.* 2010 Jun; 16 (3): 341-50. Para una revisión reciente de biomateriales de ingeniería vascular (incluidos los materiales de xenoinjerto) ver Ravi y Chaikof, *Regen Med.* 2010 enero; S(1): 107-20.

**[0281]** Aquí se describen métodos de xenotrasplante en los que los órganos, tejidos o células transgénicos proporcionados en este documento se trasplantan a un primate y, después del trasplante, el primate requiere una terapia inmunosupresora mínima o nula. La terapia inmunosupresora reducida o nula incluye, pero no se limita a, una reducción (o eliminación completa) en la dosis de los fármacos/agentes inmunosupresores en comparación con los requeridos por otros métodos; una reducción (o eliminación completa) en la cantidad de tipos de fármaco(s)/agente(s) inmunosupresor(es) en comparación con los requeridos por otros métodos; una reducción (o eliminación completa) en la duración del tratamiento de inmunosupresión en comparación con la requerida por otros métodos; y/o una reducción (o eliminación completa) en la inmunosupresión de mantenimiento en comparación con la requerida por otros métodos. Los cerdos de la presente invención permiten el uso de un régimen inmunosupresor clínicamente relevante para su uso en xenotrasplantes pulmonares. Los cerdos de la presente invención que contienen modificaciones genéticas permiten el uso de un régimen inmunosupresor clínicamente relevante para ser  
55 utilizado en xenotrasplante. Por ejemplo, pueden usarse transgenes inmunosupresores. Se puede usar la expresión endotelial de transgenes inmunosupresores. El transgén inmunosupresor puede ser CTLA4-Ig.

**[0282]** Los métodos descritos en este documento también incluyen métodos de tratamiento o prevención de la disfunción de órganos en donde, después del trasplante de órganos transgénicos, tejidos o células, el trasplante se repite. El trasplante se puede realizar dos veces, tres veces o más en cualquier primate. El trasplante puede ocurrir una vez al año. El trasplante puede ocurrir dos veces al año. El trasplante puede ocurrir tres veces al año. El

trasplante puede ocurrir más de tres veces al año. El trasplante puede ocurrir varias veces durante varios años. Los parámetros de cualquier trasplante, incluidos, entre otros, los procedimientos quirúrgicos, los métodos de administración, los tejidos del donante y/o las células utilizadas, los regímenes inmunosupresores utilizados y similares, pueden ser diferentes o similares en comparación con otros trasplantes realizados de la misma manera. primate.

**[0283]** En algunos aspectos, el método reduce la necesidad de administración de antiinflamatorios al huésped. En otros aspectos, el método reduce la necesidad de administración de anticoagulante al huésped. En ciertos aspectos, el método reduce la necesidad de administración de agentes inmunosupresores al huésped. En algunos aspectos, al huésped se le administra un agente antiinflamatorio por menos de treinta días, o menos de 20 días, o menos de 10 días, o menos de 5 días, o menos de 4 días, o menos de 3 días, o menos de 2 días, o menos de un día después del trasplante. En algunos aspectos, al huésped se le administra un agente anticoagulante por menos de treinta días, o menos de 20 días, o menos de 10 días, o menos de 5 días, o menos de 4 días, o menos de 3 días, o menos de 2 días o menos de un día después del trasplante. En algunos aspectos, al huésped se le administra un agente inmunosupresor por menos de treinta días, o menos de 20 días, o menos de 10 días, o menos de 5 días, o menos de 4 días, o menos de 3 días, o menos de 2 días o menos de un día después del trasplante.

**[0284]** El receptor (huésped) puede estar parcialmente o completamente inmunosuprimido o no estar en absoluto en el momento del trasplante. Los agentes/fármacos inmunosupresores que pueden usarse antes, durante y/o después del momento del trasplante son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, entre otros, MMF (mofetilo de micofenolato (Cellcept)), ATG (globulina antitimocítica), anti-CD154 (CD40L), alemtuzumab (Campath), CTLA4-Ig (Abatacept/Orencia), belatacept (LEA29Y), sirolimus (Rapimune), tacrolimus (Prograf), anti-CD20 (Rituximab), daclizumab (Zenapax), basiliximab (Simulect), infliximab (Remicade), ciclosporina, desoxispergualina, receptor 1 del complemento soluble, veneno de cobra, metilprednisolona, FTY720, everolimus, anti-CD 154-Ab, leflunomida, anti-IL-2R-Ab, rapamicina y anticuerpo monoclonal anti-CD154 humano. Se pueden usar uno o más agentes inmunosupresores/medicamentos juntos o secuencialmente. Se pueden usar uno o más agentes inmunosupresores/medicamentos para la terapia de inducción o para la terapia de mantenimiento. Se pueden usar los mismos o diferentes medicamentos durante las etapas de inducción y mantenimiento. En una realización, daclizumab (Zenapax) se usa para terapia de inducción y tacrolimus (Prograf) y sirolimus (Rapimune) se usan para terapia de mantenimiento. En otra realización, daclizumab (Zenapax) se usa para terapia de inducción y tacrolimus a dosis bajas (Prograf) y baja dosis de sirolimus (Rapimune) se usa para terapia de mantenimiento. En una realización, alemtuzumab (Campath) se usa para terapia de inducción. Véase Teuteberg y col., Am J Transplantation, 10 (2): 382-388. 2010; van der Windt y otros, 2009, Am. J. Transplantation 9 (12): 2716-2726. 2009; Shapiro, The Scientist, 20 (5): 43. 2006; Shapiro y col., N Engl J Med. 355: 1318-1330. 2006. La inmunosupresión también se puede lograr usando regímenes que no sean medicamentos, que incluyen, entre otros, irradiación de todo el cuerpo, irradiación tímica y esplenectomía total y/o parcial. Estas técnicas también se pueden usar en combinación con uno o más fármacos/agentes inmunosupresores.

**[0285]** Se ha proporcionado tiempo suficiente para permitir el injerto (por ejemplo, 1 semana, 3 semanas, y similares) y se determina el injerto con éxito usando cualquier técnica conocida para un experto en la técnica. Estas técnicas pueden incluir, entre otras, una o más técnicas que pueden usarse para determinar si el injerto tiene éxito. El injerto exitoso puede referirse a relativo a ningún tratamiento, o en algunas realizaciones, en relación con otros enfoques para trasplante (es decir, el injerto tiene más éxito que cuando se usan otros métodos/tejidos para trasplante). En algunos casos, el injerto exitoso se ilustra por una menor necesidad de inmunosupresión. Esta menor necesidad de inmunosupresión puede incluir la disminución de una dosis de uno o más fármacos/agentes inmunosupresores, una disminución en el número de tipos de fármacos/agentes inmunosupresores requeridos, una duración más corta de la inmunosupresión y/o una inmunosupresión de mantenimiento inferior o nula. El injerto exitoso se puede evaluar monitorizando o ensayando la funcionalidad (parcial o total) del tejido trasplantado. Para xenoinjertos de corazón, esto puede incluir, por ejemplo, la monitorización mediante palpación o mediante telemetría continua. La bradicardia progresiva y la amplitud QRS decreciente son predictivas de una falla inminente del injerto (xenotrasplante de corazón abdominal heterotópico; para detalles de la técnica, véase, por ejemplo, Adams et al., 1999 Ann Thorac Surg. Jul; 68 (1): 265-8). Otros métodos empleados por los expertos en la materia para monitorizar la función del xenoinjerto cardíaco (en un xenotrasplante heterotópico de corazón torácico) incluyen, por ejemplo, analizar continuamente la frecuencia cardíaca, el ritmo y el segmento ST en cables ECG II y V5 (Sirecust 960; Siemens, Erlangen, Alemania); monitorear continuamente la presión arterial y la función cardíaca a través de un catéter en la arteria femoral (Pulsion, Múnich, Alemania) y un catéter venoso central (Arrow, Erding, Alemania) introducido a través de la vena cefálica; medir el gasto cardíaco con la técnica de termodilución arterial femoral (PiCCO; Pulsion); evaluar la frecuencia cardíaca del receptor y el injerto mediante un ECG externo colocado sobre la pared derecha del tórax diariamente después de la operación; realizar exámenes ecocardiográficos del injerto en intervalos regulares usando un escáner uteográfico y un transductor de matriz de fase de 10 MHz (Sonos 5500; Hewlett Packard, Andover, MA, EE.UU.) y realizar un angiograma por TC (Bauer et al., 2010 Xenotransplantation 17: 243 - 249).

## EJEMPLOS

**Generación y caracterización de cerdos multi-transgénicos con expresión endotelial específica, utilizando**

**dos genes anticoagulantes diferentes.**

*Ejemplo 1: Construcción de vectores endoteliales específicos para la producción de cerdos transgénicos.*

5 **[0286]** La expresión específica del endotelio proporciona una estrategia para limitar la expresión de transgenes bioactivos que podrían tener efectos adversos si se expresan de forma ubicua. Dos sistemas de expresión usados (en este ejemplo) son el sistema promotor/intensificador ICAM-2 porcino y el sistema promotor/potenciador Tie-2 de ratón.

10 **[0287]** Los ejemplos de transgenes anticoagulantes expresados a través de estos sistemas de vectores endoteliales específicos incluyen:

1. **CD39 humano** (vector pREV859B, que utiliza el promotor/potenciador Tie-2 y vector pREV861 que utiliza el promotor/potenciador ICAM-2),
- 15 2. **trombomodulina humana** (vector pREV872, que utiliza el promotor/potenciador ICAM-2),
3. **receptor de proteína C endotelial humana** (vector pREV873, que utiliza el promotor/potenciador ICAM-2),
4. **inhibidor de la vía del factor tisular humano** (vector pREV871, que utiliza el promotor/potenciador ICAM-2).

20 **[0288]** Todos estos transgenes codifican proteínas que pueden inhibir la trombosis vascular durante el xenotrasplante. Se ha demostrado que estos vectores dirigen la expresión transgénica en células endoteliales porcinas transfectadas transitoria o establemente. La Figura 1 muestra el análisis de expresión de TM y EPCR en células endoteliales porcinas inmortalizadas (IPEC) usando citometría de flujo. Los vectores específicos de endotelio de la presente invención se pueden usar para producir cerdos multi-transgénicos que exhiben buena viabilidad mientras que producen anticoagulantes terapéuticos localmente dentro de los órganos, células o tejidos de donantes para el soporte de xenotrasplante.

**Construcción de vector:**

30 **[0289]** El vector de estructura para estas construcciones contenía aislantes de  $\beta$ -globina de pollo 5' y 3', un sitio de clonación múltiple (MCS) y una señal de poliadenilación de SV40. Los insertos transgénicos se subclonaron en el MCS aguas arriba de la señal de poliadenilación de SV40 usando sitios de restricción apropiados descritos a continuación para cada vector.

35 **[0290]** El vector **pREV859B**, Tie-2 CD39 fue construido por inserción de un fragmento Nhe1/Sal1 que contiene el Tie-2 potenciador/promotor, y un fragmento de Xho1 que contiene el transgén CD39 en el vector de base.

**[0291]** El vector **pREV861**, ICAM-2 CD39 se construyó mediante la escisión del potenciador y promotor Tie-2 en el vector pREV859B con BssHII y BstB1 y la inserción de un fragmento BssHII/BstBI que contiene el potenciador y promotor de ICAM-2.

40 **[0292]** El vector **pREV871**, ICAM-2 TFPI se construyó extirpando el potenciador/promotor Tie-2 a partir de un vector Tie-2 TFPI previamente construido y reemplazándolo con un fragmento BssHII/BstBI que contiene el potenciador y promotor de ICAM-2.

45 **[0293]** El vector **pREV872**, ICAM-2 TM se construyó mediante la inserción de un fragmento potenciador/promotor ICAM-2 Spe1/Not1, así como un fragmento Not1/Sal1 que contiene el transgén TM en el vector base.

50 **[0294]** El vector **pREV873**, ICAM-2 EPCR se construyó mediante la inserción de un fragmento Spe1/NotI que contiene el potenciador/promotor ICAM-2, y un fragmento NotI/Spe1 que contiene el transgén EPCR en el vector base.

***Ejemplo 2: Preparación de línea celular para transferencia nuclear******Aislamiento de líneas celulares:***

55 **[0295]** Una línea celular (183-6-6) se utilizó como el fondo genético para las transfecciones para agregar los transgenes adicionales, y en última instancia para la transferencia nuclear para generar cerdos. Estas líneas celulares se produjeron mediante la cría de cerdos GTKO (Dai et al., (2002) Nature biotechnology 20, 251-255; Phelps et al., Science, (2003) 299: 411-414) con líneas de cerdo transgénico hCD46 de expresión ubicua (Loveland et al., Xenotransplantation, 2004, 11: 171: 183). La línea celular 186-6-6 se confirmó por genotipo y fenotipo como homocigotos GTKO y hCD46 transgénicos. Las células se prepararon para su uso en NT de la siguiente manera: se aisló una línea celular de fibroblastos fetales del feto 183-6-6 el día 36 de gestación. El feto se trituró a través de un tamiz metálico de 60 mallas utilizando unas pinzas quirúrgicas curvas lentamente para no generar calor excesivo. La suspensión celular se sedimentó y se resuspendió en DMEM que contenía un 20% de suero bovino fetal y Antibiótico-Antimicótico (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las células se cultivaron durante cuatro días y se

crioconservaron.

**Preparación de fragmento de plásmido para transfección:**

5 **[0296]** El fragmento de plásmido pREV 859B se preparó para la transfección mediante digestión con enzimas de restricción con BsmBI y AhdI. pREV 861 se preparó mediante digestión con BsmBI y EciI. pREV 872 se preparó por digestión con DrrI. pREV 873 se preparó mediante digestión con BsmBI y EciI (todas las enzimas de restricción de New England Biolabs, Ipswich, MA). Los fragmentos de plásmido generados por digestión se separaron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% (Cambrex, East Rutherford, NJ) para eliminar la cadena principal del plásmido. El fragmento de casete que contiene el transgén de interés se escindió y se incubó dos veces en 2 volúmenes de tampón de IX agarosa en hielo durante 15 minutos. Después de eliminar el tampón, el gel se fundió a 65°C durante 10 minutos. Después de 10 minutos a 42°C, 100 µL de agarosa (New England Biolabs) por 100 µL de gel fundido e incubado como mínimo 1 hora a 42°C. Se añadió un décimo de volumen de acetato de sodio 3M a la masa fundida del gel y se incubó en hielo durante 15 minutos. La centrifugación a 15.000 rpm durante 15 minutos a 4°C separa cualquier agarosa no digerida. Se añadieron dos volúmenes de etanol al 100% al sobrenadante y se usó la centrifugación para sedimentar el fragmento de ADN. Se usó etanol al 70% para lavar el sedimento antes de secar a 37°C. El sedimento se resuspendió en TE.

**Transfección, selección, cosecha de colonias para detección:**

20 **[0297]** Los fibroblastos porcinos de cerdo, la línea 183-6-6, se transfectaron con pREV872 (pICAM-2 hTM) o pREV859B (Tie-2 hCD39) y pREV828 (un vector de gen marcador seleccionable de Puromicina).

Transfección pREV859B (Tie-2/hCD39)

25 **[0298]** Se co-electroporaron aproximadamente 5 millones de células con 3 µg del vector pREV859B y 5 µg del vector marcador seleccionable. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células transfectadas se seleccionaron con la adición de 1 µg/ml del antibiótico Puromicina (InvivoGen, San Diego, CA) en placas de 20 x 10 cm a una densidad de aproximadamente 25.000 células por placa. Los medios se cambiaron 72 horas después del inicio de la selección de puromicina. Las colonias se cosecharon 9 días después del inicio de la selección. 60 colonias crecieron y se dividieron en dos muestras: una para el análisis de PCR y otra para la expansión. El análisis de PCR para pREV859B se realizó como se describe en este documento. Treinta y dos colonias positivas a PCR fueron agrupadas y crioconservadas para su uso futuro en transferencia nuclear.

Transfección pREV872 (ICAM2/hTM)

35 **[0299]** Aproximadamente 5 millones de células fueron co-electroporadas con 5 µg del vector pREV872 y 0,5 µg del vector marcador seleccionable. Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células transfectadas se seleccionaron con la adición de 1 µg/ml de la Puromicina antibiótica (InvivoGen, San Diego, CA) en placas de 30 x 10 cm a una densidad de aproximadamente 65.000 células por placa. Los medios se cambiaron 72 horas después del inicio de la selección de puromicina. Las colonias se cosecharon 14 días después del inicio de la selección. Crecieron 22 colonias y se dividieron en dos muestras: una para el análisis de PCR y otra para la expansión. El análisis de PCR para pREV872 se realizó como se describe en este documento. Se combinaron tres colonias PCR positivas y se crioconservaron para uso futuro en transferencia nuclear.

45 **[0300]** Se usaron procedimientos similares para la transfección, selección y recolección de colonias utilizando el vector pREV861 y el vector pREV873 (PICAM-2 huEPCR) co-transfectado en combinación con el vector pREV872 (PICAM-2 huTM).

**Ejemplo 3: Producción de cerdos multi-transgénicos por transferencia nuclear (NT)**

50 **[0301]** Varios métodos se pueden utilizar para producir los cerdos multi-transgénicos de la presente invención. El siguiente es un ejemplo en el que las células del donante utilizadas (línea 227-3 y línea 183-6-6) fueron el origen genético homocigótico GTKO (carecían de cualquier función αGT) y también eran transgénicos para CD46. Las células donantes se transfectaron, seleccionaron y examinaron positivas para los vectores pREV859B, pREV861, pREV872, y/o pREV873, como se describe en el Ejemplo 2, antes de usarse para NT. En algunos casos, se agruparon juntas múltiples colonias de células transfectadas y seleccionadas, todas de detección positiva para el (los) transgén(es), antes de su uso en NT.

60 **[0302]** Las células donantes (células de fibroblasto fetal o adulto) para NT se cultivaron en de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco, cat nº 1 1995-065) suplementado con suero de ternera fetal 10-20% y factor de crecimiento de fibroblastos básicos 0-4ng/ml, en una incubadora humidificada al 5% de O<sub>2</sub>, 5% de CO<sub>2</sub> balanceado con nitrógeno a 37°C. Para el cultivo, las células se sembraron 3-7 días antes del procedimiento de transferencia nuclear, a una dilución apropiada tal que las células alcanzarían la confluencia 24-48 horas antes de la transferencia nuclear. El día de la transferencia nuclear, las células del donante se recogieron aproximadamente 30-45 minutos antes de su uso en la reconstrucción embrionaria usando Tripsina-EDTA (Gibco, cat nº 25300-054), produciendo una

suspensión celular única en medio de retención adecuado (p. ej. tampón Hepes M199, Gibco cat nº 12350-039).

**[0303]** los procedimientos de NT se realizaron en ovocitos madurados *in vitro* (Desoto Biosciences, Christiansburg, VA) utilizando métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Polejaeva, et al., (2000) Nature 407, 86-90, Dai et al., (2002) Nature biotechnology 20, 251 - 255, Campbell et al., (2007) Theriogenology 68 Suppl 1, S214 - 231, Vatja et al., (2007) Reprod Fertil Dev 19, 403 - 423). La fusión eléctrica y la activación de los ovocitos reconstruidos se realizó utilizando un ECM2001 Electrocell Manipulator (BTX Inc., San Diego). Los embriones de transferencia nuclear fusionados y activados se mantuvieron en cultivo en medio NCSU-23 tamponado con fosfato (J Rprod Fertil Suppl. 1993; 48: 61-73) durante 1-4 h a 38,5°C, y luego se transfirieron al oviducto de un cerdo receptor sincronizado por estro. Las cerdas cruzadas (blanca grande/Duroc/Landrace) (280-400 lbs) se sincronizaron como animales receptores mediante la administración oral de 18-20 mg de Matriz (Altrenogest, Hoechst, Warren, NJ) mezcladas en su alimentación. La matriz se alimentó durante 14 días consecutivos. La gonadotropina coriónica humana (hCG, 1000 unidades, Intervet America, Millsboro, DE) se administró por vía intramuscular 105 horas después del último tratamiento con Regu-Mate. Las transferencias de embriones se realizaron mediante laparotomía ventral media 22-26 h después de la inyección de hCG. Gineadotropina sérica de yegua preñada (PMSG, 1000 UI) y hCG (500 UI) que utilizamos los días 10 y 13 después de la transferencia para el mantenimiento del embarazo. El embarazo se confirmó mediante ultrasonografía 28 días después de la transferencia. Los embarazos fueron monitoreados a partir de entonces semanalmente. Todos los lechones nacieron por parto natural.

#### **Ejemplo 4: Genotipado de células y animales transgénicos por PCR y análisis de transferencia Southern**

##### **Análisis de genotipo**

**[0304]** ADN genómico fue extraído de las células transfectadas, y muestras de sangre o de tejido de cada lechón a ensayar. En resumen, las muestras de tejido se lisaron durante la noche a 60°C en una incubadora con aproximadamente 1 ml de solución de lisis (50 mM Tris pH 8,0, 0,15 M NaCl, 0,01 M EDTA, 1% SDS, 25% perclorato de sodio y 1% de β-Mercaptoetanol y Proteinasa K) por 175 mg de tejido. El ADN se precipitó con alcohol isopropílico después de la extracción con fenol/cloroformo. El ADN resolubilizado se trató con RNasa (1 mg/ml) + RNasa T1 (1000 U/ml) a 37°C durante 1 hora, con proteinasa K (20 mg/ml) a 55°C durante 1 hora, se extrajo con fenol/cloroformo, precipitado y resuspendido en Tris etilendiamina-ácido tetraacético (EDTA). El ADN se aisló a partir de muestras de sangre entera usando un kit de aislamiento de ADN para sangre de mamífero (Roche Diagnostics Indianapolis, IN).

**[0305]** Para el análisis de transferencia Southern, se digirieron aproximadamente 10 µg de ADN con la enzima de restricción apropiada (detalle a continuación) y se separó en un gel de agarosa al 1%. Después de la electroforesis, el ADN se transfirió a una membrana de nailon y se sondeó con una sonda marcada con digoxigenina en el extremo 3' (secuencia de la sonda a continuación). Las bandas se detectaron usando un sistema de sustrato quimioluminiscente (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN).

##### **Cebadores y sondas:**

pREV859B - Tie-2/huCD39

**[0306]** La presencia del constructo de pREV859B integrada se determinó mediante PCR usando los cebadores CD39L3 y CD39R3 que se dirigen a un fragmento de 585 pb dentro de la secuencia codificante de CD39.

CD39L3: AGTATGGGATTGTGCTGGATG  
CD39R3: CATAGAGCGAAATTGCAGAG

**[0307]** La presencia del constructo de pREV859B integrada se confirmó mediante el análisis de transferencia Southern usando un digesto de BanHI y sondaje con sonda CD39L3/R3-dig.

Secuencia de sonda de CD39L3/R3-dig:

**[0308]**

## ES 2 680 636 T3

5 AGTATGGGATTGTGCTGGATGCGGGTTCTTCTCACACAAGTTTATA  
CATCTATAAGTGGCCAGCAGAAAAGGAGAATGACACAGGCGTGGT  
GCATCAAGTAGAAGAATGCAGGGTTAAAGGTCCTGGAATCTCAA  
10 ATTTGTTTCAGAAAGTAAATGAAATAGGCATTTACCTGACTGATTGC  
ATGGAAAGAGCTAGGGAAGTGATTCCAAGGTCCCAGCACCAAGAG  
ACACCCGTTTACCTGGGAGCCACGGCAGGCATGCGGTTGCTCAGGA  
TGGAAAGTGAAGAGTTGGCAGACAGGGTTCTGGATGTGGTGGAGA  
15 GGAGCCTCAGCAACTACCCCTTTGACTTCCAGGGTGCCAGGATCAT  
TACTGGCCAAGAGGAAGGTGCCTATGGCTGGATTACTATCAACTAT  
CTGCTGGGCAAATTCAGTCAGAAAACAAGGTGGTTCAGCATAGTCC  
20 CATATGAAACCAATAATCAGGAAACCTTTGGAGCTTTGGACCTTGG  
GGGAGCCTCTACACAAGTCACTTTTGTACCCAAAACCAGACTATC  
GAGTCCCCAGATAATGCTCTGCAATTTGCGCTCTATG

25 **[0309]** En algunos casos, se utilizó la sonda Tie2L/R-dig:

TGGCAGCTTCTGCTTGCTTCGATCAGCTGCCAGTTAGGTAGCAACA  
AACTTGGGATAAGTAACATAAGGAGGGTAGTTACAAGCAACAAGT  
30 CATCTTAGAACCTCTGCTAAGTCAAGACCCAGAGGCAAGAAGAAG  
TTGGGAATTGGTTGGGGAAAAGTAGGGGGCTCCACCTTGCTGGCTG  
GCTGAGTCACAAGCAAGGAATTTCCCCACCAGACAACCCAGCTTTT  
35 TAACAGAAGCCCAGGAACGCAAAGCTTTAAGCCCTTCTCTTCGTTT  
TCCTGATACAAAGATGCTCTTTTGCAGTCAAAGCAGCCAGAGTCAG  
CCCCACACATATATAAACAGATTAGCTCAGGAATGGAGGCCTGCC  
40 TGAA

### pREV861 - pICAM2/CD39

45 **[0310]** La presencia de constructo de pREV861 integrada se determinó por PCR usando cebadores CD39L3 y CD39R3 que se dirige a un fragmento de 585bp dentro de la región de codificación de CD39.

CD39L3: AGTATGGGATTGTGCTGGATG

CD39R3: CATAGAGGCGAAATTGCAGAG

50 **[0311]** La presencia del constructo de pREV861 integrada se confirmó mediante análisis de transferencia Southern usando un digesto BamHI y sondaje con sonda CD39L3/R3-dig.

Secuencia de sonda de CD39L3/R3-dig:

55 **[0312]**

60

65

5 AGTATGGGATTGTGCTGGATGCGGGTCTTCTCACACAAGTTTATA  
 CATCTATAAGTGGCCAGCAGAAAAGGAGAATGACACAGGCGTGGT  
 GCATCAAGTAGAAGAATGCAGGGTTAAAGGTCCTGGAATCTCAA  
 ATTTGTTTCAGAAAAGTAAATGAAATAGGCATTTACCTGACTGATTGC  
 10 ATGGAAAGAGCTAGGGAAGTGATTCCAAGGTCCCAGCACCAAGAG  
 ACACCCGTTTACCTGGGAGCCACGGCAGGCATGCGGTTGCTCAGGA  
 TGGAAAGTGAAGAGTTGGCAGACAGGGTTCTGGATGTGGTGGAGA  
 GGAGCCTCAGCAACTACCCCTTTGACTTCCAGGGTGCCAGGATCAT  
 15 TACTGGCCAAGAGGAAGGTGCCTATGGCTGGATTACTATCAACTAT  
 CTGCTGGGCAAATTCAGTCAGAAAACAAGGTGGTTCAGCATAGTCC  
 CATATGAAACCAATAATCAGGAAACCTTTGGAGCTTTGGACCTTGG  
 20 GGGAGCCTCTACACAAGTCACTTTTGTACCCCAAACCAGACTATC  
 GAGTCCCCAGATAATGCTCTGCAATTCGCCTCTATG

pREV872 - pICAM2/huTM

25 **[0313]** La presencia del constructo de pREV872 integrada se determinó mediante PCR usando los cebadores TML y TMR que se dirigen a un fragmento de 533 pb dentro de la región codificante de TM.

TML: ACTGCAGCGTGGAGAACGGC  
 TMR: GGTGTTGGGGTCGCAGTCGG

30 **[0314]** La presencia del constructo de pREV872 integrada se confirmó mediante análisis de transferencia Southern usando un digesto BamHI y sondaje con sonda TML/R-dig.

Secuencia de sonda TML/R-dig:

**[0315]**

40 ACTGCAGCGTGGAGAACGGCGGCTGCGAGCACGCGTGCAATGCGA  
 TCCCTGGGGCTCCCCGCTGCCAGTGCCCAGCCGGCGCCGCCCTGCA  
 GGCAGACGGGCGCTCCTGCACCGCATCCGCGACGCAGTCCTGCAAC  
 GACCTCTGCGAGCACTTCTGCGTTCCCAACCCCGACCAGCCGGGCT  
 45 CCTACTCGTGCATGTGCGAGACCGGCTACCGGCTGGCGGCCGACCA  
 ACACCGGTGCGAGGACGTGGATGACTGCATACTGGAGCCCAGTCC  
 GTGTCCGACGCGCTGTGTCAACACACAGGGTGGCTTCGAGTGCCAC  
 50 TGCTACCCTAACTACGACCTGGTGGACGGCGAGTGTGTGGAGCCCC  
 TGGACCCGTGCTTCAGAGCCAACTGCGAGTACCAGTGCCAGCCCCT  
 GAACCAAAC TAGCTACCTCTGCGTCTGCGCCGAGGGCTTCGCGCCC  
 55 ATTCCCACGAGCCGCACAGGTGCCAGATGTTTTGCAACCAGACTG  
 CCTGTCCAGCCGACTGCGACCCCAACACC

pREV873 - pICAM2/huEPCR

60 **[0316]** La presencia de constructo de pREV873 integrada se determinó por PCR usando cebadores EPCR5' y 858R3381 que se dirige a un fragmento de 692 pb desde el interior de la región de codificación huEPCR al exterior de la región de codificación huEPCR.

65 EPCR5': TCCTGGGCTGTGAGCTGCCT  
 858.R3381: CCCCTGAACCTGAAACATA

**[0317]** La presencia del constructo de pREV873 integrada se confirmó mediante análisis de transferencia Southern usando un digesto BamHI y sondaje con la sonda EPCR5'/3'dig.  
Secuencia de sonda de excavación EPCR3'/3':

5

```
TCCTGGGCTGTGAGCTGCCTCCCGAGGGCTCTAGAGCCCATGTCTT
CTTCGAAGTGGCTGTGAATGGGAGCTCCTTTGTGAGTTTCCGGCCG
GAGAGAGCCTTGTGGCAGGCAGACACCCAGGTCACCTCCGGAGTG
GTCACCTTACCCTGCAGCAGCTCAATGCCTACAACCGCACTCGGT
ATGAACTGCGGGAATTCCTGGAGGACACCTGTGTGCAGTATGTGCA
GAAACATATTTCCGCGGAAAACACGAAAGGGAGCCAAACAAGCCG
CTCCTACACTTCGCTGGTCCTGGGCG
```

10

15

#### **Ejemplo 5: Análisis fenotípico (pCTLA4-Ig) de tejidos de cerdos transgénicos**

##### **Transferencia Western para la expresión de pCTLA4-Ig:**

**[0318]** Los lisados tisulares y celulares se pueden preparar por homogeneización en presencia de inhibidores de proteasa (Thermo Scientific, Rockford, IL) seguido de la adición de SDS (concentración final al 1%) y centrifugación para eliminar residuos celulares residuales. La concentración de proteína se determina con un kit de ensayo de proteína con ácido bicinonínico (BCA) (Pierce, Rockford, IL). Muestras desnaturalizadas térmicamente y reducidas por  $\beta$ -mercaptoetanol (10-20~g de proteína) están fraccionadas en 4-12% de geles de gradiente BisTris SDS (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se usa CTLA4-Ig/Fc humana recombinante (R&D Systems, Minneapolis, MN) como una proteína de control estándar. Después de la electroforesis, las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa, se tiñen con Memcode Protein Stain (Thermo Scientific) para la visualización de proteínas totales y se bloquean con tampón de bloqueo de caseína (Sigma-Aldrich., St. Louis, MO). La membrana bloqueada se incuba en conejo anti-IgG1 humano-peroxidasa de rábano (HRP) (The Binding Site, San Diego, CA), que reconoce la región de cadena pesada de IgG1 humana de pCTLA4-Ig. Se detectan bandas inmunorreactivas con Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) e imágenes fotográficas.

25

30

##### **Ejemplo 6: Análisis fenotípico de animales que expresan transgenes en el endotelio**

**[0319]** Para detectar la expresión de los diversos transgenes en el endotelio de cerdos transgénicos producidos, se adquirieron células endoteliales aórticas de animales que se determinó que eran genotípicamente positivos y se examinaron mediante citometría de flujo.

40

##### **Aislamiento de células endoteliales aórticas**

**[0320]** Se retiraron 3 a 6 pulgadas de aorta descendente (vaso) del cerdo eutanasiado y se colocaron en RPMI + Antibiótico/Antimicótico (Invitrogen, Carlsbad, CA). El vaso se lavó minuciosamente usando DBPS (Mediatech, Inc. Manassas, VA) lavando el interior y el exterior del vaso con múltiples volúmenes de DPBS para eliminar la sangre. El exterior del vaso fue recortado de cualquier exceso de tejido, como músculo y grasa. Ambos extremos del recipiente fueron cerrados con abrazadera. El recipiente se llenó con RPMI +100 unidades de actividad/ml de colagenasa tipo 4 (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ). Luego se incubó durante 15-30 minutos a 37°C. Se retiraron las abrazaderas y se vació el contenido del recipiente en un tubo de 15 ml y se inundó el vaso con 10 ml adicionales de RPMI. Esta digestión con colagenasa se repitió hasta tres veces. Las fracciones se mantuvieron separadas. Las fracciones celulares se sedimentaron y se lavaron con 10 ml de RPMI. Cada fracción celular se sembró en placas separadas de 10 cm en 10 ml de RPMI + 10% de FBS + IX Antibiótico/antimicótico.

45

50

##### **Detección de la expresión transgénica antiocoagulante (TM y CD39) en células endoteliales mediante citometría de flujo**

55

**[0321]** Las células endoteliales se cosecharon 24-72 horas después del aislamiento para medir la expresión de TM o CD39 mediante citometría de flujo. Se contó el número de células endoteliales y se ajustó por dilución o concentración a  $10 \times 10^6$  por ml en tampón de tinción (BD Pharmingen, San Diego, CA). Las células se expusieron a anticuerpo según la sugerencia del fabricante a una concentración de 20  $\mu$ l de anticuerpo por  $1,0 \times 10^6$  células.

60

**[0322]** Para la expresión de TM: se usó CD141 anti-humano marcado por PE (BD Pharmingen, San Diego, CA). Se usó IgG1 k de ratón PE como control de isotipo.

Para la expresión de CD39: se utilizó CD39 antihumano marcado con PE (BD Pharmingen, San Diego, CA). Se usó IgG2b de ratón PE como control de isotipo.

65

[0323] Las células se incubaron con el anticuerpo apropiado durante 30 min a 4°C. Las células se lavaron a continuación con 2-5 ml de tampón de tinción. Las células se resuspendieron en 0,5 ml de tampón de tinción. El marcado del anticuerpo se registró midiendo el nivel de expresión de PE de 10.000 células por muestra usando citometría de flujo.

5

#### ***Histología e inmunofluorescencia (IF):***

[0324] Las muestras de tejido endotelial porcino se pueden eliminar y fijar en formalina al 10% o congelar en bloques de OCT (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA). Las secciones congeladas se cortan a 5 µm en un criostato y se tiñen con TFPI antihumano de conejo (policlonal, American Diagnostica, Stamford, CT, n° 4901), IgG1 antihumana de oveja (policlonal, The Binding Site, Birmingham, Reino Unido, n° AU006), CD46 antihumano de ratón (clon ON 137, mIgG2a, US Biological, Swampscott, MA), CD39 antihumano de ratón ((clon A1, AbD Serotec, Oxford, RU), CD201 antihumano de ratón (EPCR) (clon RCR-252, BD Pharmingen, San Jose, CA) o CD141 (CD) antihumano de ratón (clon 1A4, BD Pharmingen). Se realizan controles de isotipo para IgG de conejo (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), IgG de oveja (Jackson), IgG2a de ratón (BD Pharmingen) e IgG1 de ratón (clon MOPC-31C, BD Pharmingen), respectivamente. La tinción de inmunofluorescencia (IF) se realiza mediante un procedimiento de 3 pasos. Las secciones congeladas se secan y se fijan en acetona fría. (Sigma, St. Louis, MO), seguido de bloqueo con avidina-biotina (Invitrogen, Carlsbad, CA). También se incluyeron etapas de bloqueo del suero de la especie de hospedante Ab secundario (suero de burro 10%, Jackson). Los anticuerpos se diluyen en PBS y las incubaciones se realizan durante 1 hora a temperatura ambiente en una cámara humidificada. El Ab secundario usado es anti-IgG de burro biotinilado (conejo, oveja o ratón) por 45 mm y el Ab terciario utilizado es estreptavidina conjugada con fluoresceína por 30 mm (Jackson). Los portaobjetos se lavan en PBS entre pasos, se cubren con cubreobjetos de 22x30 mm (VWR, West Chester, PA) y se conservan utilizando Slowfade con DAPI (Invitrogen). Las imágenes IF se pueden tomar usando una cámara Olympus DP71 en un microscopio Provis y se pueden analizar utilizando el software controlador DP (Olympus, Center Valley, PA) con un aumento de 200x.

10

15

20

25

#### ***Frotis celulares para el análisis IF:***

[0325] En algunos casos, los frotis celulares pueden prepararse a partir de órganos y tejidos que contienen endotelio, para determinar la presencia de la proteína transgénica a través de IF. Se sigue el siguiente procedimiento: se colocan aproximadamente 1x1 cm de tejido en un tubo con tapa a presión de 4 ml y se agrega 1 ml de colagenasa DMEM + a 50-100 unidades de actividad/ml. El tubo se incuba durante 10 min a 37°C. Luego se pica el tejido con una tijera de mango largo colocando las tijeras en el tubo y abriendo y cerrando las hojas de las tijeras durante 3-5 minutos. El tubo se incuba a continuación durante 10 minutos a 37°C. Se repite el mezclado durante 3-5 minutos más, se añaden 2 ml de DPBS y se sedimentan las células resultantes mediante centrifugación. Luego se lavan en 3 ml de DPBS y se resuspenden en 250 µl de Cytfix Fixation Buffer (BD Biosciences). Se incuban en el tampón durante 20 minutos a 4°C. A continuación, se añaden 2 ml de DPBS y las células se sedimentan. Se lavan en 3 ml de agua destilada y luego se resuspenden en 1 ml de agua destilada. Se colocan 5 µl de solución celular en un portaobjetos de vidrio superfrost plus. Los portaobjetos se dejan secar al aire y se pueden almacenar a 4°C por hasta una semana. Los portaobjetos se tiñeron siguiendo el mismo protocolo IF que para los tejidos bloqueados y seccionados (véase arriba).

30

35

40

45

#### ***PCR en tiempo real (RTPCR) para medir la transcripción de TM en muestras de cerdos multi-transgénicos***

[0326] Muestras de pulmón, hígado, corazón, aorta y riñón se obtuvieron de lechones 448-01, 448-02, 448-03 y 450-06 postmortem. Los tejidos se homogeneizaron y se aisló el ARN total usando Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo el procedimiento de Chomczynski y Sacchi (Anal Biochem. 1987 Abr; 162 (1): 156 - 9). La transcripción inversa se realizó usando el kit de síntesis iScript cADN (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se formuló una mezcla de reacción que contenía 1 µg de ARN para la muestra, una transcriptasa no inversa y una reacción de control sin molde. Además, todas las muestras fueron tratadas con ADNasa I (Invitrogen, Carlsbad, CA) para prevenir la contaminación del ADN.

50

55

60

[0327] Los cebadores de PCR para la amplificación de hTM fueron diseñados a partir de la secuencia del constructo 872 (cebador directo: TTCAGAGCCAACTGCGAGTA y cebador inverso: AACCGTCGTCAGGATGTAG). El ADNc se amplificó usando iQTM SYBR Green Supermix en el sistema de detección de PCR de transcripción inversa MyiQ (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EE.UU.). El ADN complementario se amplificó usando SYBR Green PCR Master Mix en el Sistema de Detección de Secuencias ABI Prism® 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA). No se incluyó una transcriptasa inversa, un tipo silvestre y una muestra sin plantilla en cada placa como controles negativos. Se analizaron tres repeticiones de cada tejido. El número de copias de hTM en todos los tejidos se calculó usando el método de curva estándar.

#### **RESULTADOS:**

65 ***Producción de cerdos multitransgénicos, caracterización genotípica y fenotípica***

**[0328]** Cinco sesiones de transferencia nuclear, usando 183-6-6 células cribadas transgénicas para los transgenes anticoagulantes pREV859B, pREV861, pREV872 o pREV873, como donantes nucleares, dieron como resultado la producción de cinco camadas de lechones. Treinta y tres lechones nacieron y 23 estaban vivos después del nacimiento. Catorce de estos lechones fueron positivos para un transgén anticoagulante en su genoma (trece transgénicos para TM, y uno transgénico para CD39). En algunos casos, dos diferentes transgenes anticoagulantes (TM y EPCR) estaban presentes en el mismo lechón. Se demostró que el lechón CD39 multitransgénico expresa CD39 en el endotelio mediante citometría de flujo IF de células endoteliales aisladas. Se demostró que los trece lechones TM multitransgénicos expresan TM en el endotelio mediante citometría de flujo IF de células endoteliales aisladas. Además, un subconjunto de estos lechones TM multitransgénicos se analizaron mediante inmunohistoquímica (IHC) y mostraron la expresión IF de TM en órganos (mediante frotis de células) y/o endotelio de tejido de la cola (Figura 4). La expresión de transcripción de huTM mediante RTPCR también se determinó (Figura 5). La siguiente tabla detalla el genotipo y los datos de expresión de la proteína TM en estos animales.

**Tabla 1. Cerdos multitransgénicos\* producidos con transgenes anticoagulantes endoteliales específicos.**

Generación y genotipo de lechones			Datos de fenotipo		
Vector presente en células transgénicas utilizadas para generar lechones a través de NT	Ident. de lechón	Genotipo Anticoagulante	Citometría de flujo (Endo), TM	IHC, TM	Frotis celular de órganos, TM
pREV872, pREV873	424-01	TM / EPCR	(+)	(+) cola	(+) ht, ki, li, lu
pREV872, pREV873	424-02	TM/EPCR	(+)	(+) lu,li, ht,ao,ki	nd
pREV872, pREV873	424-03	TM / EPCR	(+)	(+) cola	nd
pREV872	448-01	TM	(+)	nd	(+) ht, ki, li, lu
pREV872	448-02	TM	(+)	nd	(+) ht, ki, li, lu
pREV872	448-03	TM	(+)	(+) lu,li, ht,ao	(+) ht, ki, li, lu
pREV872	448-04	TM	(+)	nd	(+) ht, ki, li, lu
pREV872	448-05	TM	(+)	nd	(+) ht, ki, li, lu
pREV872	450-01	TM	(+)	nd	nd
pREV872	450-05	TM	(+)	nd	nd
pREV872	450-06	TM	(+)	(+)lu,li, ht,ao	(+) ht, ki, li, lu
pREV872	450-07	TM	(+)	nd	nd
pREV872	451-03	TM	(+)	nd	(+) ht, ki, li, lu
Células transgénicas donantes (utilizadas para NT)	Ident. de lechón	Genotipo Anticoagulante	Citometría de flujo (Endo), CD39	IHC, CD39	Frotis celular de órganos, CD39
pREV859B, pREV861	440-04	(Tie-2) CD39	(+)	(+) ht, ki, li, lu, ao	nd

\* Todos los cerdos fueron, además, transgénicos para la modificación genética GTKO y el transgén CD46. (Datos no mostrados). Esta es la genética de fondo de la línea celular donante 183-6-6 utilizada para generar los lechones multigéntricos con transgenes específicos endoteliales.

**[0329]** La Figura 3 muestra la expresión de TM en células endoteliales aisladas del lechón 424-01 determinado mediante citometría de flujo y expresión de CD39 en células endoteliales aisladas del lechón 440-04. Se recogieron muestras de tejidos de cola y órganos que contenían endotelio del lechón 424-01 a aproximadamente un mes de edad y se caracterizaron fenotípicamente por la expresión endotelial de TM por IF como se describe en el Ejemplo 6.

**[0330]** La Figura 4 muestra la expresión endotelial específica de TM determinada a través de IHC del tejido de la cola del lechón 424-03.

**[0331]** La Figura 5 muestra la expresión del transcrito TM por RTPCR en muestras obtenidas de lechones multitransgénicos 448-01, 448-02, 448-03 y 450-06. El número de copia de TM que se muestra es el número de copia de hTM presente en 50 ng de cADN.

## REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Un animal porcino transgénico que comprende modificaciones genéticas que dan como resultado (i) la falta de cualquier expresión de alfa 1,3 galactosiltransferasa funcional (GTKO); (ii) expresión de al menos un transgén inhibidor del complemento bajo el control de un promotor ubicuo; y (iii) expresión de al menos un transgén anticoagulante bajo el control de un promotor endotelial específico.
- 10 **2.** El animal transgénico de la reivindicación 1, en el que el anticoagulante es
- 10 a) trombomodulina; o
- b) seleccionado del grupo que consiste en CD39, hirudina, inhibidor de la ruta del factor tisular (TFPI), receptor de la proteína C de la célula endotelial (EPCR) y combinaciones de los mismos.
- 15 **3.** El animal transgénico de la reivindicación 1, que comprende además al menos un inmunomodulador adicional, opcionalmente en el que al menos un inmunomodulador se selecciona del grupo que consiste en CTLA4, CIITA-DN, CD47 y TRAIL.
- 20 **4.** El animal transgénico de la reivindicación 1, en el que
- 20 a) al menos dos transgenes se expresan específicamente en tejido endotelial; o
- b) el animal expresa específicamente al menos tres transgenes en el tejido endotelial.
- 25 **5.** Animal transgénico según la reivindicación 1, en el que el porcino expresa al menos un transgén adicional en el que el transgén adicional es un transgén citoprotector, en el que opcionalmente el transgén citoprotector se selecciona del grupo que consiste en A20, HO-1, FAT-1 y receptor alfa TNF soluble.
- 30 **6.** El animal transgénico de la reivindicación 4b), en el que
- 30 a) Al menos uno de los al menos tres transgenes es un inmunomodulador, en el que el anticoagulante se selecciona del grupo que consiste en TFPI, CD39, hirudina, trombomodulina, EPCR y combinaciones de los mismos y, opcionalmente, al menos un inmunomodulador se selecciona del grupo que consiste en CTLA4, CIITA-DN, CD47 y TRAIL; o
- b) los al menos tres transgenes comprenden trombomodulina, CD39 y CTLA4.
- 35 **7.** El animal transgénico de la reivindicación 1-6, en el que
- 40 a) el inhibidor del complemento es CD46, opcionalmente en el que el promotor es CAG
- b) el anticoagulante se selecciona del grupo que consiste en TFPI, CD39, hirudina, trombomodulina, EPCR y combinaciones de los mismos; y/o
- 40 c) el promotor específico endotelial es ICAM-2 o Tie-2; y/o el promotor es un promotor porcino.
- 45 **8.** Células derivadas del animal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde las células comprenden modificaciones genéticas que dan como resultado (i) la falta de cualquier expresión de alfa 1,3 galactosiltransferasa funcional (GTKO); (ii) expresión de al menos un transgén inhibidor del complemento bajo el control de un promotor ubicuo; y (iii) expresión de al menos un transgén anticoagulante bajo el control de un promotor endotelial específico.
- 50 **9.** Un órgano derivado del animal de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el órgano comprende modificaciones genéticas que dan como resultado (i) la falta de cualquier expresión de alfa 1,3 galactosiltransferasa funcional (GTKO); (ii) la expresión de al menos un transgén inhibidor del complemento bajo el control de un promotor ubicuo; y (iii) la expresión de al menos un transgén anticoagulante bajo el control de un promotor endotelial específico, donde opcionalmente el órgano se selecciona del grupo que consiste en corazón, pulmón, hígado y riñón.
- 55 **10.** El tejido derivado del animal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el tejido comprende modificaciones genéticas que dan como resultado (i) la falta de cualquier expresión de alfa 1,3 galactosiltransferasa funcional (GTKO); (ii) la expresión de al menos un transgén inhibidor del complemento bajo el control de un promotor ubicuo; y (iii) la expresión de al menos un transgén anticoagulante bajo el control de un promotor endotelial específico, en el que opcionalmente el tejido se selecciona del grupo que consiste en tejido vascular, tejido retinal y tejido corneal, y en el que opcionalmente el tejido vascular es un injerto vascular.
- 60 **11.** Órganos, tejidos o células porcinas derivadas de un animal de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde los órganos, tejidos o células comprenden modificaciones genéticas que resultan en: (i) la falta de expresión de alfa 1,3 galactosiltransferasa funcional (GTKO); (ii) la expresión de al menos un transgén inhibidor del complemento se expresa a partir de un promotor ubicuo; y (iii) la expresión de al menos un transgén anticoagulante bajo el control de un promotor endotelial específico para uso en un método para xenotrasplante que comprende administrar dichos órganos, tejidos o células a un primate que lo necesite.
- 65

12. Los órganos, tejidos o células porcinas para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde

- 5 a) el primate es un primate no humano;
- b) el primate es un ser humano;
- c) al menos un anticoagulante se selecciona del grupo que consiste en TFPI, CD39, hirudina, trombomodulina, EPCR y combinaciones de los mismos;
- e) al menos un inhibidor del complemento se selecciona de un grupo que consiste en CD46 o DAF;
- 10 f) el órgano se selecciona del grupo que consiste en corazón, pulmón, hígado y riñón; y/o
- g) el tejido se selecciona del grupo que consiste en tejido vascular, tejido retinal y tejido corneal.

13. Órganos, tejidos o células porcinas para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12, que comprenden además al menos un inmunomodulador adicional, en el que se selecciona opcionalmente al menos un inmunomodulador del grupo que consiste en CTLA4, CIITA-DN, CD47 y TRAIL.

14. Los organismos porcos, tejidos o células se utilizan de acuerdo con la reivindicación 12, donde el método incluye administrar un régimen inmunosupresor clínicamente relevante o un régimen de inducción de tolerancia al primate después de la xenotrasplante de los órganos, tejidos o células.

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Figura 1a

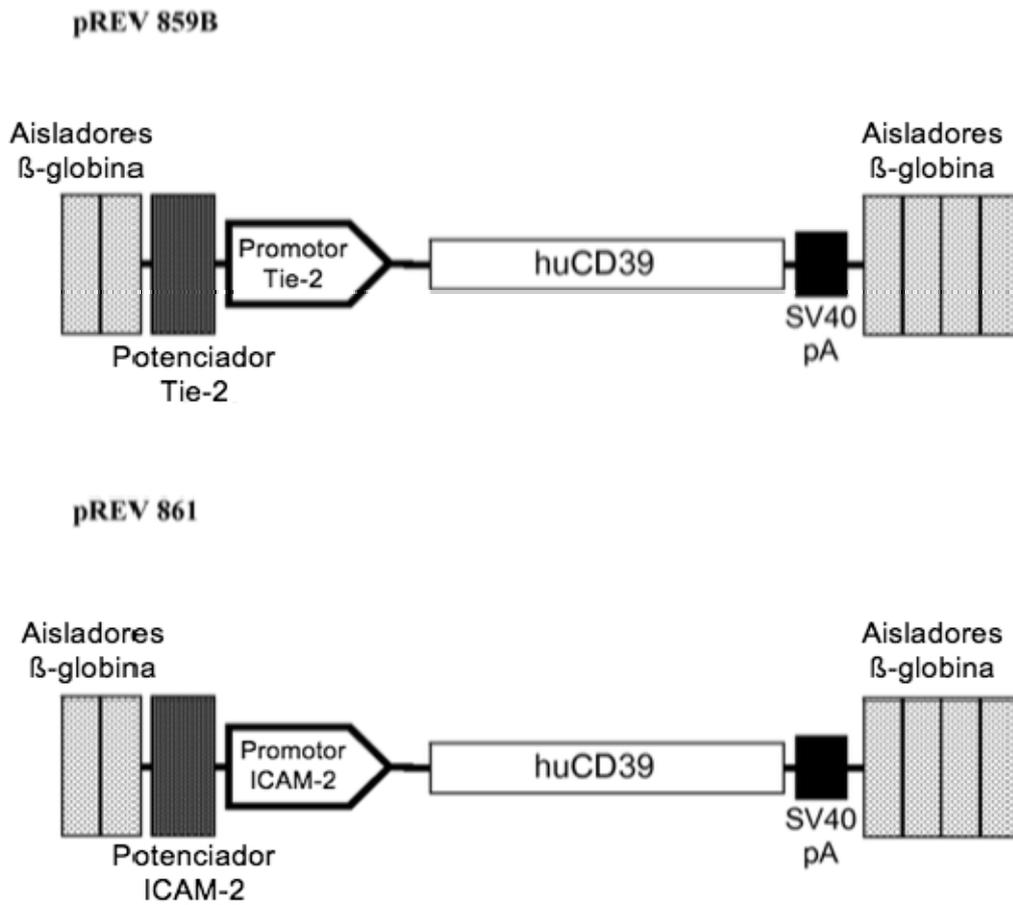
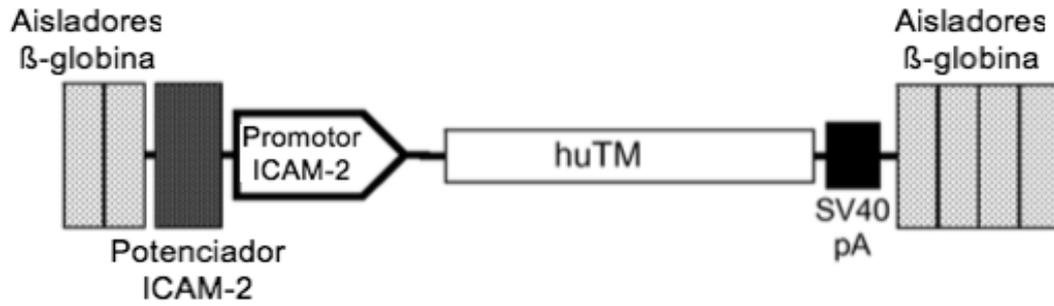


Figura 1b

pREV 871



pREV 872



pREV 873



Figura 2

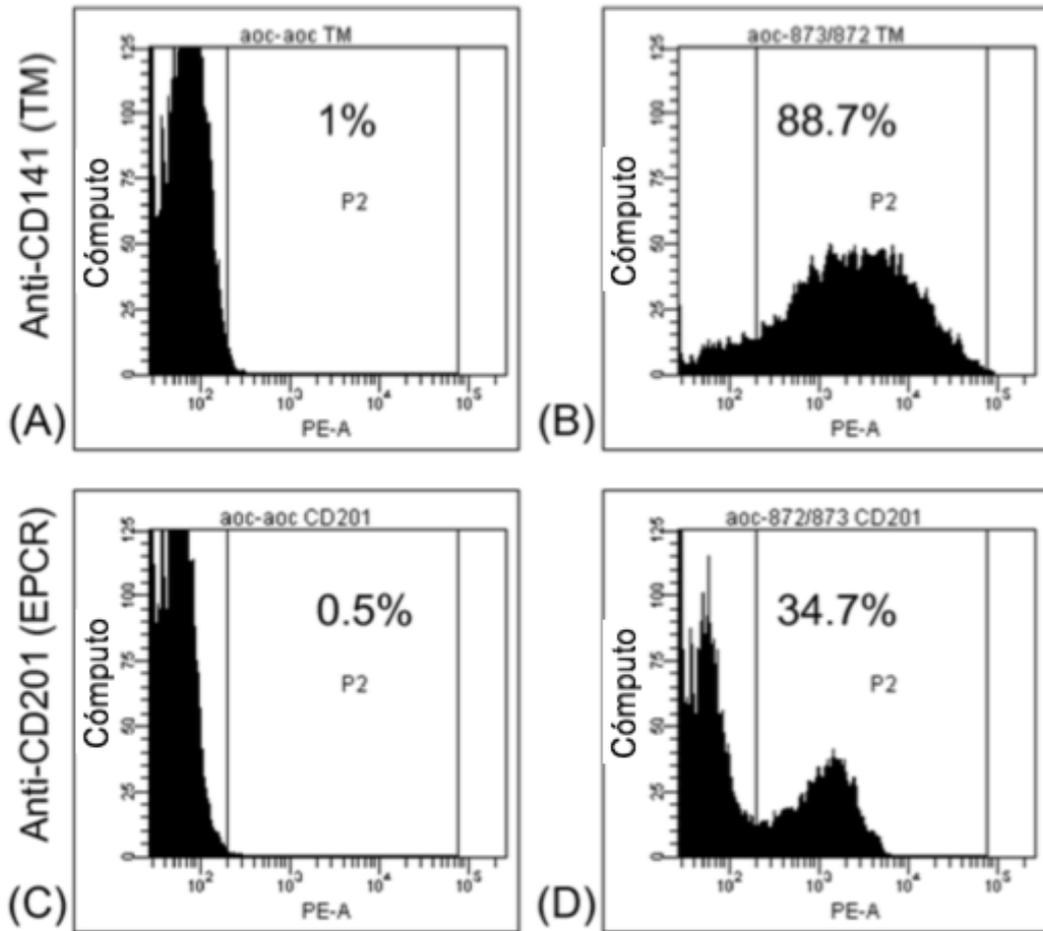
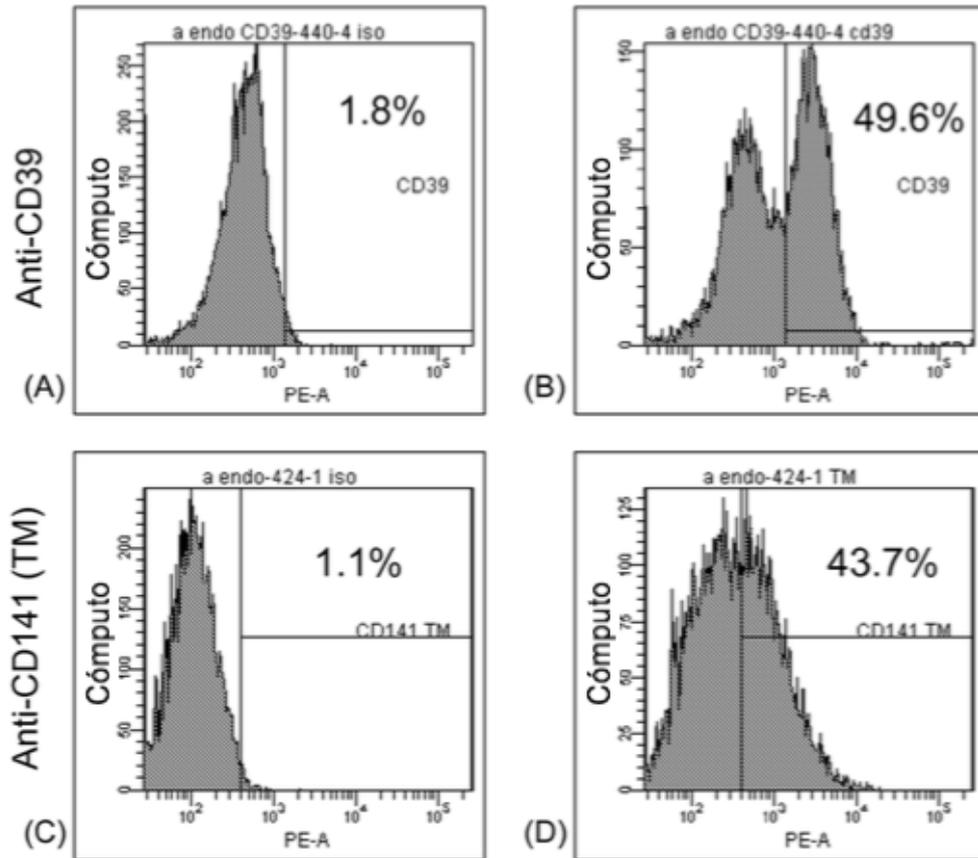


Figura 3



**Figura 4**

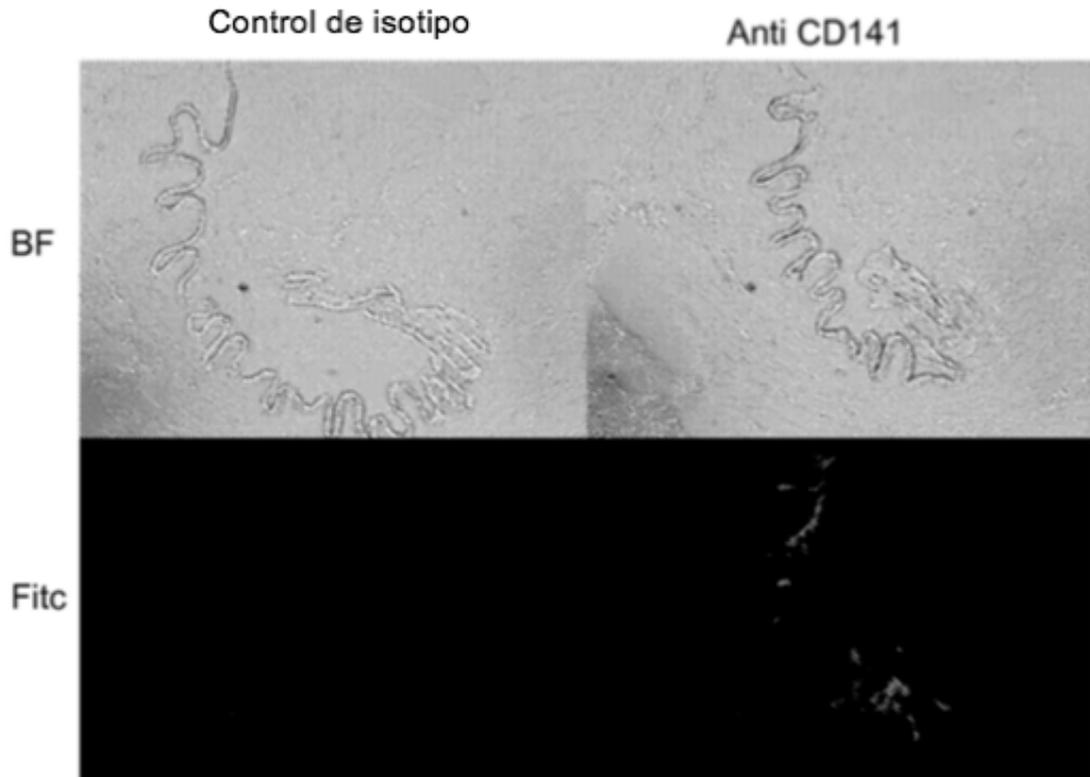


Figura 5

