

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 981 381**

51 Int. Cl.:

A01K 67/02 (2006.01)

A01K 67/027 (2014.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/877 (2010.01)

C12N 15/90 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2016** **PCT/US2016/043467**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.02.2017** **WO17023570**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2016** **E 16833514 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2024** **EP 3331355**

54 Título: **Porcinos resistentes al virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) y células que tienen genes CD163 modificados**

30 Prioridad:

06.08.2015 US 201562202145 P

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

08.10.2024

73 Titular/es:

**THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF
MISSOURI (100.0%)
316 University Hall
Columbia, MO 65211, US**

72 Inventor/es:

**PRATHER, RANDALL, S.;
WELLS, KEVIN, D. y
WHITWORTH, KRISTIN, M.**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 981 381 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

Porcinos resistentes al virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) y células que tienen genes CD163 modificados

Campo de la invención

La presente invención es como se define en las reivindicaciones y se refiere a animales porcinos que comprenden al menos una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD 163 como se especifica en las reivindicaciones. La invención se refiere además a células porcinas que contienen dichas secuencias cromosómicas modificadas. Los animales y las células tienen una resistencia aumentada al virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV, por sus siglas en inglés). Los animales y las crías tienen modificaciones cromosómicas de un gen CD163 de manera que se inhibe la entrada y la replicación del PRRSV y los animales resultantes muestran resistencia a la enfermedad y al síndrome provocado por el virus. En la medida en que en se desvela otra materia objeto en el presente documento, se incluye únicamente con fines de referencia. También se desvelan métodos de reproducción para crear animales resistentes a patógenos y poblaciones de animales creadas usando dichos métodos. También se desvelan métodos para la edición genética de CD163 que implican la inyección directa de embriones y el desarrollo de animales, animales fundadores y estirpes que son resistentes a patógenos tales como el PRRSV.

Antecedentes de la invención

El virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) pertenece a un grupo de arterivirus de mamíferos, que también incluyen el virus elevador de la lactato deshidrogenasa murino, el virus de la fiebre hemorrágica de los simios y el virus de la arteritis equina. Los arterivirus comparten importantes propiedades relacionadas con la patogenia vírica, incluyendo un tropismo por los macrófagos y la capacidad de provocar enfermedades graves e infecciones persistentes. Los síndromes de enfermedades clínicas provocados por la infección con el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) se notificaron por primera vez en los Estados Unidos en 1987 (Keffaber, 1989) y posteriormente en Europa en 1990 (Wensvoort *et al.*, 1991). La infección por PRRSV da como resultado enfermedades respiratorias que incluyen tos y fiebre, fallo reproductivo durante la última etapa de la gestación y reducción del rendimiento de crecimiento. El virus también participa en una diversidad de interacciones con síndromes de enfermedades polimicrobianas mientras mantiene una infección subclínica de por vida (Rowland *et al.*, 2012).

Desde su aparición, el PRRS se ha convertido en la enfermedad más importante de los cerdos comerciales en Norteamérica, Europa y Asia, sólo los continentes de Australia y la Antártida están libres de esta enfermedad. Sólo en Norteamérica se estima que las pérdidas relacionadas con el PRRSV cuestan a los productores 664 millones de dólares cada año (Holtkamp *et al.*, 2013). En 2006, una forma más grave de la enfermedad, conocida como PRRS altamente patógeno (HP-PRRS, por sus siglas en inglés), diezmo las poblaciones de cerdos en toda China. La diversidad genética ha limitado el desarrollo de las vacunas necesarias para controlar y eliminar eficazmente la enfermedad. Aunque la selección genética para obtener resistencia natural podría ser una opción, los resultados hasta la fecha han sido limitados (Boddicker *et al.*, 2014).

Las comparaciones moleculares entre los virus de norteamericanos y europeos sitúan todos los aislados de PRRSV en uno de dos genotipos, el Tipo 2 o el Tipo 1, respectivamente. Aunque los dos genotipos poseen sólo aproximadamente el 70 % de identidad a nivel de nucleótidos (Nelsen *et al.*, 1999), ambos comparten un tropismo por las células positivas para CD163, establecen infecciones a largo plazo y producen signos clínicos similares.

CD163 es una proteína de membrana de tipo 1 de 130 kDa compuesta por nueve dominios ricos en cisteína del receptor eliminador (SRCR) (Fabriek *et al.*, 2005). El CD163 porcino contiene 17 exones que codifican una secuencia señal peptídica seguida de nueve dominios SRCR, dos dominios enlazadores, también conocidos como dominios de prolina serina treonina (PST), ubicados después de SRCR 6 y SRCR 9, y un dominio citoplasmático seguido de una cola citoplasmática corta. La expresión en superficie de CD163 está restringida a células del linaje de monocitos-macrófagos. La proteína se identificó por primera vez en tejidos humanos debido a su capacidad para unirse a complejos de hemoglobina-haptoglobina (HbHp) (Kristiansen *et al.*, 2001). La eliminación de HbHp es una función importante de CD163 y se ubica en SRCR 3 (Madsen *et al.*, 2004). Los metabolitos liberados por los macrófagos después de la degradación de la HbHp incluyen bilirrubina, CO y hierro libre. Una función importante de CD163 es la prevención de la toxicidad oxidativa resultado de la hemoglobina libre (Kristiansen *et al.*, 2001; Soares *et al.*, 2009).

CD163, como receptor para el PRRSV, fue descrito por primera vez por Calvert *et al.* (2007). La transfección de estirpes celulares no permisivas con ADNc de CD163 de una diversidad de especies, incluyendo simios, ser humano, cánidos y ratones puede producir células permisivas para la infección por PRRSV (Calvert *et al.*, 2007). Además de CD163, una segunda proteína receptora, CD169 (también conocida como sialoadhesina o SIGLEC1), se identificó como un receptor primario de PRRSV implicado en la formación de la interacción inicial con el heterodímero de la matriz GP5 (M), la proteína principal en la superficie del virión (Delputte *et al.*, 2002). En este

modelo, la interacción posterior entre CD163 y el heterotrimer GP2, 3, 4 en un compartimento endosómico media el desrecubrimiento y la liberación del genoma vírico en el citoplasma (Van Breedam *et al.*, 2010, Allende *et al.*, 1999). Un modelo previo que describía la infección por PRRSV de macrófagos alveolares identificó SIGLEC1 (CD169) como el receptor vírico primario en la superficie de los macrófagos; sin embargo, el trabajo previo usando cerdos *SIGLEC1*^{-/-} no mostraron diferencias en la replicación de virus en comparación con cerdos de tipo silvestre (Prather *et al.*, 2013). Estos resultados respaldaron los anteriores estudios *in vitro* que muestran que las estirpes celulares resistentes a PRRSV que carecen de CD 169 y CD 163 en la superficie respaldaron la replicación del virus después de la transfección con un plásmido CD163 (Welch *et al.*, 2010).

Muchas características tanto de la patogenia del PRRSV (especialmente a nivel molecular) como de la epizootiología no se conocen bien, lo que dificulta los esfuerzos de control. Actualmente, los productores con frecuencia vacunan a los cerdos contra el PRRSV con cepas vivas atenuadas modificadas o vacunas de virus muertos, sin embargo, las vacunas actuales con frecuencia no proporcionan una protección satisfactoria. Esto se debe tanto a la variación de cepas como a la estimulación inadecuada del sistema inmunitario. Además de las preocupaciones sobre la eficacia de las vacunas contra el PRRSV disponibles, existen pruebas sólidas de que la vacuna viva modificada actualmente en uso puede persistir en cerdos y piaras de cerdos individuales y acumular mutaciones (Mengeling *et al.*, *Am. J. Vet. Res.*, 60(3): 334-340 (1999)), como se ha demostrado con aislamientos de campo virulentos después de la infección experimental de cerdos (Rowland *et al.*, *Virology*, 259:262-266 (1999)). Además, se ha demostrado que el virus de la vacuna se elimina en el semen de los verracos vacunados (Christopher-Hennings *et al.*, *Am. J. Vet. Res.*, 58(1): 40-45 (1997)). Como alternativa a la vacunación, algunos expertos abogan por una estrategia de "ensayo y retirada" en los rebaños reproductores (Dee y Molitor, *Vet. Rec.*, 143:474-476 (1998)). El uso exitoso de esta estrategia depende de la retirada de todos los cerdos que estén infectados de forma aguda o persistente con PRRSV, seguido de controles estrictos para evitar la reintroducción del virus. La dificultad, y gran parte del gasto, asociados a esta estrategia es que se sabe poco sobre la patogenia de la infección por PRRSV persistente y, por lo tanto, no existen técnicas fiables para identificar a los cerdos infectados persistentemente.

Como puede observarse, existe una necesidad en la técnica de desarrollo de estrategias para inducir la resistencia al PRRSV en animales.

Whitworth *et al.*, *Biol of Reprod* 91(3):78, 1-13 (D1) describe el uso del sistema CRISPR/Cas9 para producir cerdos modificados genéticamente a partir de ovocitos y embriones derivados *in vitro*. El documento WO 2015011483 (D2) describe el dominio 5 de CD163 para su uso en composiciones antivíricas contra PRRS y animales transgénicos. El documento WO 2012158828 (D3) describe animales resistentes al virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino.

Randall Prather *et al.*, *Plant & animal genome XXIII conference*, 10-14 de enero, 2015, San Diego (D4) describen la ingeniería genética mediada por CRISPR/Cas9 y cuestiona si CD163 es un mediador de entrada para la infección por PRRSV.

Sumario de la invención

La presente invención es como se define en las reivindicaciones y, en la medida en que se desvele otra materia objeto en el presente documento, se incluye meramente con fines de referencia. Se describen animales no humanos, descendientes de los mismos y células animales que comprenden al menos una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163.

Se desvelan métodos de reproducción para crear animales o linajes que tienen susceptibilidad reducida a la infección por un patógeno. El método comprende modificar genéticamente un ovocito o un espermatozoide para introducir una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD 163 en al menos uno de entre el ovocito y el espermatozoide, y fertilizar el ovocito con el espermatozoide para crear un óvulo fertilizado que contiene la secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163. Como alternativa, el método comprende modificar genéticamente un óvulo fertilizado para introducir una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163 en el óvulo fertilizado. El método comprende además transferir el óvulo fertilizado a un animal hembra sustituto, en donde la gestación y el parto a término producen un animal de progenie, cribar el animal de progenie para determinar la susceptibilidad al patógeno, y seleccionar animales de progenie que tengan una susceptibilidad reducida al patógeno en comparación con animales que no comprenden una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163.

También se desvelan poblaciones de animales obtenidas mediante métodos de reproducción.

Se describe además un método de aumento de la resistencia de un animal de ganado a la infección con un patógeno. El método comprende editar genéticamente al menos una secuencia cromosómica de un gen que codifica una proteína CD 163 de manera que se reduzca la producción o actividad de la proteína CD 163, en comparación con la producción o actividad de la proteína CD63 en un animal de ganado que no comprende una secuencia cromosómica editada en un gen que codifica una proteína CD 163.

En el contexto de la presente invención, las modificaciones de la secuencia cromosómica en un gen que codifica una proteína CD163 son como se especifican en las reivindicaciones. Específicamente, la secuencia cromosómica

modificada comprende una modificación seleccionada del grupo que consiste en:

- 5 una inserción de 2 pares de bases entre los nucleótidos 3.149 y 3.150 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, con una supresión de 377 pares de bases del nucleótido 2.573 al nucleótido 2.949 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el mismo alelo;
- una supresión de 1506 pares de bases del nucleótido 1.525 al nucleótido 3.030 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47;
- 10 una inserción de 7 pares de bases entre el nucleótido 3.148 y el nucleótido 3.149 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47;
- una supresión de 1280 pares de bases del nucleótido 2.818 al nucleótido 4.097 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47;
- 15 una supresión de 1373 pares de bases del nucleótido 2.724 al nucleótido 4.096 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47;
- 20 una supresión de 1467 pares de bases del nucleótido 2.431 al nucleótido 3.897 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47;
- una supresión de 28 pares de bases del nucleótido 3.145 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47;
- 25 una supresión de 1387 pares de bases del nucleótido 3.145 al nucleótido 4.531 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47;
- una supresión de 1382 pares de bases del nucleótido 3.113 al nucleótido 4.494 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 11 pares de bases que comienza en el nucleótido 3.113;
- 30 una supresión de 452 pares de bases del nucleótido 2.440 al nucleótido 4.160 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; y
- 35 una supresión de 452 pares de bases del nucleótido 3.015 al nucleótido 3.466 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47.

En la medida en que se desvelen otras modificaciones en el presente documento, éstas se incluyen únicamente con fines de referencia.

- 40 Las modificaciones a la secuencia cromosómica en un gen que codifica una proteína CD163 proporcionada en el presente documento pueden reducir la susceptibilidad de un animal, descendencia, célula o población (por ejemplo, un animal, descendencia, célula o población porcina) a un agente patógeno (por ejemplo, un virus tal como el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV)).

- 45 En cualquiera de los animales, descendencia, células, poblaciones y métodos desvelados en el presente documento, la secuencia cromosómica modificada puede dar como resultado la producción sustancialmente nula de proteína CD163 funcional por parte del animal, descendencia, célula o población.

- 50 En cualquiera de los animales, descendencia, células, poblaciones y métodos desvelados en el presente documento, la secuencia cromosómica modificada puede comprender una supresión en fase en el gen que codifica la proteína CD 163.

- 55 En cualquiera de los animales porcinos, descendencia, células, poblaciones y métodos divulgados en el presente documento, la secuencia cromosómica modificada puede comprender la SEQ ID NO: 118. Como alternativa, la modificación de la secuencia cromosómica en el gen que codifica una proteína CD163 puede comprender: una supresión de 11 pares de bases del nucleótido 3.137 al nucleótido 3.147 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una inserción de 2 pares de bases entre los nucleótidos 3.149 y 3.150 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, con una supresión de 377 pares de bases del nucleótido 2.573 al nucleótido 2.949 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el mismo alelo; una supresión de 124 pares de bases del nucleótido 3.024 al nucleótido 3.147 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 123 pares de bases del nucleótido 3.024 al nucleótido 3.146 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una inserción de 1 par de bases entre los nucleótidos 3.147 y 3.148 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 130 pares de bases del nucleótido 3.030 al nucleótido 3.159 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 132 pares de bases del nucleótido 3.030 al nucleótido 3.161 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO:
- 60
- 65

47; una supresión de 1506 pares de bases del nucleótido 1.525 al nucleótido 3.030 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una inserción de 7 pares de bases entre el nucleótido 3.148 y el nucleótido 3.149 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1280 pares de bases del nucleótido 2.818 al nucleótido 4.097 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1373 pares de bases del nucleótido 2.724 al nucleótido 4.096 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1467 pares de bases del nucleótido 2.431 al nucleótido 3.897 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1930 pares de bases del nucleótido 488 al nucleótido 2.417 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 12 pares de bases que comienza en el nucleótido 488, y en donde hay una supresión adicional de 129 pares de bases en el exón 7 del nucleótido 3.044 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 28 pares de bases del nucleótido 3.145 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1387 pares de bases del nucleótido 3.145 al nucleótido 4.531 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1382 pares de bases del nucleótido 3.113 al nucleótido 4.494 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 11 pares de bases que comienza en el nucleótido 3.113; una supresión de 1720 pares de bases del nucleótido 2.440 al nucleótido 4.160 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 452 pares de bases del nucleótido 3.015 al nucleótido 3.466 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; o cualquier combinación de las mismas.

Se desvelan ácidos nucleicos. Las moléculas de ácido nucleico comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 47; (b) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 47, en donde dicha secuencia de nucleótidos contiene al menos una sustitución, inserción o supresión con respecto a la SEQ ID NO: 47; y (c) una secuencia de ADNc de (a) o (b).

Por ejemplo, la molécula de ácido nucleico puede comprender: (a) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 87,5 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 47, en donde dicha secuencia de nucleótidos contiene al menos una sustitución, inserción o supresión con respecto a la SEQ ID NO: 47; o (b) una secuencia de ADNc de (a).

También se desvelan ácidos nucleicos adicionales. El ácido nucleico puede comprender la SEQ ID NO: 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 118 o 119.

Cualquiera de las moléculas de ácido nucleico puede ser moléculas de ácido nucleico aisladas.

Otros objetos y características serán en parte evidentes y en parte se señalarán en lo sucesivo en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1. Vectores de direccionamiento y CRISPR utilizados para modificar CD163. El panel A representa los exones 7, 8 y 9 de tipo silvestre del gen CD 163 que fue diana para la modificación usando CRISPR. El panel B muestra el vector de direccionamiento diseñado para reemplazar el exón 7 de cerdo (dominio de cerdo SRCR5 de CD163) con ADN que codifica SRCR8 humano de CD163L. Este vector de direccionamiento se usó en transfecciones con selección de fármaco por G418. Los cebadores de PCR para el ensayo de largo alcance, brazo izquierdo y brazo derecho están marcados con flechas para 1230, 3752, 8791, 7765 y 7775. El panel C representa un vector de direccionamiento idéntico al que se muestra en el panel B, pero en donde el casete *Neo* se retiró. Este vector de direccionamiento se usó para dirigirse a CD 163 en células que ya eran resistentes a la neomicina. Los cebadores utilizados en ensayos de supresiones pequeñas se ilustran con flechas y se rotulan GCD163D y GCD163I. El panel D enfatiza los exones a los que se dirigen los CRISPR. La ubicación de los CRISPR 10, 131, 256 y 282 se representa por las flechas orientadas hacia abajo en el exón 7. Los números de CRISPR representan el número de pares de bases de la unión intrón-exón del intrón 6 y el exón 7.

FIG. 2. Vector de direccionamiento y CRISPR utilizados para modificar CD1D. El panel A representa los exones 3, 4, 5, 6 y 7 de tipo silvestre del gen CD1D que fue diana para la modificación mediante CRISPR. El panel B muestra el vector de direccionamiento diseñado para reemplazar el exón 3 con el marcador seleccionable *Neo*. Este vector de direccionamiento se usó en combinación con CRISPR para modificar CD1D. Los cebadores de PCR para el ensayo de largo alcance, brazo izquierdo y brazo derecho están marcados con flechas para 3991, 4363, 7373 y 12806. El panel C representa los exones a los que se dirigen los CRISPR. Las ubicaciones de los CRISPR 4800, 5350, 5620 y 5626 se representan por las flechas orientadas hacia abajo en el exón 3. Los cebadores utilizados en ensayos de supresiones pequeñas se ilustran con flechas y se rotulan GCD1DD y GCD1DI.

FIG. 3. Generación de cerdos con inactivación de CD163 y CD1D mediante CRISPR/Cas9 y TNCS. A) Supresión dirigida de CD163 en células somáticas después de la transfección con CRISPR/Cas9 y ADN donante. Un

genotipo de tipo silvestre (TS) da como resultado una banda de 6545 pares de bases (pb). Las calles 1 a 6 representan seis colonias diferentes de una única transfección con CRISPR 10 con Cas9 y ADN donante que contiene Neo. Las calles 1, 4 y 5 muestran una gran supresión homocigótica de 1500-2000 pb. La calle 2 representa una supresión homocigótica más pequeña. Las calles 3 y 6 representan un alelo de TS y una supresión pequeña o una modificación bialélica de ambos alelos. Las modificaciones exactas de cada colonia sólo se determinaron mediante secuenciación para colonias utilizadas para TNCS. La banda de TS débil en algunas de las calles puede representar contaminación cruzada de fibroblastos fetales de una colonia de TS vecina. SCM = sin control de molde. B) Supresión dirigida de CD1D en células somáticas después de la transfección con CRISPR/Cas9 y ADN donante. Un genotipo de TS da como resultado una banda de 8729 pb. Las calles 1-4 representan colonias con una supresión de 500-2000 pb de CD1D. La calle 4 parece ser una colonia de TS. SCM = sin control de molde. C) Imagen de un cerdo con inactivación de CD163 producido mediante TNCS durante el estudio. Este lechón macho contiene una supresión de 1506 pb homocigótica de CD163. D) Imagen de cerdos CD1D producidos durante el estudio. Estos lechones contienen una supresión de 1653 pb de CD1D. E) Genotipo de dos camadas de TNCS que contenían la supresión de 1506 pb de CD163. Las calles 1-3 (camada 63) y las calles 1-4 (camada 64) representan el genotipo de cada lechón de cada camada. Cerda indica la hembra receptora de los embriones de TNCS y TS representa un control de TS. SCM = sin control de molde. F) Genotipo de dos camadas de TNCS que contenían la supresión de 1653 pb de CD1D. Las calles 1-7 (camada 158) y las calles 1-4 (camada 159) representan el genotipo de cada lechón.

FIG. 4. Efecto del sistema CRISPR/Cas9 en embriones porcinos. A) Frecuencia de formación de blastocistos después de la inyección de concentraciones diferentes del sistema CRISPR/Cas9 en cigotos. La toxicidad del sistema CRISPR/Cas9 fue más baja con 10 ng/μl. B) El sistema CRISPR/Cas9 puede alterar satisfactoriamente la expresión de eGFP en blastocistos cuando se introduce en cigotos. Aumento original X4. C) Tipos de mutaciones en eGFP generadas usando el sistema CRISPR/Cas9: genotipo de TS (SEQ ID NO: 16), N.º 1 (SEQ ID NO: 17), N.º 2 (SEQ ID NO: 18) y N.º 3 (SEQ ID NO: 19).

FIG. 5. Efecto del sistema CRISPR/Cas9 en el direccionamiento a CD163 en embriones porcinos. A) Ejemplos de mutaciones generadas en CD163 por el sistema CRISPR/Cas9: genotipo de TS (SEQ ID NO: 20), N.º 1-1 (SEQ ID NO: 21), N.º 1-4 (SEQ ID NO: 22) y N.º 2-2 (SEQ ID NO: 23). Todos los embriones examinados mediante secuenciación de ADN mostraron mutación en el CD163 (18/18). CRISPR 131 está resaltado en negrita. B) Lectura de secuenciación de una supresión homocigótica provocada por el sistema CRISPR/Cas9. La imagen representa N.º 1-4 del panel A que llevan una supresión de 2 pb de CD163.

FIG. 6. Efecto del sistema CRISPR/Cas9 cuando se introduce con dos tipos de CRISPR. A) Amplificación por PCR de CD163 en blastocistos inyectados con CRISPR/Cas9 como cigotos. Las calles 1, 3, 6 y 12 muestran la supresión diseñada entre dos CRISPR diferentes. B) Amplificación por PCR de CD1D en blastocistos inyectados con CRISPR/Cas9 como cigotos. CD1D tuvo una frecuencia de supresión más baja determinada mediante electroforesis en gel en comparación con CD163 (3/23); las calles 1, 8 y 15 muestran supresiones obvias en CD1D. C) El sistema CRISPR/Cas9 se dirigió satisfactoriamente a dos genes cuando se le proporcionaron dos CRISPR dirigidos a CD163 y eGFP. Se muestran las modificaciones de CD163 y eGFP: CD163 de TS (SEQ ID NO: 24), CD163 N.º 1 (SEQ ID NO: 25), CD163 N.º 2 (SEQ ID NO: 26), CD163 N.º 3 (SEQ ID NO: 27), eGFP de TS (SEQ ID NO: 28), eGFP N.º 1-1 (SEQ ID NO: 29), eGFP N.º 1-2 (SEQ ID NO: 30), eGFP N.º 2 (SEQ ID NO: 31) y eGFP N.º 3 (SEQ ID NO: 32).

FIG. 7. Cerdos con inactivación de CD163 generados mediante el sistema CRISPR/Cas9 inyectado en cigotos. A) Amplificación por PCR de CD163 de los cerdos nuligénicos; se detectó un signo claro de supresión en las camadas 67-2 y 67-4. B) Imagen de cerdos con inactivación de CD163 con un sustituto. Todos los animales están sanos y no muestran signos de anomalías. C) Genotipo de cerdos con inactivación de CD163. La secuencia de tipo silvestre (TS) se muestra como la SEQ ID NO: 33. Dos animales (de las camadas 67-1 (SEQ ID NO: 34) y 67-3 (SEQ ID NO: 37)) llevan una supresión o inserción homocigótica en CD163. Los otros dos animales (de las camadas 67-2 y 67-4) llevan una modificación bialélica de CD163: N.º 67-2 A1 (SEQ ID NO: 35), N.º 67-2 A2 (SEQ ID NO: 36), N.º 67-4 A1 (SEQ ID NO: 38) y N.º 67-4 a2 (SEQ ID NO: 39). La supresión se debió a la introducción de dos CRISPR diferentes con el sistema Cas9. Ningún animal de la inyección en el cigoto para CD163 mostró un genotipo en mosaico.

FIG. 8. Cerdos con inactivación de CD1D generados mediante el sistema CRISPR/Cas9 inyectado en cigotos. A) Amplificación por PCR de CD1D de cerdos nuligénicos; 166-1 muestra un genotipo en mosaico para CD1D. 166-2, 166-3 y 166-4 no muestran un cambio en el tamaño para el amplicón, pero la secuenciación del amplicón reveló modificaciones. FF de TS = fibroblastos fetales de tipo silvestre. B) La amplificación por PCR del ensayo de largo alcance mostró una clara supresión de un alelo en los lechones 166-1 y 166-2. C) Imagen de cerdos con inactivación de CD1D con sustituto. D) Datos de secuencia de cerdos con inactivación de CD1D; TS (SEQ ID NO: 40), N.º 166-1.1 (SEQ ID NO: 41), N.º 166-1.2 (SEQ ID NO: 42), N.º 166-2 (SEQ ID NO: 43), N.º 166-3.1 (SEQ ID NO: 44), N.º 166-3.2 (SEQ ID NO: 45) y N.º 166-4 (SEQ ID NO: 46). El codón de inicio atg en el exón 3 se muestra en negrita y también en minúsculas.

FIG. 9. Signos clínicos durante la infección aguda por PRRSV. Resultados de la valoración diaria para determinar

la presencia de signos respiratorios y fiebre para CD 163 +/- (n = 6) y CD 163 -/ (n = 3).

FIG. 10. Histopatología pulmonar durante la infección aguda por PRRSV. Fotomicrografías representativas de tejidos teñidos con H y E de cerdos de tipo silvestre y nuligénicos. El panel izquierdo muestra edema e infiltración de células mononucleares. El panel derecho de un cerdo nuligénico muestra la arquitectura pulmonar de un pulmón normal.

FIG. 11. Viremia en los diversos genotipos. Nótese que los datos de los lechones CD163-/- se encuentran a lo largo del eje X.

FIG. 12. Producción de anticuerpos en cerdos con alelos nulos, de tipo silvestre y sin caracterizar.

FIG. 13. Expresión en la superficie celular de CD163 en cerdos individuales. Las líneas que aparecen hacia la derecha en los paneles de A sin caracterizar, B sin caracterizar y CD163 +/- representan el anticuerpo CD163, mientras que las líneas que aparecen hacia los lados izquierdos de estos paneles son los controles sin anticuerpo (fondo). Nótese que en los animales CD163-/-, la tinción de CD163 se superpone con el control de fondo, y que la tinción de CD163 en los alelos sin caracterizar está aproximadamente a medio camino entre el nivel de TS y el fondo (nótese también que esta es una escala logarítmica, por lo tanto, inferior al ~10 %).

FIG. 14. Nivel de CD 169 en macrófagos alveolares de tres cerdos representativos y el control sin anticuerpos (anti-CD169 marcado con FITC).

FIG. 15. Viremia en los diversos genotipos. Nótese que los datos de los lechones de aminoácidos $\Delta 43$ se encuentran a lo largo del eje X.

FIG. 16. Secuencia genómica de los exones 7-10 de CD163 de tipo silvestre utilizada como secuencia de referencia (SEQ ID NO: 47). La secuencia incluye 3000 pb xxxxx en dirección 5' del exón 7 a la última base del exón 10. Las regiones subrayadas muestran las ubicaciones de los exones 7, 8, 9 y 10, respectivamente.

FIG. 17. Diagrama de modificaciones del gen CD163 que ilustran varias modificaciones del gen CD163, el producto proteico predicho para cada modificación y la expresión de macrófagos relativa para cada modificación, medidos mediante el nivel de CD163 de la superficie en macrófagos alveolares porcinos (PAM). Las regiones de color negro indican intrones y las regiones de color blanco indican exones. La región sombreada indica el mimético del exón 11 de *hCD163L1*, el homólogo del exón 7 porcino. La región de color gris indica el intrón sintetizado con la construcción Neo de PGK.

FIG. 18. Diagrama de la proteína y la secuencia génica de CD163 porcino. A) Dominios SRCR (óvalos) y PST (cuadrados) de la proteína CD163 junto con los exones del gen correspondiente. B) Comparación del SRCR 5 de CD163 porcino (SEQ ID NO: 120) con el homólogo SRCR 8 de CD163L1 (SEQ ID NO: 121) humano.

FIG. 19. Resultados representativos de la expresión en la superficie de CD 163 y CD 169 en PAM de cerdos de tipo silvestre y con CD163 modificado. Los paneles A-E muestran los resultados de las modificaciones del gen CD163 ilustradas en la Fig. 17. Los datos combinados para d7(1467) y d7(1280) se muestran en el panel D.

FIG. 20. Niveles de haptoglobina sérica en cerdos de tipo silvestre y con CD163 modificado.

FIG. 21. Permisividad relativa de PAM de tipo silvestre y *HL11m* a la infección con aislados de PRRSV de Tipo 2.

FIG. 22. Infección de cerdos modificados con CD163 con aislados de PRRSV de Tipo 1 y de Tipo 2.

FIG. 23. Carga vírica para cerdos de TS y con CD163 modificado infectados con virus de Tipo 2.

Descripción detallada de la invención

La presente invención es como se define en las reivindicaciones y, en la medida en que se desvele otra materia objeto en el presente documento, se incluye meramente con fines de referencia. En el presente documento se describen animales y métodos para producir animales editados génicamente que tienen modificaciones del gen CD163 y que son resistentes a PRRSV y otras infecciones por virus respiratorios relacionados. Los animales tienen modificaciones cromosómicas (inserciones o supresiones) que inactivan o modulan de otro modo la actividad del gen CD163. CD163 es necesario para la entrada del PRRSV en la célula y para la replicación del virus. Por lo tanto, los animales con CD163 nulo muestran resistencia a la infección por PRRSV cuando se exponen al mismo. Estos animales se pueden crear usando cualquiera de varios protocolos que hacen uso de la edición génica.

En el presente documento también se describen métodos para producir un animal porcino que comprenden introducir en una célula animal porcina o un embrión porcino un agente que se une específicamente a un sitio diana cromosómico de la célula y provoca una rotura del ADN bicatenario o de otro modo inactiva o reduce la actividad de

un gen CD163 o proteína en el mismo usando métodos de edición génica tales como el sistema de Repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente interesparadas (CRISPR)/Cas, Nucleasas efectoras similares a activadores de la transcripción (TALEN), Nucleasas de dedos de cinc (ZFN), proteínas de fusión recombinasas o meganucleasas.

En el presente documento también se describe el uso de uno o más locus de CD163 particulares junto con un polipéptido capaz de efectuar la escisión y/o integración de secuencias de ácido nucleico específicas dentro de los locus de CD163. Los ejemplos del uso de locus de CD 163 en conjunto con un polipéptido o ARN capaz de efectuar la escisión y/o integración de los locus de CD 163 incluyen un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en proteínas de dedos de cinc, meganucleasas, dominios TAL, TALEN, recombinasas CRISPR/Cas guiadas por ARN, cremalleras de leucina, y otras conocidas por los expertos en la materia. Los ejemplos particulares incluyen una proteína quimérica ("fusión") que comprende un polipéptido de dominio de unión a ADN específico de sitio y un polipéptido de dominio de escisión (por ejemplo, una nucleasa), tal como una proteína ZFN que comprende un polipéptido de dedos de cinc y un polipéptido de nucleasa FokI. En el presente documento se describen polipéptidos que comprenden un dominio de unión a ADN que se une específicamente a un gen CD163. Un polipéptido de este tipo también puede comprender un dominio o semi-dominio de nucleasa (escisión) (por ejemplo, una endonucleasa de asentamiento, incluyendo una endonucleasa de asentamiento con un dominio de unión a ADN modificado) y/o un dominio de ligasa, de manera que el polipéptido pueda inducir una rotura bicatenaria diana y/o facilitar la recombinación de un ácido nucleico de interés en el sitio de la rotura. Un dominio de unión a ADN que se dirige a un locus de CD163 puede ser un dominio funcional de escisión de ADN. Los polipéptidos anteriores se pueden usar para introducir un ácido nucleico exógeno en el genoma de un organismo hospedador (por ejemplo, una especie animal) en uno o más locus de CD163. Los dominios de unión a ADN pueden comprender una proteína de dedos de cinc con uno o más dedos de cinc (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más dedos de cinc), que se modifica por ingeniería genética (no se produce de forma natural) para unirse a cualquier secuencia dentro de un gen CD 163. Cualquiera de las proteínas de dedos de cinc descritas en el presente documento puede unirse a un sitio diana dentro de la secuencia codificante del gen diana o dentro de secuencias adyacentes (por ejemplo, promotor u otros elementos de expresión). La proteína de dedos de cinc puede unirse a un sitio diana en un gen CD163.

Definiciones

Las unidades, los prefijos y los símbolos se pueden indicar en su forma aceptada del SI. A menos que se indique otra cosa, los ácidos nucleicos se escriben de izquierda a derecha en orientación de 5' a 3' y las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en orientación de amino a carboxi. Los intervalos numéricos citados dentro de la memoria descriptiva incluyen los números que definen el intervalo e incluyen cada número entero dentro del intervalo definido. Los aminoácidos se pueden mencionar en el presente documento bien por sus símbolos habitualmente conocidos de tres letras o bien mediante los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. Los nucleótidos, de forma análoga, se pueden denominar por sus códigos de una letra habitualmente aceptados. A menos que se proporcione otra cosa, los términos de software, electricidad y electrónica como se usan en el presente documento son los definidos en The New IEEE Standard Dictionary of Electrical and Electronics Terms (5.^a edición, 1993). Los términos que se definen a continuación se definen más detalladamente por referencia a la memoria descriptiva en su conjunto.

Como entenderá el experto en la materia, para todos y cada uno de los fines, particularmente en términos de proporcionar una descripción escrita, todos los intervalos citados en el presente documento abarcan también todos y cada uno de los posibles subintervalos y combinaciones de subintervalos de los mismos, así como los valores individuales que componen el intervalo, particularmente los valores enteros. Un intervalo citado incluye cada valor, número entero, decimal o identidad específico dentro del intervalo. Cualquier intervalo enumerado se puede reconocer fácilmente como lo suficientemente descriptivo y permite que el mismo intervalo se divida en al menos mitades, tercios, cuartos, quintos o décimos iguales. Como ejemplo no limitante, cada intervalo analizado en el presente documento se puede dividir fácilmente en un tercio inferior, tercio medio y tercio superior, etc.

Cuando se introducen elementos de la presente invención o de la realización o realizaciones preferidas de la misma, los artículos "un", "uno/a", "el/la" y "dicho/a" pretenden significar que hay uno o más de los elementos. Las expresiones "que comprende/n", "que incluye/n" y "que tiene/n" pretenden ser incluyentes y hacen referencia a que puede haber elementos adicionales además de los elementos enumerados.

La expresión "y/o" significa uno cualquiera de los elementos, cualquier combinación de los elementos o todos los elementos a los que se asocia este término. El experto en la materia entiende fácilmente la expresión "uno o más", particularmente cuando se lee en el contexto de su uso.

Una "proteína de unión" es una proteína que es capaz de unirse a otra molécula. Una proteína de unión puede unirse a, por ejemplo, una molécula de ADN (una proteína de unión a ADN), una molécula de ARN (una proteína de unión a ARN) y/o una molécula de proteína (una proteína de unión a proteína). En el caso de una proteína de unión a proteína, esta se puede unir consigo misma (para formar homodímeros, homotrímeros, etc.) y/o se puede unir a una o más moléculas de una proteína o proteínas diferentes. Una proteína de unión puede tener más de un tipo de actividad de unión. Por ejemplo, las proteínas de dedos de cinc tienen actividad de unión a ADN, de unión a ARN y

de unión a proteína.

La expresión "variantes modificadas conservadoramente" se aplica a secuencias tanto de aminoácidos como de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, "variantes modificadas conservadoramente" se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican variantes idénticas o modificadas conservadoramente de las secuencias de aminoácidos. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican, todos ellos, el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición donde una alanina se especifica mediante un codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones descritos correspondientes sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas" y representan una especie de variación modificada conservadoramente. Cada secuencia de ácido nucleico del presente documento que codifica un polipéptido también, por referencia al código genético, describe todas las posibles variaciones silenciosas del ácido nucleico.

Un experto habitual reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es habitualmente el único codón para metionina; y UGG, que es habitualmente el único codón para triptófano) se puede modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica. En consecuencia, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente invención está implícita en cada secuencia polipeptídica descrita y está dentro del alcance de la presente invención.

En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que las sustituciones, supresiones o adiciones individuales a un ácido nucleico, péptido, polipéptido o secuencia de proteínas que altera, añade o elimina un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada conservadoramente", donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Por lo tanto, por ejemplo, de esta manera se puede alterar cualquier número de restos de aminoácidos seleccionados del grupo de números enteros que consiste en 1 a 15. Por lo tanto, por ejemplo, se pueden realizar 1, 2, 3, 4, 5, 7 o 10 modificaciones.

Las variantes modificadas conservadoramente normalmente proporcionan una actividad biológica similar a la secuencia polipeptídica no modificada de la que derivan. Por ejemplo, la especificidad de sustrato, la actividad enzimática o la unión ligando/receptor es generalmente de al menos un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 % de la proteína nativa para su sustrato nativo. Las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica.

Los seis grupos siguientes contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí: [1] Alanina (A), Serina (S), Treonina (T); [2] Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); [3] Asparagina (N), Glutamina (Q); [4] Arginina (R), Lisina (K); [5] Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y [6] Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W). Véase también, Creighton (1984) *Proteins* W. H. Freeman and Company.

El término "CRISPR" significa "grupos de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares". El término "Cas9" se refiere a la "proteína 9 asociada a CRISPR". Las expresiones "CRISPR/Cas9" o "sistema CRISPR/Cas9" se refieren a un sistema de nucleasa programable para ingeniería genética que incluye una proteína Cas9, o derivado de la misma, y uno o más ARN no codificantes que pueden proporcionar la función de un ARN de CRISPR (ARNcr) y ARN transactivador (ARNtracr) para la Cas9. El ARNcr y el ARNtracr se pueden usar individualmente o se pueden combinar para producir un "ARN guía" (ARNg). El ARNcr o el ARNg proporcionan una secuencia complementaria a la diana genómica. Los sistemas CRISPR/Cas9 se describen con más detalle a continuación en el presente documento.

Las referencias en el presente documento a una supresión en una secuencia de nucleótidos del nucleótido x al nucleótido y significan que todos los nucleótidos en el intervalo se han suprimido, incluyendo x e y. Por lo tanto, por ejemplo, la expresión "una supresión de 11 pares de bases del nucleótido 3.137 al nucleótido 3.147 en comparación con la SEQ ID NO: 47" significa que cada uno de los nucleótidos 3.317 a 3.147 se ha suprimido, incluyendo los nucleótidos 3.317 y 3.147.

La "resistencia a enfermedades" es una característica de un animal, en donde el animal evita los síntomas de la enfermedad que son el resultado de interacciones animal-patógeno, tales como las interacciones entre un animal porcino y el PRRSV. Es decir, se evita que los patógenos provoquen enfermedades animales y los síntomas de enfermedades asociadas, o como alternativa, una reducción de la incidencia y/o gravedad de los signos clínicos o una reducción de los síntomas clínicos. Un experto en la materia apreciará que las composiciones y métodos desvelados en el presente documento se pueden usar con otras composiciones y métodos disponibles en la técnica para proteger a los animales del ataque de patógenos.

Por "codificante" o "codificado", con respecto a un ácido nucleico específico, se entiende que comprende la información para la traducción a la proteína especificada. Un ácido nucleico que codifica una proteína puede comprender secuencias intermedias (por ejemplo, intrones) dentro de las regiones traducidas del ácido nucleico, o puede carecer de dichas secuencias intermedias no traducidas (por ejemplo, como en el ADNc). La información

mediante la que se codifica una proteína se especifica mediante el uso de codones. Normalmente, la secuencia de aminoácidos está codificada por el ácido nucleico usando el código genético "universal". Cuando el ácido nucleico se prepara o altera sintéticamente, se pueden aprovechar las preferencias de codones conocidas del hospedador previsto donde se ha de expresar el ácido nucleico.

Como se usan en el presente documento, "edición génica", "editado génicamente", "editado genéticamente" y "efectores de edición génica" se refieren al uso de tecnología de asentamiento con nucleasas de origen natural o modificadas artificialmente, también denominadas "tijeras moleculares", "endonucleasas de asentamiento", o "endonucleasas de direccionamiento". Las nucleasas crean roturas cromosómicas bicatenarias (DSB, por sus siglas en inglés) específicas en ubicaciones deseadas en el genoma, que en algunos casos aprovechan los mecanismos endógenos de la célula para reparar la rotura inducida por procesos naturales de recombinación homóloga (RH) y/o unión de extremos no homólogos (UENH). Los efectores de edición génica incluyen Nucleasas de dedos de cinc (ZFN), Nucleasas efectoras similares a activadores de la transcripción (TALEN), el sistema de Grupos de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares/CAS9 (CRISPR/Cas9) y meganucleasas (por ejemplo, meganucleasas remodeladas por ingeniería genéticamente como endonucleasas de asentamiento). Los términos también incluyen el uso de procedimientos y técnicas transgénicos, incluyendo, por ejemplo, donde el cambio es una supresión o inserción relativamente pequeña (normalmente menos de 20 nt) y/o no introduce ADN de una especie extraña. El término también abarca animales de progenie, tales como aquellos creados mediante cruces sexuales o propagación asexual a partir del animal editado génico inicial.

Como se usa en el presente documento, "heterólogo", en referencia a un ácido nucleico, es un ácido nucleico que se origina a partir de una especie extraña, o, si es de la misma especie, está sustancialmente modificado con respecto a su forma nativa en cuanto a su composición y/o locus genómico mediante intervención humana deliberada. Por ejemplo, un promotor unido operativamente a un gen estructural heterólogo es de una especie diferente de aquella de la que derivó el gen estructural, o, si es de la misma especie, uno o ambos está sustancialmente modificados con respecto a su forma original. Una proteína heteróloga se puede originar a partir de una especie extraña o, si es de la misma especie, está sustancialmente modificada con respecto a su forma original mediante intervención humana deliberada.

Como se usan en el presente documento, "tecnología de ADN de asentamiento", "tecnología de asentamiento" y "endonucleasa de asentamiento" cubren cualesquier mecanismos que permitan que una molécula específica se dirija a una secuencia de ADN específica, incluyendo Proteínas de dedos de cinc (ZF), Meganucleasas efectoras similares a activadores de transcripción (TALE) y el sistema CRISPR/Cas9.

Las expresiones "resistencia aumentada" y "susceptibilidad reducida" en el presente documento significan, pero sin limitación, una reducción estadísticamente significativa de la incidencia y/o gravedad de los signos clínicos o síntomas clínicos que se asocian a la infección por patógeno. Por ejemplo, "resistencia aumentada" o "susceptibilidad reducida" se puede referir a una reducción estadísticamente significativa de la incidencia y/o la gravedad de los signos clínicos o síntomas clínicos que se asocian a la infección por PRRSV en un animal que comprende al menos una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163 en comparación con un animal de control que tiene una secuencia cromosómica sin modificar. La expresión "reducción estadísticamente significativa de los síntomas clínicos" significa, pero sin limitación, que la frecuencia en la incidencia de al menos un síntoma clínico en el grupo editado de sujetos es de al menos un 10 %, preferentemente al menos un 20 %, más preferentemente al menos un 30 %, incluso más preferentemente al menos un 50 %, e incluso más preferentemente al menos un 70 % más baja que en el grupo de control no editado después de la exposición al agente infeccioso.

Como se usa en el presente documento, la expresión "activación (génica)" significa el reemplazo de un gen endógeno por un transgén o por el mismo gen endógeno con alguna modificación o modificaciones estructurales, pero conservando el control transcripcional del gen endógeno.

"Inactivación (génica)" significa la alteración de la estructura o el mecanismo regulador de un gen. Las inactivaciones se pueden generar a través de recombinación homóloga de vectores de direccionamiento, vectores de reemplazo o vectores de atropello y fuga o inserción aleatoria de un vector de trampa génica que da como resultado una pérdida completa, parcial o condicional de la función génica.

El término "animal" incluye cualquier animal no humano, por ejemplo, un animal doméstico (por ejemplo, un animal de ganado). La expresión "animal de ganado" incluye cualquier animal criado tradicionalmente en la ganadería, por ejemplo, un animal porcino, un animal bovino (por ejemplo, carne de vaca lechera), un animal ovino, un animal caprino, un animal equino (por ejemplo, caballos o burros), búfalos, camellos o un animal aviar (por ejemplo, pollos, pavos, patos, gansos, gallina de guinea o pichones). La expresión "animal de ganado" no incluye ratas, ratones u otros roedores.

Como se usa en el presente documento, el término "mutación" incluye alteraciones en la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido, tal como, por ejemplo, un gen o una secuencia de ADN codificante (CDS, por sus siglas en inglés), en comparación con la secuencia de tipo silvestre. El término incluye, sin limitación, sustituciones,

inserciones, desplazamientos de marco de lectura, supresiones, inversiones, translocaciones, duplicaciones, mutaciones en el sitio donante de corte y empalme, mutaciones puntuales y similares.

Como se usa en el presente documento, "unido operativamente" incluye la referencia a una unión funcional entre dos secuencias de ácido nucleico, por ejemplo, una secuencia promotora y una segunda secuencia, en donde la secuencia promotora inicia y media la transcripción de la secuencia de ADN correspondiente a la segunda secuencia. En general, unido operativamente significa que las secuencias de ácido nucleico que se unen son contiguas y, cuando sea necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, de forma contigua y en el mismo marco de lectura.

Como se usa en el presente documento, "polinucleótido" incluye la referencia a un desoxirribopolinucleótido, ribopolinucleótido o variantes modificadas conservadoramente; el término también puede referirse a análogos del mismo que tienen la naturaleza esencial de un ribonucleótido natural en el sentido de que se hibridan, en condiciones de hibridación rigurosas, a sustancialmente la misma secuencia de nucleótidos que los nucleótidos de origen natural y/o permiten la traducción al mismo aminoácido o aminoácidos que el nucleótido o nucleótidos de origen natural. Un polinucleótido puede ser de longitud completa o una subsecuencia de un gen estructural o regulador nativo o heterólogo. A menos que se indique otra cosa, el término incluye referencia a la secuencia especificada, así como a la secuencia complementaria de la misma. Por lo tanto, los ADN o ARN con cadenas principales modificadas para lograr estabilidad o por otras razones son "polinucleótidos", como se entiende ese término en el presente documento. Por otra parte, los ADN o ARN que comprenden bases inusuales, tales como inosina, o bases modificadas, tales como bases tritiladas, por citar sólo dos ejemplos, son polinucleótidos como se usa el término en el presente documento. Se apreciará que se ha realizado una gran diversidad de modificaciones en el ADN y el ARN que sirven para muchos fines útiles conocidos por los expertos en la materia.

El término polinucleótido, como se emplea en el presente documento, abarca dichas formas de polinucleótidos modificadas química, enzimática o metabólicamente, así como las formas químicas de ADN y ARN características de los virus y las células, incluyendo, entre otras cosas, células simples y complejas.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos también se pueden aplicar a variantes modificadas conservadoramente y a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un análogo químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural. La naturaleza esencial de dichos análogos de aminoácidos de origen natural es que, cuando se incorporan a una proteína, la proteína es específicamente reactiva a los anticuerpos desencadenados contra la misma proteína, pero que consiste en su totalidad en aminoácidos de origen natural.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" también incluyen modificaciones que incluyen, pero sin limitación, glicosilación, unión de lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de restos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación. Se apreciará, como es bien sabido y como se ha indicado anteriormente, que los polipéptidos no siempre son totalmente lineales. Por ejemplo, los polipéptidos pueden estar ramificados como resultado de la ubiquitinación y pueden ser circulares, con o sin ramificación, generalmente como resultado de eventos post-traduccionales, incluyendo eventos de procesamiento natural y eventos provocados por la manipulación humana que no se producen de manera natural. También pueden sintetizarse polipéptidos circulares, ramificados y circulares ramificados por procesos naturales no traduccionales y por métodos totalmente sintéticos. Además, la presente invención contempla el uso de las variantes amino terminales que contienen metionina y las que no contienen metionina de la proteína de la invención.

En el presente documento, "reducción de la incidencia y/o gravedad de los signos clínicos" o "reducción de los síntomas clínicos" significa, pero sin limitación, reducir el número de sujetos infectados en un grupo, reducir o eliminar el número de sujetos que presentan signos clínicos de infección, o reducir la gravedad de cualesquier signos clínicos que estén presentes en uno o más sujetos, en comparación con la infección de tipo silvestre. Por ejemplo, estos términos abarcan cualesquier signos clínicos de infección, patología pulmonar, viremia, producción de anticuerpos, reducción de la carga de patógenos, eliminación de patógenos, reducción de la transmisión de patógenos o reducción de cualquier signo clínico sintomático de PRRSV. Preferentemente, estos signos clínicos se reducen en uno o más animales de la invención en al menos un 10 % en comparación con sujetos que no tienen una modificación en el gen CD163 y que se infectan. Más preferentemente, los signos clínicos se reducen en los sujetos de la invención en al menos un 20 %, preferentemente en al menos un 30 %, más preferentemente en al menos un 40 % e incluso más preferentemente en al menos un 50 %.

Las expresiones "resto" o "resto de aminoácido" o "aminoácido" se usan indistintamente en el presente documento para referirse a un aminoácido que se incorpora en una proteína, polipéptido o péptido (colectivamente "proteína"). El aminoácido puede ser un aminoácido de origen natural y, a menos que se limite de otro modo, puede abarcar análogos no naturales de aminoácidos naturales que pueden actuar de manera similar a los aminoácidos de origen natural.

La expresión "se hibrida selectivamente" incluye la referencia a la hibridación, en condiciones de hibridación

rigurosas, de una secuencia de ácido nucleico con otra secuencia de ácido nucleico u otros productos biológicos. Cuando se usa un sistema de detección basado en hibridación, se elige una sonda de ácido nucleico que es complementaria a una secuencia de ácido nucleico de referencia, y después, mediante la selección de condiciones adecuadas, la sonda y la secuencia de referencia se hibridan selectivamente, o se unen, entre sí para formar una molécula dúplex.

La expresión "condiciones rigurosas" o "condiciones rigurosas de hibridación" incluye la referencia a las condiciones en las que una sonda se hibridará con su secuencia diana en un grado detectablemente mayor que con otras secuencias (por ejemplo, al menos 2 veces superior al fondo). Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán distintas en circunstancias distintas. Mediante el control de la rigurosidad de las condiciones de hibridación y/o lavado, se pueden identificar secuencias diana que son 100 % complementarias a la sonda (sondeo homólogo).

Como alternativa, se pueden ajustar las condiciones de rigurosidad para permitir cierto grado de emparejamiento erróneo en las secuencias, de manera que se detecten grados de similitud menores (sondado heterólogo). En general, una sonda tiene menos de aproximadamente 1000 nucleótidos de longitud, opcionalmente, menos de 500 nucleótidos de longitud.

Normalmente, las condiciones rigurosas serán aquellas en las que la concentración de sal es inferior a aproximadamente 1,5 M de ion de Na, normalmente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M de concentración de ion de Na (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3 y la temperatura es de al menos aproximadamente 30 °C para sondas cortas (por ejemplo, de 10 a 50 nucleótidos) y de al menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (por ejemplo, superior a 50 nucleótidos). También pueden conseguirse condiciones rigurosas con la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. La especificidad es normalmente la función de los lavados después de la hibridación, siendo factores críticos la fuerza iónica y la temperatura de la solución de lavado final. Para híbridos ADN/ADN, el punto de fusión térmica (T_f) puede aproximarse a partir de la ecuación de Meinkoth y Wahl, *Anal. Biochem.*, 138: 267-284 (1984): $T_f [^{\circ}\text{C}] = 81,5 + 16,6 (\log M) + 0,41(\% \text{ de GC}) - 0,61 (\% \text{ de form}) - 500/L$; donde M es la molaridad de los cationes monovalentes, % de GC es el porcentaje de nucleótidos de guanosina y citosina en el ADN, % de form es el porcentaje de formamida en la solución de hibridación y L es la longitud del híbrido en pares de bases. La T_f es la temperatura (bajo una fuerza iónica y un pH definidos) a la que el 50 % de una secuencia diana complementaria se hibrida con una sonda perfectamente emparejada. La T_f se reduce aproximadamente 1 °C por cada 1 % de emparejamiento erróneo; por lo tanto, las condiciones de T_f , hibridación y/o lavado pueden ajustarse para la hibridación con secuencias de la identidad deseada. Por ejemplo, si se buscan secuencias con > 90 % de identidad, la T_f puede disminuir 10 °C. Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean de aproximadamente 5 °C por debajo de la T_f para la secuencia específica y su complemento a una fuerza iónica y una pH definidos. Sin embargo, las condiciones más estrictas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 1 a 4 °C por debajo de la T_f ; las condiciones moderadamente estrictas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 6 a 10 °C por debajo de la T_f ; las condiciones poco estrictas pueden utilizar una hibridación y/o lavado a 11 a 20 °C por debajo de la T_f . Usando la ecuación, las composiciones de hibridación y lavado y la T_m deseada, los expertos habituales en la materia entenderán que se describen inherentemente variaciones en la rigurosidad de las soluciones de hibridación y/o lavado. Se encuentra una guía extensa sobre la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen, *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology/Hybridization with Nucleic Acid Probes*, Parte I, Capítulo 2 "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, Nueva York (1993); and *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 2, Ausubel, et al., Ed., Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York (1995).

Un "dominio de unión a ADN TALE" o "TALE" es un polipéptido que comprende uno o más de dominios/unidades repetidas TALE. Los dominios repetidos están implicados en la unión TALE a su secuencia de ADN diana afin. Una "unidad de repetición" (también denominada como una "repetición") tiene normalmente de 33-35 aminoácidos de longitud y presenta al menos homología de secuencia con otras secuencias de repetición TALE dentro de una proteína TALE de origen natural. Los dominios de unión de dedos de cinc y TALE se pueden "modificar por ingeniería genética" para unirse a una secuencia de nucleótidos predeterminada, por ejemplo, a través de modificación por ingeniería genética (alterando uno o más aminoácidos) de la región de la hélice de reconocimiento de las proteínas TALE o de dedos de cinc de origen natural. Por lo tanto, las proteínas de unión a ADN modificadas por ingeniería genética (dedos de cinc o TALE) son proteínas que no son de origen natural. Los ejemplos no limitantes de métodos para modificar por ingeniería genética proteínas de unión a ADN son el diseño y la selección. Una proteína de unión a ADN diseñada es una proteína que no existe en la naturaleza y cuyo diseño/composición es el resultado principalmente de criterios racionales. Los criterios racionales para el diseño incluyen la aplicación de reglas de sustitución y algoritmos informáticos para procesar información en una base de datos que almacena información de diseños ZFP y/o TALE existentes y datos de unión. Véanse, por ejemplo, las Pat. de los EE.UU. N.º 6.140.081; 6.453.242; y 6.534.261; véase también el documento WO 98/53058; el documento WO 98/53059; el documento WO 98/53060; el documento WO 02/016536 y el documento WO 03/016496 y la Publicación de los EE.UU. N.º 20110301073.

Como se usa en el presente documento, "vector" incluye una referencia a un ácido nucleico utilizado en la transfección de una célula hospedadora y en el que se puede insertar un polinucleótido. Los vectores con frecuencia son replicones. Los vectores de expresión permiten la transcripción de un ácido nucleico insertado en los mismos.

"Tipo silvestre" significa aquellos animales y blastocistos, embriones o células derivadas de los mismos, que no se han editado genéticamente ni modificado genéticamente de otro modo y por lo general son cepas endogámicas y exogámicas desarrolladas a partir de cepas de origen natural.

Una "proteína de unión a ADN de dedos de cinc" (o dominio de unión) es una proteína, o un dominio con una proteína más grande, que se une al ADN de forma específica de la secuencia a través de uno o más dedos de cinc, que son regiones de la secuencia de aminoácidos dentro del dominio de unión cuya estructura se estabiliza a través de la coordinación de un ion de cinc. La expresión proteína de unión a ADN de dedos de cinc con frecuencia se abrevia como proteína de dedos de cinc o ZFP.

Una proteína de dedos de cinc o TALE "seleccionada" es una proteína que no se encuentra en la naturaleza cuya producción es resultado principalmente de un proceso empírico, tal como la presentación en fagos, la trampa de interacción o la selección de híbridos. Véase, por ejemplo, la Pat. de los EE.UU. N.º 5.789.538; la Pat. de los EE.UU. N.º 5.925.523; la Pat. de los EE.UU. N.º 6.007.988; la Pat. de los EE.UU. N.º 6.013.453; la Pat. de los EE.UU. N.º 6.200.759; el documento WO 95/19431; el documento WO 96/06166; el documento WO 98/53057; el documento WO 98/54311; el documento WO 00/27878; el documento WO 01/60970, el documento WO 01/88197, el documento WO 02/099084 y la Publicación de los EE.UU. N.º 20110301073.

Los siguientes términos se usan para describir las relaciones secuenciales entre un polinucleótido/polipéptido de la presente invención con un polinucleótido/polipéptido de referencia: (a) "secuencia de referencia", (b) "ventana de comparación", (c) "identidad de secuencia" y (d) "porcentaje de identidad de secuencia".

(a) Como se usa en el presente documento, "secuencia de referencia" es una secuencia definida utilizada como una base para la comparación de secuencias con un polinucleótido/polipéptido de la presente invención. Una secuencia de referencia puede ser un subconjunto o la totalidad de una secuencia especificada; por ejemplo, como un segmento de un ADNc o una secuencia génica de longitud completa, o el ADNc o la secuencia génica completa.

(b) Como se usa en el presente documento, "ventana de comparación" incluye la referencia a un segmento contiguo y específico de una secuencia polinucleotídica/polipeptídica, en donde la secuencia de polinucleótidos/polipéptidos se puede comparar con una secuencia de referencia y en donde la porción de la secuencia de polinucleótidos/polipéptidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni supresiones) para una alineación óptima de las dos secuencias. En general, la ventana de comparación es de al menos 20 nucleótidos/aminoácidos contiguos de longitud, y opcionalmente puede ser de 30, 40, 50, 100 o más. Los expertos en la materia entienden que para evitar una alta similitud con una secuencia de referencia debido a la inclusión de huecos en la secuencia polinucleotídica/polipeptídica, se introduce normalmente una penalización por huecos y se resta del número de emparejamientos.

Se conocen bien en la técnica métodos de alineamiento de secuencias para la comparación. La alineación óptima de secuencias para su comparación puede realizarse mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2: 482(1981); mediante el algoritmo de alineación por homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48: 443 (1970); mediante el método de búsqueda de similitudes de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 2444 (1988); y mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos, incluyendo, pero sin limitación: CLUSTAL en el programa PC/Gene de Intelligenetics, Mountain View, California; GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA, y programas relacionados del paquete de software GCG Wisconsin Genetics, Versión 10 (disponible en Accelrys Inc., 9685 Scranton Road, San Diego, California, EE.UU.). El programa CLUSTAL fue bien descrito por Higgins y Sharp, *Gene* 73: 237-244 (1988); Higgins y Sharp, *CABIOS* 5: 151-153 (1989); Corpet, *et al.*, *Nucleic Acids Research* 16: 10881-90 (1988); Huang, *et al.*, *Computer Applications in the Biosciences* 8: 155-65 (1992) y Pearson, *et al.*, *Methods in Molecular Biology* 24: 307-331 (1994).

La familia de programas BLAST que se puede usar para búsquedas de similitudes en bases de datos incluye: BLASTN para secuencias de consulta de nucleótidos frente a secuencias de bases de datos de nucleótidos; BLASTX para secuencias de consulta de nucleótidos frente a bases de datos de proteínas; BLASTP para secuencias de consulta de proteínas frente a bases de datos de proteínas; TBLASTN para secuencias de consulta de proteínas frente a secuencias de bases de datos de nucleótidos; y TBLASTX para secuencias de consulta de nucleótidos frente a secuencias de bases de datos de nucleótidos. Véase, *Current Protocols in Molecular Biology*, Capítulo 19, Ausubel, *et al.*, Ed., Greene Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York (1995); Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410 (1990); y, Altschul *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402 (1997). El software para la realización de análisis BLAST se encuentra disponible al público, por ejemplo, a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (ncbi.nlm.nih.gov/). Este algoritmo se ha descrito detalladamente en varias publicaciones. Véanse, por ejemplo, Altschul SF *et al.*, "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, 25 NUCLEIC ACIDS RES. 3389 (1997); Centro Nacional de Información Biotecnológica, *THE NCBI HANDBOOK* [INTERNET], Capítulo 16: *The BLAST Sequence Analysis Tool* (McEntyre J, Ostel J, ed., 2002), disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21097/pdf/ch16.pdf>. El programa BLASTP para secuencias de aminoácidos también se ha descrito detalladamente (véase Henikoff y Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

89:10915).

Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5877 (1993)). Un número de programas de filtro de baja complejidad puede emplearse para reducir dichos alineamientos de baja complejidad. Por ejemplo, los filtros de baja complejidad SEG (Wooten y Federhen, *Comput. Chem.*, 17: 149-163 (1993)) y XNU (Claverie y States, *Comput. Chem.*, 17: 191-201 (1993)) pueden emplearse solos o en combinación.

A menos que se indique otra cosa, los valores de similitud/identidad de nucleótidos y proteínas proporcionados en el presente documentos se calculan usando GAP (GCP Versión 10) con valores predeterminados. también se puede usar GAP (Global Alignment Program, programa de alineamiento global) para comparar un polinucleótido o polipéptido de la presente invención con una secuencia de referencia. GAP usa el algoritmo de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48: 443-453, 1970) para encontrar la alineación de dos secuencias completas que maximice el número de coincidencias y minimice el número de huecos. GAP representa un miembro de la familia de las mejores alineaciones. Puede haber muchos miembros de esta familia, pero ningún otro miembro tiene una mejor calidad. GAP muestra cuatro tipos de mérito para alineamientos: Calidad, Relación, Identidad y Similitud. La Calidad es la métrica maximizada con el fin de alinear las secuencias. La Relación es la calidad dividida por el número de bases en el segmento más corto. La Identidad porcentual es el porcentaje de los símbolos que coinciden realmente. La Similitud porcentual es el porcentaje de los símbolos que son similares. Los símbolos que están frente a los huecos se ignoran. Una similitud es puntuada cuando el valor de la matriz de puntuación para un par de símbolos es superior o igual a 0,50, el umbral de similitud. La matriz de puntuación utilizada en la versión 10 del paquete de software Wisconsin Genetics es BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915).

El alineamiento múltiple de las secuencias puede realizarse usando el método de alineamiento CLUSTAL (Higgins y Sharp (1989) *CABIOS*. 5: 151-153) con los parámetros por defecto (PENALIZACIÓN POR HUECOS = 10, PENALIZACIÓN POR LONGITUD DE HUECOS = 10). Los parámetros por defecto para alineaciones por pares usando el método CLUSTAL incluyen KTUPLE 1, PENALIZACIÓN POR HUECOS = 3, VENTANA = 5 y DIAGONALES SALVADAS = 5.

(c) Como se usa en el presente documento, "identidad de secuencia" o "identidad", en el contexto de dos secuencias de ácido nucleico o polipéptido hace referencia a los restos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación especificada. Cuando se usa el porcentaje de identidad de secuencia en referencia a proteínas, se reconoce que las posiciones de restos que no son idénticas normalmente difieren por sustituciones de aminoácidos conservadoras, donde los restos de aminoácidos se sustituyen por otros restos de aminoácidos con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobia) y, por lo tanto, no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en sustituciones conservadoras, el porcentaje de identidad de secuencia se puede ajustar por exceso para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Se dice que las secuencias que difieren por dichas sustituciones conservadoras tienen "similitud de secuencia" o "similitud". Los medios para hacer este ajuste son bien conocidos por los expertos en la materia. Normalmente, esto implica puntuar una sustitución conservadora como un emparejamiento erróneo parcial en lugar de completo, aumentando de este modo el porcentaje de identidad de secuencia. Por lo tanto, por ejemplo, cuando se asigna a un aminoácido idéntico una puntuación de 1 y se asigna a una sustitución no conservadora una puntuación de cero, se asigna a una sustitución conservadora una puntuación entre cero y 1. La puntuación de las sustituciones conservadoras se puede calcular de acuerdo con el algoritmo de Meyers y Miller, *Computer Applic. Biol. Sci.*, 4: 11-17 (1988), por ejemplo, como se implementa en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California, EE.UU.).

(d) Como se usa en el presente documento, el "porcentaje de identidad de secuencia" significa el valor determinado comparando dos secuencias alineadas de manera óptima a lo largo de una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede incluir adiciones o supresiones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni supresiones) para una alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las cuales se encuentran la base de ácido nucleico o el resto de aminoácido idénticos en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia.

Animales y células que tienen una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163

CD163 tiene 17 exones y la proteína se compone de una región extracelular con 9 dominios del receptor eliminador rico en cisteína (SRCR), un segmento transmembrana y una corta cola citoplasmática. Varias variantes diferentes resultan del corte y empalme diferencial de un único gen (Ritter *et al.* 1999a; Ritter *et al.* 1999b). Gran parte de esta variación se debe a la longitud de la cola citoplasmática.

CD 163 tiene una serie de funciones importantes, incluyendo actuar como receptor eliminador de haptoglobina-hemoglobina. La eliminación de la hemoglobina libre en la sangre es una función importante de CD163 ya que el grupo hemo puede ser muy tóxico (Kristiansen *et al.* 2001). CD163 tiene una cola citoplasmática que facilita la endocitosis. La mutación de esta cola da como resultado una disminución de la captación del complejo haptoglobina-hemoglobina (Nielsen *et al.* 2006). Otras funciones de C163 incluyen la adhesión a eritroblastos (SRCR2), ser un receptor TWEAK (SRCR1-4 y 6-9), un receptor bacteriano (SRCR5), un receptor del virus porcino africano (Sanchez-Tones *et al.* 2003) y un papel potencial como inmunomodulador (analizado en Van Gorp *et al.* 2010a). En vista de estas importantes funciones, anteriormente se pensaba que la inactivación completa de CD163 produciría animales que no serían viables o estarían seriamente comprometidos (véase, por ejemplo, la Publicación PCT N.º 2012/158828).

CD 163 es un miembro de la superfamilia del receptor eliminador rico en cisteína (SRCR) y consiste en un dominio intracelular y 9 dominios SRCR extracelulares. En seres humanos, la endocitosis de la captación de hemo de hemoglobina mediada por CD163 a través de SRCR3 protege a las células del estrés oxidativo (Schaer *et al.*, 2006a; Schaer *et al.*, 2006b; Schaer *et al.*, 2006c). CD163 también sirve como receptor para el inductor débil de apoptosis similar al factor de necrosis tumoral (TWEAK: SRCR1-4 y 6-9), un receptor de patógenos (Virus de la peste porcina africana; bacterias: SRCR2) y unión a eritroblastos (SRCR2).

CD163 desempeña una función en la infección por muchos patógenos diferentes y, por lo tanto, la invención no se limita a animales que tengan una susceptibilidad reducida a la infección por PRRSV, sino que también incluye animales que tienen susceptibilidad reducida a cualquier patógeno que dependa de CD163 ya sea para la infección en una célula o para su posterior replicación y/o persistencia en la célula. El proceso de infección del PRRSV comienza con la unión inicial al heparán sulfato en la superficie del macrófago alveolar. Antes de 2013, se pensaba que se producía una unión segura a sialoadhesina (SIGLEC1, también denominada CD169 o SN). Después, el virus se internaliza a través de endocitosis mediada por clatrina. Otra molécula, CD163, después facilita el descubrimiento del virus en el endosoma (Van Breedam *et al.* 2010a). Se libera el genoma vírico y la célula se infecta.

En el presente documento se describen animales y descendencia de los mismos y células que comprenden al menos una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163, por ejemplo, una inserción o una supresión ("INDEL"), que confiere al animal una resistencia mejorada o completa a la infección por un patógeno (por ejemplo, PRRSV). Los solicitantes han demostrado que CD163 es el gen crítico en la infección por PRRSV y han creado estirpes y animales resistentes fundadores.

La presente divulgación proporciona animales modificados genéticamente, descendientes de los mismos o células animales que comprenden al menos una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163. La presente invención no incluye la inactivación o edición del gen SIGLEC1 (CD169), que previamente se había postulado como crítico para la resistencia al PRRSV.

La secuencia cromosómica editada se puede (1) inactivar, (2) modificar o (3) comprende una secuencia integrada que da como resultado una mutación nula. Una secuencia cromosómica inactivada está alterada de manera que la función de la proteína CD163 con respecto a la infección por el PRRSV se ve afectada, reducida o eliminada. Por lo tanto, un animal editado genéticamente que comprende una secuencia cromosómica inactivada puede denominarse "inactivado" o "inactivado condicional". De forma similar, un animal editado genéticamente que comprende una secuencia integrada puede denominarse "activado" o "activado condicional". Además, un animal editado genéticamente que comprende una secuencia cromosómica modificada puede comprender una o más mutaciones puntuales dirigidas u otra modificación de manera que se produzca un producto proteico alterado. Brevemente, el proceso puede comprender introducir en un embrión o célula al menos una molécula de ARN que codifica una nucleasa de dedos de cinc diana y, opcionalmente, al menos un polinucleótido accesorio. El método comprende además incubar el embrión o la célula para permitir la expresión de la nucleasa de dedos de cinc, en donde una rotura bicatenaria introducida en la secuencia cromosómica diana por la nucleasa de dedos de cinc se repara mediante un proceso de reparación de ADN de unión de extremos no homólogos propenso a errores o un proceso de reparación de ADN dirigido por homología. El método de edición de secuencias cromosómicas que codifican una proteína asociada al desarrollo de la estirpe germinal usando tecnología de nucleasa de dedos de cinc dirigida es rápido, preciso y altamente eficiente.

Como alternativa, el proceso puede comprender usar un sistema CRISPR/Cas9 para modificar la secuencia genómica. Para usar Cas9 para modificar secuencias genómicas, la proteína se puede suministrar directamente a una célula. Como alternativa, se puede administrar un ARNm que codifica Cas9 a una célula o se puede administrar un gen que proporciona la expresión de un ARNm que codifica Cas9 a una célula. Además, o bien el ARNcr específico diana y un ARNtracr se pueden suministrar directamente a una célula o el uno o más ARNg específicos diana se pueden suministrar a una célula (estos ARN se pueden producir como alternativa mediante un gen construido para expresar estos ARN). La selección de sitios diana y el diseño de ARNcr/ARNg son bien conocidos en la técnica. Puede encontrar un análisis sobre la construcción y clonación de ARNg en <http://www.genome-engineering.org/crispr/wp-content/uploads/2014/05/CRISPR-Reagent-Description-Rev20140509.pdf>.

Se puede usar al menos un locus de CD163 como sitio diana para la edición específica del sitio. La edición

específica de sitio puede incluir la inserción de un ácido nucleico exógeno (por ejemplo, un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de interés) o supresiones de ácidos nucleicos del locus. Por ejemplo, la integración del ácido nucleico exógeno y/o la supresión de parte del ácido nucleico genómico pueden modificar el locus para producir un gen CD163 alterado (es decir, actividad reducida de la proteína CD163).

En el presente documento se describen animales no humanos, descendencia de dichos animales y células animales que comprenden al menos una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163. En el contexto de la invención, los animales y células son animales y células porcinos, y en la medida en que se mencionen otros animales y células en el presente documento, éstos se incluyen únicamente con fines de referencia.

Se describe un animal no humano o descendencia del mismo o una célula animal que comprende al menos una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163. La secuencia cromosómica modificada da como resultado la producción sustancialmente nula de proteína CD163 funcional por parte del animal, descendencia o célula.

Se describe otro animal no humano o descendencia del mismo o una célula animal que comprende al menos una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163. La secuencia cromosómica modificada comprende una supresión en fase en el gen que codifica la proteína CD163.

El animal o célula porcinos de la invención es como se define en las reivindicaciones, y en la medida en que se describan en el presente documento otros animales o células porcinos, éstos se incluyen únicamente con fines de referencia. Se describe un animal porcino o descendencia del mismo o una célula porcina que comprende al menos una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163. La secuencia cromosómica modificada comprende: (a) SEQ ID NO: 118; o (b) una modificación seleccionada del grupo que consiste en: una supresión de 11 pares de bases del nucleótido 3.137 al nucleótido 3.147 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una inserción de 2 pares de bases entre los nucleótidos 3.149 y 3.150 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, con una supresión de 377 pares de bases del nucleótido 2.573 al nucleótido 2.949 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el mismo alelo; una supresión de 124 pares de bases del nucleótido 3.024 al nucleótido 3.147 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 123 pares de bases del nucleótido 3.024 al nucleótido 3.146 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una inserción de 1 par de bases entre los nucleótidos 3.147 y 3.148 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 130 pares de bases del nucleótido 3.030 al nucleótido 3.159 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 132 pares de bases del nucleótido 3.030 al nucleótido 3.161 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1506 pares de bases del nucleótido 1.525 al nucleótido 3.030 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una inserción de 7 pares de bases entre el nucleótido 3.148 y el nucleótido 3.149 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1280 pares de bases del nucleótido 2.818 al nucleótido 4.097 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1373 pares de bases del nucleótido 2.724 al nucleótido 4.096 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1467 pares de bases del nucleótido 2.431 al nucleótido 3.897 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1930 pares de bases del nucleótido 488 al nucleótido 2.417 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 12 pares de bases que comienza en el nucleótido 488, y en donde hay una supresión adicional de 129 pares de bases en el exón 7 del nucleótido 3.044 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 28 pares de bases del nucleótido 3.145 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1387 pares de bases del nucleótido 3.145 al nucleótido 4.531 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1382 pares de bases del nucleótido 3.113 al nucleótido 4.494 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 11 pares de bases que comienza en el nucleótido 3.113; una supresión de 1720 pares de bases del nucleótido 2.440 al nucleótido 4.160 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 452 pares de bases del nucleótido 3.015 al nucleótido 3.466 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; y combinaciones de los mismos.

La modificación en la secuencia cromosómica en el gen que codifica la proteína CD163 reduce la susceptibilidad del animal, descendencia o célula a la infección por un patógeno (por ejemplo, un virus tal como PRRSV), en comparación con la susceptibilidad de un animal, descendencia o célula que no comprende una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163 a la infección por el patógeno.

Por ejemplo, la modificación de la secuencia cromosómica en el gen que codifica la proteína CD 163 puede reducir la susceptibilidad del animal, descendencia o célula a un virus PRRSV de Tipo 1, un PRRSV de Tipo 2 o a virus PRRSV tanto de Tipo 1 como de Tipo 2.

La modificación en la secuencia cromosómica en el gen que codifica la proteína CD163 puede reducir al animal,

descendencia o célula de un aislado de PRRSV seleccionado del grupo que consiste en NVSL 97-7895, KS06-72109, P129, VR2332, CO90, AZ25, MLV-ResPRRS, KS62-06274, KS483 (SD23983), CO84, SD13-15, Lelystad, 03-1059, 03-1060, SD01-08, 4353PZ, y combinaciones de los mismos.

- 5 El animal o descendencia puede ser un embrión, un animal juvenil o un adulto. De forma similar, la célula puede comprender una célula embrionaria, una célula derivada de un animal juvenil o una célula derivada de un animal adulto.

- 10 El animal o descendencia puede ser un animal domesticado. De forma análoga, la célula puede comprender una célula derivada de un animal domesticado. El animal domesticado puede ser un animal de ganado, por ejemplo, un animal porcino, un animal bovino (por ejemplo, ganado vacuno o ganado lechero), un animal ovino, un animal caprino, un animal equino (por ejemplo, un caballo o un burro), búfalos, camellos o un animal aviar (por ejemplo, un pollo, un pavo, pato, ganso, una gallina de guinea o un pichón). El animal de ganado es preferentemente un animal bovino o porcino, y mucho más preferentemente es un animal porcino. En el contexto de la presente invención, el animal es un animal porcino.

El animal o descendencia puede comprender un animal editado genéticamente. La célula puede ser una célula editada genéticamente.

- 20 El animal o célula se puede editar genéticamente usando una endonucleasa de asentamiento. La endonucleasa de asentamiento puede ser una endonucleasa de origen natural, pero preferentemente es una endonucleasa de asentamiento de origen no natural diseñada racionalmente que tiene una secuencia de reconocimiento de ADN que se ha diseñado para que la endonucleasa se dirija a una secuencia cromosómica en un gen que codifica una proteína CD163. Por lo tanto, la endonucleasa de asentamiento puede ser una endonucleasa de asentamiento diseñada. La endonucleasa de asentamiento puede comprender, por ejemplo, un sistema de Grupos de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares (CRISPR) /Cas9, una Nucleasa efectora similar a activadores de la transcripción (TALEN), una Nucleasa de dedos de cinc (ZFN), una proteína de fusión de recombinasa, una meganucleasa o una combinación de las mismas. El animal o célula es preferentemente un animal o célula que se ha editado genéticamente usando un sistema CRISPR/Cas9.

- 30 El animal editado genéticamente, la descendencia del mismo o la célula editada genéticamente muestra preferentemente una mayor resistencia a un patógeno (por ejemplo, un virus tal como PRRSV) en comparación con un animal no editado. En el contexto de la presente invención, el animal porcino o la célula porcina tienen una susceptibilidad reducida a la infección por un PRRSV en comparación con la susceptibilidad de un animal o célula que no comprende la secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163 a la infección por PRRSV.

- 40 Por ejemplo, el animal editado genéticamente puede mostrar una mayor resistencia a un virus PRRSV de Tipo 1, un PRRSV de Tipo 2 o a virus PRRSV tanto de Tipo 1 como de Tipo 2.

- El animal editado genéticamente puede mostrar una mayor resistencia a un aislado de PRRSV seleccionado del grupo que consiste en NVSL 97-7895, KS06-72109, P129, VR2332, CO90, AZ25, MLV-ResPRRS, KS62-06274, KS483 (SD23983), CO84, SD13-15, Lelystad, 03-1059, 03-1060, SD01-08, 4353PZ, y combinaciones de los mismos.

- 45 El animal, descendencia o célula puede ser heterocigótico para la secuencia cromosómica modificada. Como alternativa, el animal, descendencia o célula puede ser homocigótico para la secuencia cromosómica modificada.

- 50 En cualquiera de los animales, descendencia o células, la secuencia cromosómica modificada puede comprender una inserción en el gen que codifica la proteína CD163, una supresión en el gen que codifica la proteína CD163 o una combinación de las mismas. Por ejemplo, la secuencia cromosómica modificada puede comprender una supresión en el gen que codifica la proteína CD163 (por ejemplo, una supresión en fase). Como alternativa, la secuencia cromosómica modificada puede comprender una inserción en el gen que codifica la proteína CD163.

- 55 La inserción o supresión puede provocar que se reduzca la producción o actividad de la proteína CD163, en comparación con la producción o actividad de la proteína CD163 en un animal, descendencia o célula que carece de la inserción o supresión.

- 60 La inserción o supresión puede dar como resultado la producción sustancialmente nula de proteína CD163 funcional por parte del animal, descendencia o célula. Por "proteína CD163 funcional prácticamente nula", se entiende que el nivel de proteína CD163 en el animal, descendencia o célula es indetectable, o si es detectable, es al menos un 90 % inferior al nivel observado en un animal, descendencia o célula que no comprende la inserción o supresión.

- 65 Cuando el animal, la descendencia o célula comprende un animal porcino, descendencia o célula, la secuencia cromosómica modificada puede comprender una modificación en el exón 7 del gen que codifica la proteína CD 163, el exón 8 del gen que codifica la proteína CD 163, un intrón que es contiguo al exón 7 o al exón 8 del gen que

codifica la proteína CD 163, o una combinación de los mismos. La secuencia cromosómica modificada comprende adecuadamente una modificación en el exón 7 del gen que codifica la proteína CD 163. En el contexto de la presente invención, las modificaciones a la secuencia cromosómica en un gen que codifica una proteína CD163 son como se especifican en las reivindicaciones, y en la medida en que se describen otras modificaciones en el presente documento, se incluyen simplemente con fines de referencia.

La modificación en el exón 7 del gen que codifica la proteína CD 163 puede comprender una supresión (por ejemplo, una supresión en fase en el exón 7). Como alternativa, la modificación en el exón 7 del gen que codifica la proteína CD163 puede comprender una inserción.

En cualquiera de los animales porcinos, descendencia o células descritos, la secuencia cromosómica modificada puede comprender la SEQ ID NO: 118. Como alternativa, la secuencia cromosómica modificada puede comprender una modificación seleccionada del grupo que consiste en: una supresión de 11 pares de bases del nucleótido 3.137 al nucleótido 3.147 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una inserción de 2 pares de bases entre los nucleótidos 3.149 y 3.150 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, con una supresión de 377 pares de bases del nucleótido 2.573 al nucleótido 2.949 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el mismo alelo; una supresión de 124 pares de bases del nucleótido 3.024 al nucleótido 3.147 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 123 pares de bases del nucleótido 3.024 al nucleótido 3.146 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una inserción de 1 par de bases entre los nucleótidos 3.147 y 3.148 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 130 pares de bases del nucleótido 3.030 al nucleótido 3.159 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 132 pares de bases del nucleótido 3.030 al nucleótido 3.161 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1506 pares de bases del nucleótido 1.525 al nucleótido 3.030 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una inserción de 7 pares de bases entre el nucleótido 3.148 y el nucleótido 3.149 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1280 pares de bases del nucleótido 2.818 al nucleótido 4.097 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1373 pares de bases del nucleótido 2.724 al nucleótido 4.096 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1467 pares de bases del nucleótido 2.431 al nucleótido 3.897 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1930 pares de bases del nucleótido 488 al nucleótido 2.417 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 12 pares de bases que comienza en el nucleótido 488, y en donde hay una supresión adicional de 129 pares de bases en el exón 7 del nucleótido 3.044 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 28 pares de bases del nucleótido 3.145 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1387 pares de bases del nucleótido 3.145 al nucleótido 4.531 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1382 pares de bases del nucleótido 3.113 al nucleótido 4.494 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 11 pares de bases que comienza en el nucleótido 3.113; una supresión de 1720 pares de bases del nucleótido 2.440 al nucleótido 4.160 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 452 pares de bases del nucleótido 3.015 al nucleótido 3.466 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; o combinaciones de las mismas.

Por ejemplo, la modificación puede comprender la supresión de 11 pares de bases del nucleótido 3.137 al nucleótido 3.147 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47.

La modificación puede comprender la inserción de 2 pares de bases entre los nucleótidos 3.149 y 3.150 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, con la supresión de 377 pares de bases del nucleótido 2.573 al nucleótido 2.949 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el mismo alelo.

La modificación puede comprender la supresión de 124 pares de bases del nucleótido 3.024 al nucleótido 3.147 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47.

La modificación puede comprender la supresión de 123 pares de bases del nucleótido 3.024 al nucleótido 3.146 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47.

La modificación puede comprender la inserción de 1 pares de bases entre los nucleótidos 3.147 y 3.148 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47.

La modificación puede comprender la supresión de 130 pares de bases del nucleótido 3.030 al nucleótido 3.159 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47.

La modificación puede comprender la supresión de 132 pares de bases del nucleótido 3.030 al nucleótido 3.161 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47.

La modificación puede comprender la supresión de 1506 pares de bases del nucleótido 1.525 al nucleótido 3.030 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47.

La modificación puede comprender la inserción de 7 pares de bases entre el nucleótido 3.148 y el nucleótido 3.149 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47.

- 5 La modificación puede comprender la supresión de 1280 pares de bases del nucleótido 2.818 al nucleótido 4.097 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47.

La modificación puede comprender la supresión de 1373 pares de bases del nucleótido 2.724 al nucleótido 4.096 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47.

- 10 La modificación puede comprender la supresión de 1467 pares de bases del nucleótido 2.431 al nucleótido 3.897 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47.

- 15 La modificación puede comprender la supresión de 1930 pares de bases del nucleótido 488 al nucleótido 2.417 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 12 pares de bases que comienza en el nucleótido 488, y en donde hay una supresión adicional de 129 pares de bases en el exón 7 del nucleótido 3.044 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47.

- 20 La modificación puede comprender la supresión de 28 pares de bases del nucleótido 3.145 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47.

La modificación puede comprender la supresión de 1387 pares de bases del nucleótido 3.145 al nucleótido 4.531 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47.

- 25 La modificación puede comprender la supresión de 1382 pares de bases del nucleótido 3.113 al nucleótido 4.494 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 11 pares de bases que comienza en el nucleótido 3.113.

- 30 La modificación puede comprender la supresión de 1720 pares de bases del nucleótido 2.440 al nucleótido 4.160 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47.

La modificación puede comprender la supresión de 452 pares de bases del nucleótido 3.015 al nucleótido 3.466 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47.

- 35 El animal porcino, descendencia o célula puede comprender cualquier combinación de las inserciones y supresiones anteriores.

- 40 La SEQ ID NO: 47 proporciona la secuencia de nucleótidos para la región que comienza 3000 pares de bases (pb) en dirección 5' del exón 7 del gen CD 163 porcino de tipo silvestre hasta la última base del exón 10 de este gen. La SEQ ID NO: 47 se usa como secuencia de referencia en el presente documento y se muestra en la Fig. 16.

- 45 Cuando el animal porcino, descendencia o célula comprende la inserción de 2 pares de bases entre los nucleótidos 3.149 y 3.150 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, la inserción de 2 pares de bases puede comprender la inserción del dinucleótido AG.

Cuando el animal porcino, descendencia o célula comprende la inserción de 1 pares de bases entre los nucleótidos 3.147 y 3.148 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, la inserción de 1 par de bases puede comprender la inserción de un único resto adenina.

- 50 Cuando el animal porcino, descendencia o célula comprende la inserción de 7 pares de bases entre el nucleótido 3.148 y el nucleótido 3.149 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, la inserción de 7 pares de bases puede comprender la secuencia TACTACT (SEQ ID NO: 115).

- 55 Cuando el animal porcino, descendencia o célula comprende la supresión de 1930 pares de bases del nucleótido 488 al nucleótido 2.417 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 12 pares de bases que comienza en el nucleótido 488, y en donde hay una supresión adicional de 129 pares de bases en el exón 7 del nucleótido 3.044 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, la inserción de 12 pares de bases puede comprender la secuencia TGTGGAGAATTC (SEQ ID NO: 116).

- 60 Cuando el animal porcino, descendencia o célula comprende la supresión de 1382 pares de bases del nucleótido 3.113 al nucleótido 4.494 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 11 pares de bases que comienza en el nucleótido 3.113, la inserción de 11 pares de bases puede comprender la secuencia AGCCAGCGTGC (SEQ ID NO: 117).

- 65

Cuando la secuencia cromosómica modificada en el gen que codifica la proteína CD163 comprende una supresión, la supresión comprende preferentemente una supresión en fase. Las supresiones en fase son supresiones que no provocan un desplazamiento en el marco de lectura del triplete y, por lo tanto, dan como resultado un producto proteico que tiene una supresión interna de uno o más aminoácidos, pero que no está truncado. Las supresiones de tres pares de bases o múltiplos de tres pares de bases dentro de un exón pueden dar como resultado una mutación en fase, suponiendo que el corte y empalme se produzca correctamente.

Se espera que los siguientes INDEL descritos en el presente documento para células y animales porcinos den como resultado supresiones en fase, puesto que las supresiones dentro del exón 7 del gen CD 163 porcino son múltiplos de tres: la supresión de 1506 pares de bases del nucleótido 1.525 al nucleótido 3.030 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; la supresión de 1930 pares de bases del nucleótido 488 al nucleótido 2.417 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 12 pares de bases que comienza en el nucleótido 488, y en donde hay una supresión adicional de 129 pares de bases en el exón 7 del nucleótido 3.044 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; la supresión de 1373 pares de bases del nucleótido 2.724 al nucleótido 4.096 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; la supresión de 123 pares de bases del nucleótido 3.024 al nucleótido 3.146 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; la supresión de 1467 pares de bases del nucleótido 2.431 al nucleótido 3.897 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; la supresión de 1387 pares de bases del nucleótido 3.145 al nucleótido 4.531 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; la supresión de 1382 pares de bases del nucleótido 3.113 al nucleótido 4.494 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 11 pares de bases que comienza en el nucleótido 3.113; y la supresión de 1720 pares de bases del nucleótido 2.440 al nucleótido 4.160 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47.

En consecuencia, en los animales, descendencia y células porcinas, la inserción o supresión en el gen que codifica la proteína CD163 puede comprender una supresión en fase en el exón 7 seleccionado del grupo que consiste en la supresión de 1506 pares de bases del nucleótido 1.525 al nucleótido 3.030 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; la supresión de 1930 pares de bases del nucleótido 488 al nucleótido 2.417 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 12 pares de bases que comienza en el nucleótido 488, y en donde hay una supresión adicional de 129 pares de bases en el exón 7 del nucleótido 3.044 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; la supresión de 1373 pares de bases del nucleótido 2.724 al nucleótido 4.096 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; la supresión de 123 pares de bases del nucleótido 3.024 al nucleótido 3.146 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; la supresión de 1467 pares de bases del nucleótido 2.431 al nucleótido 3.897 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; la supresión de 1387 pares de bases del nucleótido 3.145 al nucleótido 4.531 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; la supresión de 1382 pares de bases del nucleótido 3.113 al nucleótido 4.494 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 11 pares de bases que comienza en el nucleótido 3.113; una supresión de 1720 pares de bases del nucleótido 2.440 al nucleótido 4.160 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; y combinaciones de los mismos.

El animal porcino, descendencia o célula, puede comprender una inserción o supresión seleccionada del grupo que consiste en: la inserción de 2 pares de bases entre los nucleótidos 3.149 y 3.150 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, con la supresión de 377 pares de bases del nucleótido 2.573 al nucleótido 2.949 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el mismo alelo; la supresión de 28 pares de bases del nucleótido 3.145 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; la supresión de 452 pares de bases del nucleótido 3.015 al nucleótido 3.466 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; y combinaciones de los mismos.

Por ejemplo, el animal porcino, descendencia o célula puede comprender la inserción de 2 pares de bases entre los nucleótidos 3.149 y 3.150 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, con la supresión de 377 pares de bases del nucleótido 2.573 al nucleótido 2.949 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el mismo alelo.

El animal porcino, descendencia o célula puede comprender la supresión de 28 pares de bases del nucleótido 3.145 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47.

El animal porcino, descendencia o célula puede comprender la supresión de 452 pares de bases del nucleótido 3.015 al nucleótido 3.466 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47.

El animal porcino, descendencia o célula puede comprender cualquier combinación de cualquiera de las secuencias cromosómicas modificadas descritas en el presente documento.

Por ejemplo, el animal porcino, descendencia o célula puede comprender la inserción de 7 pares de bases entre el nucleótido 3.148 y el nucleótido 3.149 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en un alelo del

comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD 163.

Los animales, descendencia o células porcinas que comprenden cualquiera de las inserciones o supresiones descritas anteriormente pueden comprender una secuencia cromosómica que tiene un alto grado de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 47 fuera de la inserción o supresión. Por lo tanto, por ejemplo, el animal porcino, descendencia o célula puede comprender una secuencia cromosómica que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 47 en las regiones de la secuencia cromosómica fuera de la inserción o supresión.

El animal porcino, descendencia o célula puede comprender una secuencia cromosómica que comprende la SEQ ID NO: 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 118 o 119. Como se describe adicionalmente en los Ejemplos a continuación en el presente documento, las SEQ ID NO: 98-114 y 119 proporcionan secuencias de nucleótidos para una región correspondiente a la región de CD163 porcino de tipo silvestre proporcionada en SEQ ID NO: 47, e incluyen las inserciones o supresiones en la secuencia cromosómica de CD163 porcino que se describen en el presente documento. La SEQ ID NO: 118 proporciona la secuencia para una región correspondiente a la región del CD 163 porcino de tipo silvestre proporcionada por la SEQ ID NO: 47, en donde el exón 7 se ha reemplazado con un exón sintetizado que codifica un homólogo de SRCR 8 de la proteína humana similar a CD163 1 (hCD163L1).

Por ejemplo, el porcino, descendencia, animal o célula puede comprender una secuencia cromosómica que comprende la SEQ ID NO: 98, 101, 105, 109, 110, 112, 113 o 114. Las SEQ ID NO: 98, 101, 105, 109, 110, 112, 113 y 114 proporcionan las secuencias de nucleótidos para las supresiones en fase en el exón 7 de la secuencia cromosómica de CD163 porcino.

Como otro ejemplo, el animal porcino, descendencia o célula puede comprender una secuencia cromosómica que comprende la SEQ ID NO: 103, 111 o 119.

El animal porcino, descendencia o célula puede comprender la supresión de 11 pares de bases en un alelo del gen que codifica la proteína CD163 y la inserción de 2 pares de bases con la supresión de 377 pares de bases en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD 163.

El animal porcino, descendencia o célula puede comprender la supresión de 124 pares de bases en un alelo del gen que codifica la proteína CD163 y la supresión de 123 pares de bases en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD163.

El animal porcino, descendencia o célula puede comprender la inserción de 1 par de bases.

El animal porcino, descendencia o célula puede comprender la supresión de 130 pares de bases en un alelo del gen que codifica la proteína CD163 y la supresión de 132 pares de bases en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD163.

El animal porcino, descendencia o célula puede comprender la supresión de 1506 par de bases.

El animal porcino, descendencia o célula puede comprender la inserción de 7 par de bases.

El animal porcino, descendencia o célula puede comprender la supresión de 1280 pares de bases en un alelo del gen que codifica la proteína CD163 y la supresión de 1373 pares de bases en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD163.

El animal porcino, descendencia o célula puede comprender la supresión de 1467 par de bases.

El animal porcino, descendencia o célula puede comprender la supresión del intrón 6 de 1930 pares de bases del nucleótido 488 al nucleótido 2.417, con una inserción de 12 pares de bases en el nucleótido 4.488 y una supresión adicional de 129 pares de bases en el exón 7.

El animal porcino, descendencia o célula puede comprender la supresión de 28 pares de bases en un alelo del gen que codifica la proteína CD163 y la supresión de 1387 pares de bases en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD163.

El animal porcino, descendencia o célula puede comprender la supresión de 1382 pares de bases con la inserción de 11 pares de bases en un alelo del gen que codifica la proteína CD163 y la supresión de 1720 pares de bases en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD163.

Cualquiera de las células que comprenden la al menos una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163 puede comprender un espermatozoide. Como alternativa, cualquiera de estas células

puede comprender un óvulo (por ejemplo, un óvulo fecundado).

Cualquiera de las células que comprenden la al menos una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163 puede comprender una célula somática. Por ejemplo, cualquiera de las células puede comprender un fibroblasto (por ejemplo, un fibroblasto fetal).

Integración dirigida de un ácido nucleico en un locus de CD163

La integración específica de sitio de un ácido nucleico exógeno en un locus de CD163 se puede lograr mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la materia. Por ejemplo, la integración de un ácido nucleico exógeno en un locus de CD163 puede comprender poner en contacto una célula (por ejemplo, una célula aislada o una célula en un tejido u organismo) con una molécula de ácido nucleico que comprende el ácido nucleico exógeno. Dicha molécula de ácido nucleico puede comprender secuencias de nucleótidos que flanquean el ácido nucleico exógeno que facilitan la recombinación homóloga entre la molécula de ácido nucleico y al menos un locus de CD163. Las secuencias de nucleótidos que flanquean el ácido nucleico exógeno que facilitan la recombinación homóloga pueden ser complementarias a los nucleótidos endógenos del locus de CD163. Como alternativa, las secuencias de nucleótidos que flanquean el ácido nucleico exógeno que facilitan la recombinación homóloga pueden ser complementarias a los nucleótidos exógenos integrados previamente. Se puede integrar una pluralidad de ácidos nucleicos exógenos en un locus de CD163, tal como en el apilamiento de genes.

La integración de un ácido nucleico en un locus de CD163 puede facilitarse (por ejemplo, catalizarse) mediante maquinaria celular endógena de una célula hospedadora, tal como, por ejemplo y sin limitación, ADN endógeno y enzimas recombinasas endógenas. Como alternativa, la integración de un ácido nucleico en un locus de CD163 puede verse facilitada por uno o más factores (por ejemplo, polipéptidos) que se proporcionan a una célula hospedadora. Por ejemplo, se pueden proporcionar polipéptidos de una o más nucleasas, una o más recombinasas y/o ligasa (ya sea de forma independiente o como parte de un polipéptido quimérico) poniendo en contacto los polipéptidos con la célula hospedadora, o expresando los polipéptidos dentro de la célula hospedadora. En consecuencia, un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica al menos un polipéptido de nucleasa, recombinasa y/o ligasa puede introducirse en la célula hospedadora, ya sea de forma simultánea o secuencial con un ácido nucleico que se ha de integrar de forma específica de sitio en un locus de CD163, en donde el al menos un polipéptido de nucleasa, recombinasa y/o ligasa se expresa a partir de la secuencia de nucleótidos en la célula hospedadora.

Polipéptidos de unión a ADN

La integración específica de sitio se puede lograr utilizando factores que sean capaces de reconocer y unirse a secuencias de nucleótidos particulares, por ejemplo, en el genoma de un organismo hospedador. Por ejemplo, muchas proteínas comprenden dominios polipeptídicos que son capaces de reconocer y unirse a ADN de una manera específica de sitio. Una secuencia de ADN que es reconocida por un polipéptido de unión a ADN puede denominarse secuencia "diana". Los dominios polipeptídicos que son capaces de reconocer y unirse al ADN de una manera específica de sitio generalmente se pliegan correctamente y actúan independientemente para unirse al ADN de una manera específica de sitio, incluso cuando se expresan en un polipéptido distinto de la proteína de la que se aisló originariamente el dominio. De forma similar, las secuencias diana para el reconocimiento y la unión mediante polipéptidos de unión a ADN generalmente pueden ser reconocidas y unidas por dichos polipéptidos, incluso cuando están presentes en grandes estructuras de ADN (por ejemplo, un cromosoma), particularmente cuando el sitio donde se ubica la secuencia diana es uno conocido por ser accesible a proteínas celulares solubles (por ejemplo, un gen).

Mientras que los polipéptidos de unión a ADN identificados a partir de proteínas que existen en la naturaleza normalmente se unen a una secuencia o un motivo discretos de nucleótidos (por ejemplo, una secuencia de reconocimiento de consenso), existen métodos, y se conocen en la técnica, para modificar muchos de dichos polipéptidos de unión a ADN para reconocer una secuencia o motivo de nucleótidos diferente. Los polipéptidos de unión a ADN incluyen, por ejemplo y sin limitación: dominios de unión a ADN de dedos de cinc; cremalleras de leucina; dominios UPA de unión al ADN; GAL4; TAL; LexA; represores de Tet; LacI; y receptores de hormonas esteroideas.

Por ejemplo, el polipéptido de unión a ADN puede ser un dedo de cinc. Se pueden diseñar motivos de dedos de cinc individuales para apuntar y unirse específicamente a cualquiera de una amplia gama de sitios de ADN. Los polipéptidos de dedos de cinc de Cys₂His₂ canónico (así como Cys₃His no canónico) se unen al ADN insertando una hélice α en el surco principal de la doble hélice del ADN diana. El reconocimiento del ADN por un dedo de cinc es modular; cada dedo contacta principalmente con tres pares de bases consecutivos en la diana y unos pocos restos clave en el polipéptido median el reconocimiento. Mediante la inclusión de múltiples dominios de unión a ADN de dedos de cinc en una endonucleasa de direccionamiento, la especificidad de unión a ADN de la endonucleasa de direccionamiento puede aumentarse adicionalmente (y, por lo tanto, también puede aumentarse la especificidad de cualquier efecto regulador genético conferido por ella). Véanse, por ejemplo, Urnov *et al.* (2005) *Nature* 435:646-51. Por lo tanto, se pueden diseñar y utilizar uno o más polipéptidos de unión a ADN de dedos de cinc de manera que una endonucleasa de direccionamiento introducida en una célula hospedadora interactúe con una secuencia de

ADN que es única dentro del genoma de la célula hospedadora.

Preferentemente, la proteína de dedos de cinc es una proteína de origen no natural en el sentido de que está modificada para unirse a un sitio diana de elección. Véanse, por ejemplo, Beerli *et al.* (2002) *Nature Biotechnol.* 20:135-141; Pabo *et al.* (2001) *Ann. Rev. Biochem.* 70:313-340; Isalan *et al.* (2001) *Nature Biotechnol.* 19:656-660; Segal *et al.* (2001) *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:632-637; Choo *et al.* (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10:411-416; las Pat. de los EE.UU. N.º 6.453.242; 6.534.261; 6.599.692; 6.503.717; 6.689.558; 7.030.215; 6.794.136; 7.067.317; 7.262.054; 7.070.934; 7.361.635; 7.253.273; y las Publicaciones de Patente de los EE.UU. N.º 2005/0064474; 2007/0218528; 2005/0267061.

Un dominio de unión de dedos de cinc modificado por ingeniería genética puede tener una especificidad de unión novedosa, en comparación con una proteína de dedos de cinc de origen natural. Los métodos de modificación incluyen, pero sin limitación, un diseño racional y diversos tipos de selección. El diseño racional incluye, por ejemplo, usar de bases de datos que comprenden secuencias de nucleótidos de triplete (o cuadruplete) y secuencias de aminoácidos de dedos de cinc individuales, en las que cada secuencia de nucleótidos de triplete o cuadruplete se asocia a una o más secuencias de aminoácidos de dedos de cinc que se unen a la secuencia triplete o cuadruplete particular. Véanse, por ejemplo, las Pat. de los EE.UU. N.º 6453242 y 6534261.

Se desvelan métodos de selección de ejemplo, incluyendo la presentación en fagos y los sistemas de dos híbridos, en las Pat. de los EE.UU. N.º 5.789.538; 5.925.523; 6.007.988; 6.013.453; 6.410.248; 6.140.466; 6.200.759; y 6.242.568; así como el documento WO 98/37186; el documento WO 98/53057; el documento WO 00/27878; el documento WO 01/88197 y el documento GB 2.338.237. Además, se ha descrito la potenciación de la especificidad de unión para dominios de unión de dedos de cinc, por ejemplo, en el documento WO 02/077227.

Además, como se desvela en estas y otras referencias, los dominios de dedos de cinc y/o las proteínas de dedos de cinc de múltiples dedos pueden unirse entre sí usando cualquier secuencia enlazadora adecuada, incluyendo, por ejemplo, enlazadores de 5 o más aminoácidos de longitud. Véanse, también, las Pat. de los EE.UU. N.º 6.479.626; 6.903.185; y 7.153.949 para consultar secuencias enlazadoras de ejemplo de 6 o más aminoácidos de longitud. Las proteínas descritas en el presente documento pueden incluir cualquier combinación de enlazadores adecuados entre los dedos de cinc individuales de la proteína.

Selección de sitios diana: Los expertos en la materia conocen las ZFP y los métodos de diseño y construcción de proteínas de fusión (y polinucleótidos que codifican las mismas) y se describen en detalle en las Pat. de los EE.UU. N.º 6.140.0815; 789.538; 6.453.242; 6.534.261; 5.925.523; 6.007.988; 6.013.453; 6.200.759; el documento WO 95/19431; el documento WO 96/06166; el documento WO 98/53057; el documento WO 98/54311; el documento WO 00/27878; el documento WO 01/60970; el documento WO 01/88197; el documento WO 02/099084; el documento WO 98/53058; el documento WO 98/53059; el documento WO 98/53060; el documento WO 02/016536 y el documento WO 03/016496.

Además, como se desvela en estas y otras referencias, los dominios de dedos de cinc y/o las proteínas de dedos de cinc de múltiples dedos pueden unirse entre sí usando cualquier secuencia enlazadora adecuada, incluyendo, por ejemplo, enlazadores de 5 o más aminoácidos de longitud. Véanse, también, las Pat. de los EE.UU. N.º 6.479.626; 6.903.185; y 7.153.949 para consultar secuencias enlazadoras de ejemplo de 6 o más aminoácidos de longitud. Las proteínas descritas en el presente documento pueden incluir cualquier combinación de enlazadores adecuados entre los dedos de cinc individuales de la proteína.

Como alternativa, el polipéptido de unión a ADN es un dominio de unión a ADN de GAL4. GAL4 es un transactivador modular en *Saccharomyces cerevisiae*, pero también funciona como transactivador en muchos otros organismos. Véase, por ejemplo, Sadowski *et al.* (1988) *Nature* 335:563-4. En este sistema regulador, la expresión de genes que codifican enzimas de la vía metabólica de la galactosa en *S. cerevisiae* está estrictamente regulada por la fuente de carbono disponible. Johnston (1987) *Microbial. Rev.* 51:458-76. El control transcripcional de estas enzimas metabólicas está mediado por la interacción entre la proteína reguladora positiva, GAL4 y una secuencia de ADN simétrica de 17 pb a la que se une específicamente GAL4 (la secuencia de activación en dirección 5' (UAS)).

GAL4 nativa consiste en 881 restos de aminoácidos, con un peso molecular de 99 kDa. GAL4 comprende dominios funcionalmente autónomos, cuyas actividades combinadas representan la actividad de GAL4 *in vivo*. Ma y Ptashne (1987) *Cell* 48:847-53; Brent y Ptashne (1985) *Cell* 43 (3 parte 2): 729-36. Los 65 aminoácidos N-terminales de GAL4 comprenden el dominio de unión a ADN de GAL4. Keegan *et al.* (1986) *Science* 231:699-704; Johnston (1987) *Nature* 328:353-5. La unión específica de secuencia requiere la presencia de un catión divalente coordinado por 6 restos Cys presentes en el dominio de unión a ADN. El dominio coordinado que contiene cationes interactúa y reconoce un triplete CCG conservado en cada extremo del UAS de 17 pb a través de contactos directos con el surco principal de la hélice de ADN. Marmorstein *et al.* (1992) *Nature* 356:408-14. La función de unión a ADN de la proteína posiciona los dominios activadores transcripcionales C-terminales en las proximidades del promotor, de manera que los dominios activadores puedan dirigir la transcripción.

Los polipéptidos de unión a ADN adicionales que se pueden usar incluyen, por ejemplo y sin limitación, una

secuencia de unión de un gen inducible por AVRBS3; una secuencia de unión consenso de un gen inducible por AVRBS3 o una secuencia de unión sintética diseñada a partir del mismo (por ejemplo, dominio de unión a ADN de UPA); TAL; LexA (véase, por ejemplo, Brent y Ptashne (1985), citado anteriormente); LacR (véase, por ejemplo, Labow *et al.* (1990) *Mol. Cell. Biol.* 10:3343-56; Bairn *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88(12):5072-6); un receptor de hormona esteroidea (Elliston *et al.* (1990) *J. Biol. Chem.* 265:11517-121); el represor Tet (Patente de los EE.UU. N.º 6.271.341) y un represor Tet mutado que se une a una secuencia del operador tet en presencia, pero no la ausencia, de tetraciclina (Tc); el dominio de unión a ADN de NF-kappaB; y componentes del sistema regulador descrito en Wang *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(17):8180-4, que utiliza una fusión de GAL4, un receptor hormonal y VP16.

El dominio de unión a ADN de una o más de las nucleasas utilizadas en los métodos y composiciones descritos en el presente documento puede comprender un dominio de unión a ADN efector TAL de origen natural o modificado por ingeniería genética (no de origen natural). Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de los EE.UU. N.º 2011/0301073.

Como alternativa, la nucleasa puede comprender un sistema CRISPR/Cas. Dichos sistemas incluyen un locus de CRISPR (grupos de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares), que codifica componentes de ARN del sistema, y un locus Cas (asociado a CRISPR), que codifica proteínas (Jansen *et al.*, 2002. *Mol. Microbiol.* 43: 1565-1575; Makarova *et al.*, 2002. *Nucleic Acids Res.* 30: 482-496; Makarova *et al.*, 2006. *Biol. Direct* 1: 7; Haft *et al.*, 2005. *PLoS Comput. Biol.* 1: e60). Los locus de CRISPR en hospedadores microbianos contienen una combinación de genes Cas, así como elementos de ARN no codificante capaces de programar la especificidad de la escisión de ácido nucleico mediada por CRISPR.

El CRISPR de Tipo II es uno de los sistemas mejor caracterizados y realiza la rotura bicatenaria de ADN diana en la naturaleza en cuatro etapas secuenciales. En primer lugar, dos ARN no codificantes, la matriz pre-ARNcr y el ARNtracr, se transcriben a partir del locus CRISPR. En segundo lugar, el ARNtracr se hibrida con las regiones repetidas del pre-ARNcr y media el procesamiento del pre-ARNcr en ARNcr maduros que contienen secuencias espaciadoras individuales. En tercer lugar, el complejo maduro ARNcr:ARNtracr dirige Cas9 al ADN diana mediante el emparejamiento de bases Watson-Crick entre el espaciador del ARNcr y el protospacer del ADN diana junto al motivo adyacente al protospacer (PAM), un requisito adicional para el reconocimiento de la diana. Por último, Cas9 media la escisión del ADN diana para crear una rotura bicatenaria dentro del protoespaciador.

Para el uso del sistema CRISPR/Cas para crear inserciones y supresiones específicas, los dos ARN no codificantes (ARNcr y ARNtracr) pueden reemplazarse por un único ARN denominado ARN guía (ARNg). La actividad del sistema CRISPR/Cas comprende tres etapas: (i) inserción de secuencias de ADN exógenas en la matriz de CRISPR para prevenir futuros ataques, en un proceso llamado "adaptación", (ii) expresión de las proteínas relevantes, así como expresión y procesamiento de la matriz, seguida de (iii) interferencia mediada por ARN con el ácido nucleico extraño. En la célula bacteriana, varias proteínas Cas están implicadas en la función natural del sistema CRISPR/Cas y desempeñan papeles en funciones tales como la inserción del ADN extraño, etc.

La proteína Cas puede ser un "derivado funcional" de una proteína Cas de origen natural. Un "derivado funcional" de un polipéptido de secuencia nativa es un compuesto que tiene una propiedad biológica cualitativa en común con un polipéptido de secuencia nativa. Los "derivados funcionales" incluyen, pero sin limitación, fragmentos de una secuencia nativa y derivados de un polipéptido de secuencia nativa y sus fragmentos, siempre que tengan una actividad biológica en común con un polipéptido de secuencia nativa correspondiente. Una actividad biológica contemplada en el presente documento es la capacidad del derivado funcional para hidrolizar un sustrato de ADN en fragmentos. El término "derivado" abarca variantes de secuencia de aminoácidos del polipéptido, modificaciones covalentes y fusiones de los mismos. Los derivados adecuados de un polipéptido Cas o un fragmento del mismo incluyen, pero sin limitación, mutantes, fusiones, modificaciones covalentes de la proteína Cas o un fragmento de la misma. La proteína Cas, que incluye la proteína Cas o un fragmento de la misma, así como derivados de la proteína Cas o un fragmento de los mismos, pueden obtenerse de una célula o sintetizarse químicamente o mediante una combinación de estos dos procedimientos. La célula puede ser una célula que produce naturalmente proteína Cas, o una célula que produce naturalmente proteína Cas y está genéticamente modificada para producir la proteína Cas endógena a un nivel de expresión más alto o para producir una proteína Cas a partir de un ácido nucleico introducido de forma exógena, ácido nucleico que codifica una Cas que es igual o diferente de la Cas endógena. En algún caso, la célula no produce naturalmente la proteína Cas y está modificada genéticamente para producir una proteína Cas.

Un polipéptido de unión a ADN puede reconocer y unirse específicamente a una secuencia de nucleótidos diana comprendida dentro de un ácido nucleico genómico de un organismo hospedador. En algunos ejemplos, se puede encontrar cualquier número de instancias discretas de la secuencia de nucleótidos diana en el genoma del hospedador. La secuencia de nucleótidos diana puede ser rara dentro del genoma del organismo (por ejemplo, menos de aproximadamente 10, aproximadamente 9, aproximadamente 8, aproximadamente 7, aproximadamente 6, aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3, pueden existir en el genoma aproximadamente 2 o aproximadamente 1 copia o copias de la secuencia diana). Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos diana puede estar ubicada en un sitio único dentro del genoma del organismo. Las secuencias de nucleótidos diana pueden

estar, por ejemplo y sin limitación, dispersas aleatoriamente por todo el genoma entre sí; ubicadas en diferentes grupos de unión en el genoma; ubicadas en el mismo grupo de unión; ubicadas en cromosomas diferentes; ubicadas en el mismo cromosoma; ubicadas en el genoma en sitios que se expresan en condiciones similares en el organismo (por ejemplo, bajo el control de los mismos factores reguladores, o sustancialmente funcionalmente idénticos); y
 5 ubicadas muy cerca unas de otras en el genoma (por ejemplo, las secuencias diana pueden estar comprendidas dentro de ácidos nucleicos integrados como concatémicos en locus genómicos).

Direccionamiento a endonucleasas

10 Un polipéptido de unión a ADN que reconoce y se une específicamente a una secuencia de nucleótidos diana puede estar comprendido dentro de un polipéptido quimérico, para conferir al polipéptido quimérico una unión específica a la secuencia diana. En los ejemplos, dicho polipéptido quimérico puede comprender, por ejemplo y sin limitación, polipéptidos de nucleasa, recombinasa y/o ligasa, como estos polipéptidos se han descrito anteriormente. Los polipéptidos quiméricos que comprenden un polipéptido de unión a ADN y un polipéptido de nucleasa, recombinasa
 15 y/o ligasa también puede comprender otros motivos y/o dominios polipeptídicos funcionales, tales como, por ejemplo, y sin limitación: una secuencia espaciadora situada entre los polipéptidos funcionales en la proteína quimérica; un péptido líder; un péptido que dirige la proteína de fusión a un orgánulo (por ejemplo, el núcleo); polipéptidos que son escindidos por una enzima celular; marcadores peptídicos (por ejemplo, Myc, His, etc.); y otras secuencias de aminoácidos que no interfieren con la función del polipéptido quimérico.

20 Los polipéptidos funcionales (por ejemplo, polipéptidos de unión a ADN y polipéptidos de nucleasa) en un polipéptido quimérico pueden estar unidos operativamente. Los polipéptidos funcionales de un polipéptido quimérico pueden estar unidos operativamente por su expresión a partir de un único polinucleótido que codifica al menos los polipéptidos funcionales ligados entre sí en fase, para crear un gen quimérico que codifica una proteína quimérica.
 25 Como alternativa, los polipéptidos funcionales de un polipéptido quimérico pueden estar unidos operativamente por otros medios, tales como mediante reticulación de polipéptidos expresados independientemente.

Un polipéptido de unión a ADN, o ARN guía que reconoce y se une específicamente a una secuencia de nucleótidos diana puede estar comprendido dentro de una proteína aislada natural (o mutante de la misma), en donde la
 30 proteína aislada natural o mutante de la misma también comprende un polipéptido de nucleasa (y también puede comprender un polipéptido de recombinasa y/o ligasa). Los ejemplos de dichas proteínas aisladas incluyen TALEN, recombinasas (por ejemplo, Cre, Hin, Tre y recombinasa FLP), CRISPR/Cas9 guiado por ARN y meganucleasas.

Como se usan en el presente documento, la expresión "endonucleasa de direccionamiento" se refiere a proteínas
 35 aisladas naturales o modificadas por ingeniería genética y mutantes de las mismas que comprenden un polipéptido de unión a ADN o ARN guía y un polipéptido de nucleasa, así como a polipéptidos quiméricos que comprenden un polipéptido de unión a ADN o ARN guía y una nucleasa. Se puede usar cualquier endonucleasa de direccionamiento que comprende un polipéptido de unión a ADN o ARN guía que reconozca y se una específicamente a una secuencia de nucleótidos diana comprendida dentro de un locus de CD163 (por ejemplo, ya sea porque la secuencia
 40 diana está comprendida dentro de la secuencia nativa en el locus, o porque la secuencia diana se ha introducido en el lugar, por ejemplo, mediante recombinación).

Algunos ejemplos de polipéptidos quiméricos adecuados incluyen, sin limitación, combinaciones de los siguientes polipéptidos: polipéptidos de unión a ADN de dedos de cinc; un polipéptido de nucleasa FokI; dominios TALE;
 45 cremalleras de leucina; motivos de unión a ADN de factor de transcripción; y dominios de reconocimiento y/o escisión de ADN aislados de, por ejemplo y sin limitación, una TALEN, una recombinasa (por ejemplo, recombinasas Cre, Hin, RecA, Tre y FLP), CRISPR/Cas9 guiado por ARN, una meganucleasa; y otros conocidos por los expertos en la materia. Los ejemplos particulares incluyen una proteína quimérica que comprende un polipéptido de unión a ADN específico de sitio y un polipéptido de nucleasa. Los polipéptidos quiméricos se pueden modificar por ingeniería
 50 genética mediante métodos conocidos por los expertos en la materia para alterar la secuencia de reconocimiento de un polipéptido de unión a ADN comprendido dentro del polipéptido quimérico, para dirigir el polipéptido quimérico a una secuencia de nucleótidos particular de interés.

El polipéptido quimérico puede comprender un dominio de unión a ADN (por ejemplo, dedo de cinc, dominio efector
 55 TAL, etc.) y un dominio de nucleasa (escisión). El dominio de escisión puede ser heterólogo al dominio de unión a ADN, por ejemplo, un dominio de unión a ADN de dedos de cinc y un dominio de escisión de una nucleasa o un dominio de unión a ADN de TALEN y un dominio de escisión, o un dominio de unión a ADN de meganucleasa y un dominio de escisión de una nucleasa diferente. Los dominios de escisión heterólogos se pueden obtener de cualquier endonucleasa o exonucleasa. Los ejemplos de endonucleasas a partir de las cuales se puede derivar un
 60 dominio de escisión incluyen, pero sin limitación, endonucleasas de restricción y endonucleasas orientadoras. Véanse, por ejemplo, Catálogo 2002-2003, New England Biolabs, Beverly, Mass.; y Belfort *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388. Se conocen enzimas adicionales que escinden ADN (por ejemplo, Nucleasa 51; nucleasa de judía mungo; ADNsa I pancreática; nucleasa microcócica; endonucleasa HO de levadura; véase también Linn *et al.* (ed.) *Nucleases*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993). Una o más de estas enzimas (o fragmentos
 65 funcionales de las mismas) pueden usarse como fuente de dominios de escisión y semidominios de escisión.

De forma similar, un semidominio de escisión puede derivar de cualquier nucleasa o porción de la misma, como se ha expuesto anteriormente, que requiera la dimerización para la actividad de escisión. En general, se requieren dos proteínas de fusión para la escisión si las proteínas de fusión comprenden semidominios de escisión. Como alternativa, se puede usar una única proteína que comprende dos semidominios de escisión. Los dos semidominios de escisión pueden derivar de la misma endonucleasa (o fragmentos funcionales de la misma), o cada semidominio de escisión puede derivar de una endonucleasa diferente (o fragmentos funcionales de la misma). Además, los sitios diana para las dos proteínas de fusión se disponen preferentemente, uno con respecto al otro, de manera que la unión de las dos proteínas de fusión a sus sitios diana respectivos coloca los semidominios de escisión en una orientación espacial entre sí que permite que los semidominios de escisión formen un dominio de escisión funcional, por ejemplo, mediante dimerización. Por lo tanto, los bordes cercanos de los sitios diana pueden estar separados por 5-8 nucleótidos o por 15-18 nucleótidos. Sin embargo, cualquier número entero de nucleótidos, o pares de nucleótidos, puede intervenir entre dos sitios diana (por ejemplo, de 2 a 50 pares de nucleótidos o más). En general, el sitio de escisión se encuentra entre los sitios diana.

Las endonucleasas de restricción (enzimas de restricción) están presentes en muchas especies y son capaces de unirse a secuencias específicas de ADN (en un sitio de reconocimiento) y de escindir el ADN en el sitio de unión o cerca de él, por ejemplo, de manera que una o más secuencias exógenas (donantes/transgenes) se integran en o cerca de los sitios de unión (diana). Determinadas enzimas de restricción (por ejemplo, las de Tipo IIS) escinden el ADN en sitios retirados del sitio de reconocimiento y tienen dominios de unión y de escisión separables. Por ejemplo, la enzima Fok I de Tipo IIS cataliza la escisión bicatenaria del ADN, a 9 nucleótidos de su sitio de reconocimiento en una cadena y a 13 nucleótidos de su sitio de reconocimiento en la otra. Véanse, por ejemplo, las Pat. de los EE.UU. N.º 5.356.802; 5.436.150 y 5.487.994; así como Li *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4275-4279; Li *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2764-2768; Kim *et al.* (1994a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:883-887; Kim *et al.* (1994b) *J. Biol. Chem.* 269:31978-31982. Por lo tanto, las proteínas de fusión pueden comprender el dominio de escisión (o el semidominio de escisión) de al menos una enzima de restricción de Tipo IIS y uno o más dominios de unión a dedos de cinc, que pueden estar modificados por ingeniería genética o no.

Una enzima de restricción de Tipo IIS de ejemplo, cuyo dominio de unión es separable del dominio de unión, es Fok I. Esta enzima particular es activa en forma de dímero. Bitinaite *et al.* (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 10,570-10,575. En consecuencia, para los fines de la presente divulgación, la porción de la enzima Fok I utilizada en las proteínas de fusión desveladas se considera un semidominio de escisión. Por lo tanto, para la escisión bicatenaria dirigida y/o el reemplazo dirigido de secuencias celulares usando fusiones de dedos de cinc-Fok I, se pueden usar dos proteínas de fusión, comprendiendo cada una un semidominio de escisión FokI, para reconstituir catalíticamente un dominio de escisión catalíticamente activo. Como alternativa, también se puede usar una molécula polipeptídica única que contenga un dominio de unión a ADN y dos semidominios de escisión de Fok I.

Un dominio de escisión o semidominio de escisión puede ser cualquier porción de una proteína que conserva la actividad de escisión, o que conserva la capacidad de multimerizarse (por ejemplo, dimerizarse) para formar un dominio de escisión funcional.

Se describen enzimas de restricción de Tipo IIS de ejemplo en la Publicación de patente de los EE.UU. N.º 2007/0134796. Las enzimas de restricción adicionales también contienen dominios de unión y escisión escindibles, y éstos se contemplan en la presente divulgación. Véanse, por ejemplo, Roberts *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:418-420.

El dominio de escisión puede comprender uno o más semidominios de escisión modificados por ingeniería genética (también denominados mutantes del dominio de dimerización) que minimizan o impiden la homodimerización, como se describe, por ejemplo, en las Publicaciones de Patente de los EE.UU. N.º 2005/0064474; 2006/0188987 y 2008/0131962.

Como alternativa, las nucleasas se pueden ensamblar *in vivo* en el sitio diana del ácido nucleico usando la tecnología denominada "enzima dividida" (véase, por ejemplo, la Publicación de patente de los EE.UU. N.º 20090068164). Los componentes de dichas enzimas divididas pueden expresarse en construcciones de expresión separadas, o pueden unirse en un marco de lectura abierto en el que los componentes individuales están separados, por ejemplo, por un péptido 2A de autoescisión o una secuencia IRES. Los componentes pueden ser dominios de unión de dedos de cinc individuales o dominios de un dominio de unión de ácido nucleico de meganucleasa.

Nucleasas de dedos de cinc

Un polipéptido quimérico puede comprender una nucleasa de dedos de cinc (ZFN) diseñada a medida que se puede diseñar para suministrar una rotura de ADN bicatenaria específica de sitio diana en la que se puede integrar un ácido nucleico exógeno, o ADN donante (véase la Publicación de patente de los EE.UU. N.º 2010/0257638). Las ZFN son polipéptidos quiméricos que contienen un dominio de escisión no específico de una endonucleasa de restricción (por ejemplo, FokI) y un polipéptido de dominio de unión a ADN de dedos de cinc. Véanse, por ejemplo, Huang *et al.* (1996) *J. Protein Chem.* 15:481-9; Kim *et al.* (1997a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:3616-20; Kim *et al.* (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:1156-60; Kim *et al.* (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:883-7; Kim *et al.*

(1997b) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12875-9; Kim *et al.* (1997c) *Gene* 203:43-9; Kim *et al.* (1998) *Biol. Chem.* 379:489-95; Nahon y Raveh (1998) *Nucleic Acids Res.* 26:1233-9; Smith *et al.* (1999) *Nucleic Acids Res.* 27:674-81. Las ZFN pueden comprender dominios de unión a ADN de dedos de cinc no canónicos (véase la Publicación de patente de los EE.UU. N.º 2008/0182332). La endonucleasa de restricción FokI se debe dimerizar a través del dominio de nucleasa para escindir el ADN e introducir una rotura bicatenaria. Por consiguiente, las ZFN que contienen un dominio nucleasa de dicha endonucleasa también requieren la dimerización del dominio nucleasa con el fin de escindir el ADN diana. Mani *et al.* (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334:1191-7; Smith *et al.* (2000) *Nucleic Acids Res.* 28:3361-9. La dimerización de la ZFN puede verse facilitada por dos sitios de unión a ADN adyacentes y de orientación opuesta. Id.

Un método para la integración específica de sitio de un ácido nucleico exógeno en al menos un locus de CD 163 de un hospedador puede comprender introducir en una célula del hospedador una ZFN, en donde la ZFN reconoce y se une a una secuencia de nucleótidos diana, en donde la secuencia de nucleótidos diana está comprendida dentro de al menos un locus de CD 163 del hospedador. En determinados ejemplos, la secuencia de nucleótidos diana no está comprendida dentro del genoma del hospedador en ninguna otra posición que no sea el al menos un locus de CD163. Por ejemplo, se puede modificar por ingeniería genética un polipéptido de unión a ADN de la ZFN para reconocer y unirse a una secuencia de nucleótidos diana identificada dentro del al menos un locus de CD163 (por ejemplo, secuenciando el locus de CD163). Un método para la integración específica de sitio de un ácido nucleico exógeno en al menos un locus de rendimiento CD163 de un hospedador que comprende introducir en una célula del hospedador una ZFN también puede comprender introducir en la célula un ácido nucleico exógeno, en donde la recombinación del ácido nucleico exógeno en un ácido nucleico del hospedador que comprende el al menos un locus de CD163 se facilita mediante el reconocimiento específico de sitio y la unión de la ZFN a la secuencia diana (y la posterior escisión del ácido nucleico que comprende el locus de CD163).

Ácidos nucleicos exógenos opcionales para la integración en un locus de CD163

Los ácidos nucleicos exógenos para la integración en un locus de CD163 incluyen: un ácido nucleico exógeno para la integración específica de sitio en al menos un locus de CD163, por ejemplo y sin limitación, un ORF; un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una endonucleasa diana; y un vector que comprende al menos uno de los anteriores o ambos. Por lo tanto, los ácidos nucleicos particulares incluyen secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido, secuencias de nucleótidos estructurales y/o sitios de unión y reconocimiento de polipéptidos de unión a ADN.

Moléculas de ácido nucleico exógenas opcionales para integración específica de sitio

Como se ha señalado anteriormente, se proporciona la inserción de una secuencia exógena (también denominada "secuencia donante" o "donante" o "transgén"), por ejemplo, para la expresión de un polipéptido, la corrección de un gen mutante o para una expresión aumentada de un gen de tipo silvestre. Será fácilmente evidente que la secuencia donante normalmente no es idéntica a la secuencia genómica donde se coloca. Una secuencia donante puede contener una secuencia no homóloga flanqueada por dos regiones de homología para permitir una reparación dirigida por homología (HDR, por sus siglas en inglés) eficiente en la ubicación de interés. Adicionalmente, las secuencias donantes pueden comprender una molécula de vector que contiene secuencias que no son homólogas a la región de interés en la cromatina celular. Una molécula donante puede contener varias, regiones discontinuas de homología con la cromatina celular. Por ejemplo, para la inserción dirigida de secuencias que normalmente no están presentes en una región de interés, dichas secuencias pueden estar presentes en una molécula de ácido nucleico donante y flanqueadas por regiones de homología con la secuencia en la región de interés.

El polinucleótido donante puede ser ADN o ARN, monocatenario o bicatenario y puede introducirse en una célula en forma lineal o circular. Véase, por ejemplo, las Publicaciones de Patente de los EE.UU. N.º 2010/0047805, 2011/0281361, 2011/0207221 y 2013/0326645. Si se introduce en forma lineal, los extremos de la secuencia donante pueden protegerse (por ejemplo, de la degradación exonucleolítica) mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, se añaden uno o más restos de didesoxinucleótidos al extremo 3' de una molécula lineal y/o los oligonucleótidos autocomplementarios se ligan a uno o ambos extremos. Véanse, por ejemplo, Chang *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4959-4963; Nehls *et al.* (1996) *Science* 272:886-889. Los métodos adicionales para proteger polinucleótidos exógenos de la degradación incluyen, pero sin limitación, la adición de uno o más grupos amino terminales y el uso de uniones internucleotídicas modificadas tales como, por ejemplo, fosforotioatos, fosforamidatos y restos O-metil ribosa o desoxirribosa.

Se puede introducir un polinucleótido en una célula como parte de una molécula vector que tiene secuencias adicionales tales como, por ejemplo, orígenes de replicación, promotores y genes que codifican la resistencia a antibióticos. Por otra parte, los polinucleótidos donantes se pueden introducir en forma de ácido nucleico desnudo, en forma de ácido nucleico complejo con un agente tal como un liposoma o poloxámero, o pueden ser administrados por virus (por ejemplo, adenovirus, AAV, herpesvirus, retrovirus, lentivirus y lentivirus de integrasa defectuosa (IDLV, por sus siglas en inglés)).

El donante generalmente está integrado de manera que su expresión es impulsada por el promotor endógeno en el

sitio de integración, es decir, el promotor que impulsa la expresión del gen endógeno en el que se integra el donante (por ejemplo, CD163). Sin embargo, será evidente que el donante puede comprender un promotor y/o potenciador, por ejemplo, un promotor constitutivo o un promotor inducible o específico de tejido.

- 5 Además, aunque no se requiere para la expresión, las secuencias exógenas también pueden incluir secuencias reguladoras de la transcripción o de la traducción, por ejemplo, promotores, potenciadores, aislantes, sitios de entrada del ribosoma internos, secuencias que codifican péptidos 2A y/o señales de poliadenilación.

- 10 Ácidos nucleicos exógenos que se pueden integrar de una manera específica de sitio en al menos un locus de CD 163, para modificar el locus de CD 163 incluyen, por ejemplo y sin limitación, ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de interés; ácidos nucleicos que comprenden un gen agronómico; ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de ARN_i; o ácidos nucleicos que alteran el gen CD 163.

- 15 Se puede integrar un ácido nucleico exógeno en un locus de CD163, para modificar el locus de CD163, en donde el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de interés, de manera que la secuencia de nucleótidos se expresa en el hospedador a partir del locus de CD163. En algunos ejemplos, el polipéptido de interés (por ejemplo, una proteína extraña) se expresa a partir de una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de interés en cantidades comerciales. En dichos ejemplos, el polipéptido de interés se puede
20 extraer de la célula hospedadora, tejido o biomasa.

Moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una endonucleasa de direccionamiento

- 25 Se puede diseñar una secuencia de nucleótidos que codifica una endonucleasa de direccionamiento mediante manipulación (por ejemplo, ligadura) de secuencias de nucleótidos nativas que codifican polipéptidos comprendidos dentro de la endonucleasa de direccionamiento. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de un gen que codifica una proteína que comprende un polipéptido de unión a ADN se puede inspeccionar para identificar la secuencia de nucleótidos del gen que corresponde al polipéptido de unión a ADN, y esa secuencia de nucleótidos se puede usar
30 como un elemento de una secuencia de nucleótidos que codifica una endonucleasa de direccionamiento que comprende el polipéptido de unión a ADN. Como alternativa, la secuencia de aminoácidos de una endonucleasa de direccionamiento se puede usar para deducir una secuencia de nucleótidos que codifica la endonucleasa de direccionamiento, por ejemplo, de acuerdo con la degeneración del código genético.

- 35 En moléculas de ácido nucleico de ejemplo que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una endonucleasa diana, el último codón de una primera secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de nucleasa, y el primer codón de una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de unión a ADN, puede estar separado por cualquier número de tripletes de nucleótidos, por ejemplo, sin codificar un intrón o una "PARADA". De forma análoga, el último codón de una secuencia de nucleótidos que codifica una primera
40 secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de unión a ADN, y el primer codón de una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de nucleasa, pueden estar separados por cualquier número de tripletes de nucleótidos. El último codón (es decir, la mayoría de los 3' en la secuencia de ácido nucleico) de una primera secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de unión a ADN, y una segunda secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido de unión a ADN, se puede fusionar en el registro de fase con el primer
45 codón de una secuencia codificante de polinucleótido adicional directamente contigua al mismo, o separada del mismo por no más que una secuencia peptídica corta, tal como la codificado por un enlazador de nucleótido sintético (por ejemplo, un enlazador de nucleótidos que se puede haber utilizado para conseguir la fusión). Los ejemplos de dichas secuencias polinucleotídicas adicionales incluyen, por ejemplo y sin limitación, marcadores, péptidos dirigidos y sitios de escisión enzimática. De forma análoga, el primer codón del extremo 5' (en la secuencia de ácido nucleico)
50 de la primera y segunda secuencias de polinucleótidos se puede fusionar en registro de fase con el último codón de una secuencia codificante de polinucleótido adicional directamente contigua al mismo, o separada del mismo por no más de una secuencia peptídica corta.

- Una secuencia que separa secuencias de polinucleótidos que codifican polipéptidos funcionales en una
55 endonucleasa de direccionamiento (por ejemplo, un polipéptido de unión a ADN y un polipéptido de nucleasa) puede, por ejemplo, consistir en cualquier secuencia, de manera que no es probable que la secuencia de aminoácidos codificada altere significativamente la traducción de la endonucleasa de direccionamiento. Debido a la naturaleza autónoma de los polipéptidos de nucleasa conocidos y de los polipéptidos de unión a ADN conocidos, las secuencias intermedias no interferirán con las funciones respectivas de estas estructuras.

Otros métodos de inactivación

- Se pueden usar otras técnicas diversas conocidas en la técnica para inactivar genes con el fin de crear animales
65 nuligénicos y/o introducir construcciones de ácido nucleico en animales para producir animales fundadores y crear estirpes de animales, en las que la construcción de inactivación o de ácido nucleico se integra en el genoma. Dichas técnicas incluyen, sin limitación, microinyección pronuclear (Patente de los EE.UU. N° 4.873.191), transferencia de

genes mediada por retrovirus a estirpes germinales (Van der Putten *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6148-1652), direccionamiento de genes a células madre embrionarias (Thompson *et al.* (1989) *Cell* 56, 313-321), electroporación de embriones (Lo (1983) *Mol. Cell. Biol.* 3, 1803-1814), transferencia de genes mediada por espermatozoides (Lavitrano *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 14230-14235; Lavitrano *et al.* (2006) *Reprod. Fert. Develop.* 18, 19-23) y transformación *in vitro* de células somáticas, tales como células del cúmulo o mamarias, o células madre adultas, fetales o embrionarias, seguido de un trasplante nuclear (Wilmut *et al.* (1997) *Nature* 385, 810-813; y Wakayama *et al.* (1998) *Nature* 394, 369-374). La microinyección pronuclear, la transferencia génica mediada por espermatozoides y la transferencia nuclear de células somáticas son técnicas particularmente útiles. Un animal que está modificado genéticamente es un animal en el que todas sus células tienen la modificación genética, incluyendo sus células de la lestrirpe germinal. Cuando se usan métodos que producen un animal que es mosaico en su modificación genética, los animales pueden ser endogámicos y se puede seleccionar una descendencia modificada genómicamente. Se puede usar clonación, por ejemplo, para producir un animal mosaico si sus células se modifican en el estado de blastocisto o la modificación genómica puede tener lugar cuando se modifica una única célula. Los animales que se modifican para que no maduren sexualmente pueden ser homocigotos o heterocigotos para la modificación, dependiendo del enfoque específico que se use. Si un gen en particular se inactiva por una modificación por inactivación, normalmente se requeriría homocigosidad. Si un gen particular se inactiva por una interferencia de ARN o una estrategia negativa dominante, entonces la heterocigosidad es, con frecuencia, adecuada.

Normalmente, en la microinyección de embrión/cigoto, se introduce una construcción de ácido nucleico o ARNm en un óvulo fecundado; se usan óvulos fecundados de 1 o 2 células como estructura nuclear que contiene el material genético de la cabeza del espermatozoide y el óvulo es visible dentro del protoplasma. Se pueden obtener óvulos fecundados en fases pronucleares *in vitro* o *in vivo* (es decir, se pueden recuperar quirúrgicamente del oviducto de animales donantes). Los huevos fecundados *in vitro* se pueden producir de la siguiente manera. Por ejemplo, se pueden recoger ovarios porcinos en un matadero y mantenerlos a 22-28 °C durante el transporte. Los ovarios se pueden lavar y aislar para la aspiración folicular, y los folículos que varían de 4-8 mm se pueden aspirar en tubos de centrifuga cónicos de 50 ml usando agujas de calibre 18 y al vacío. El líquido folicular y los ovocitos aspirados se pueden acarar a través de prefiltros con TL-HEPES comercial (Minitube, Verona, Wis.). Los ovocitos rodeados por una masa cúmulo compacta se pueden seleccionar y colocar en el MEDIO DE MADURACIÓN DE OOCITOS TCM-199 (Minitube, Verona, Wisconsin) suplementado con cisteína 0,1 mg/ml, factor de crecimiento epidérmico 10 ng/ml, líquido folicular porcino al 10 %, 2-mercaptoetanol 50 µM, AMPc 0,5 mg/ml, gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG) 10 UI/ml y gonadotropina coriónica humana (hCG) durante aproximadamente 22 horas en aire humidificado a 38,7 °C y CO₂ al 5 %. Posteriormente, los ovocitos se pueden trasladar a medio de maduración TCM-199 fresco, que no contendrá cAMP, PMSG o hCG y se incuban durante 22 horas adicionales. Los ovocitos maduros pueden ser despojados de sus células del cúmulo agitándolos con formación de vórtice en hialuronidasa al 0,1 % durante 1 minuto.

Para los cerdos, los ovocitos maduros se pueden fertilizar en 500 µl de Minitube PORCPRO IVF MEDIUM SYSTEM (Minitube, Verona, Wisconsin) en placas de fecundación Minitube de 5 pocillos. En la preparación para la fecundación *in vitro* (FIV, por sus siglas en inglés), el semen de verraco recién recogido o congelado se puede lavar y resuspender en medio PORCPRO IVF hasta 400.000 espermatozoides. Las concentraciones de esperma se pueden analizar mediante análisis de semen asistido por ordenador (SPERMVISION, Minitube, Verona, Wis.). La inseminación final *in vitro* se puede realizar en un volumen de 10 µl a una concentración final de aproximadamente 40 espermatozoides/ovocitos móviles, dependiendo del verraco. Todos los ovocitos fecundados se pueden incubar a 38,7 °C en atmósfera de CO₂ al 5,0 % durante 6 horas. Seis horas después de la inseminación, los presuntos cigotos se pueden lavar dos veces en NCSU-23 y trasladar a 0,5 ml del mismo medio. Este sistema puede producir un 20-30 % de blastocistos de forma rutinaria en la mayoría de los verracos con una tasa de inseminación poliespérmica del 10-30 %.

Se pueden inyectar construcciones de ácido nucleico linealizados o ARNm en uno de los pronúcleos o en el citoplasma. Después, los óvulos inyectados pueden transferirse a una hembra receptora (por ejemplo, a los oviductos de una hembra receptora) y permitirse que se desarrollen en la hembra receptora para producir los animales transgénicos o editados genéticamente. En particular, los embriones fecundados *in vitro* se pueden centrifugar a 15.000 xg durante 5 minutos para sedimentar los lípidos y permitir la visualización del pronúcleo. Los embriones se pueden inyectar con un inyector Eppendorf FEMTOJET y se pueden cultivar hasta la formación de blastocistos. Se pueden registrar las tasas de escisión de embriones y formación y calidad de blastocistos.

Los embriones pueden transferirse quirúrgicamente al útero de receptores asincrónicos. Normalmente, se pueden depositar 100-200 (por ejemplo, 150-200) embriones en la unión ampolla-istmo del oviducto usando un catéter TOMCAT® de 13,97 cm (5,5 pulgadas). Después de la cirugía, se puede realizar un examen de ultrasonido de la gestación en tiempo real.

En la transferencia nuclear de células somáticas, una célula transgénica o editada genéticamente, tal como un blastómero embrionario, fibroblasto fetal, fibroblasto de oído adulto o célula de la granulosa que incluye una construcción de ácido nucleico descrita anteriormente, se puede introducir en un ovocito enucleado para establecer una célula combinada. Los ovocitos pueden enuclearse mediante disección parcial de la zona cerca del cuerpo polar

- y después presionando el citoplasma en el área de disección. Normalmente, se usa una pipeta de inyección con una punta biselada afilada para inyectar la célula transgénica o editada génicamente en un ovocito enucleado detenido en la meiosis 2. En algunas convenciones, los ovocitos detenidos en la meiosis 2 se denominan óvulos. Después de producir un embrión porcino o bovino (por ejemplo, fusionando y activando el ovocito), el embrión se transfiere a los oviductos de una hembra receptora, aproximadamente de 20 a 24 horas después de la activación. Véanse, por ejemplo, Cibelli *et al.* (1998) *Science* 280, 1256-1258 y las Pat. de los EE.UU. N.º 6,548,741, 7.547.816, 7.989.657 o 6.211.429. Para los cerdos, se puede comprobar la gestación de las hembras receptoras aproximadamente 20-21 días después de la transferencia de los embriones.
- 10 Se pueden usar técnicas de reproducción convencionales para crear animales que sean homocigóticos para el gen inactivado a partir de los animales fundadores heterocigóticos iniciales. La homocigosidad puede no ser necesaria, sin embargo. Los cerdos editados génicamente descritos en el presente documento se pueden criar con otros cerdos de interés.
- 15 Una vez que se han generado animales editados génicamente, la inactivación de un ácido nucleico endógeno se puede evaluar usando técnicas convencionales. El cribado inicial se puede realizar mediante análisis por transferencia Southern para determinar si se ha producido o no inactivación. Para una descripción del análisis Southern, véanse las secciones 9.37-9.52 de Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, segunda edición, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. También se pueden usar técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el cribado inicial. PCR se refiere a un procedimiento o técnica en el que se amplifican ácidos nucleicos diana. En general, se emplea la información de secuencia de los extremos de la región de interés o más allá para diseñar cebadores de oligonucleótidos que son idénticos o similares en secuencia a las cadenas opuestas del molde que ha de amplificarse. La PCR se puede usar para amplificar secuencias específicas de ADN, así como de ARN, incluyendo secuencias de ADN genómico total o ARN celular total. Normalmente, los cebadores tienen de 14 a 40 nucleótidos de longitud, pero pueden variar de 10 nucleótidos a cientos de nucleótidos de longitud. La PCR se describe en, por ejemplo, *PCR Primer: A Laboratory Manual*, ed. Dieffenbach y Dveksler, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. Los ácidos nucleicos también pueden amplificarse mediante la reacción en cadena de la ligasa, la amplificación por desplazamiento de cadena, la replicación de secuencias autosostenida o la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos. Véanse, por ejemplo, Lewis (1992) *Genetic Engineering News* 12,1; Guatelli *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874; y Weiss (1991) *Science* 254:1292. En la fase de blastocisto, los embriones se pueden procesar individualmente para su análisis por PCR, hibridación Southern y PCR splinkerette (véase, por ejemplo, Dupuy *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* (2002) 99:4495).

ARN de interferencia

- 35 Se conocen diversos sistemas de ARN de interferencia (ARNi). El ARN bicatenario (ARNbc) induce la degradación específica de secuencia de transcritos de genes homólogos. El complejo silenciador inducido por ARN (RISC) metaboliza el ARNbc a ARN de interferencia pequeños de 21-23 nucleótidos (ARNip). RISC contiene una ARNasa bicatenaria (ARNsabc, por ejemplo, Dicer) y ARNsamc (por ejemplo, Argonaut 2 o Ago2). RISC utiliza una cadena antisentido como guía para encontrar una diana escindible. Se conocen tanto ARNip como microARN (miRNA). Un método para inactivar un gen en un animal editado genéticamente comprende inducir interferencia de ARN contra un gen diana y/o ácido nucleico de manera que se reduzca la expresión del gen diana y/o ácido nucleico.

- 45 Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico exógena puede inducir interferencia de ARN contra un ácido nucleico que codifica un polipéptido. Por ejemplo, se puede usar ARN de interferencia pequeño bicatenario (ARNip) o ARN de horquilla pequeña (ARNhp) homólogo a un ADN diana para reducir la expresión de ese ADN. Se pueden producir construcciones para ARNip como se describe, por ejemplo, en Fire *et al.* (1998) *Nature* 391:806; Romano y Masino (1992) *Mol. Microbiol.* 6:3343; Cogoni *et al.* (1996) *EMBO J.* 15:3153; Cogoni y Masino (1999) *Nature* 399:166; Misquitta y Paterson (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:1451; y Kennerdell y Carthew (1998) *Cell* 95:1017. Las construcciones para ARNhp se pueden producir como se describe en McIntyre y Fanning (2006) *BMC Biotechnology* 6:1. En general, los ARNhp se transcriben como una molécula de ARN monocatenario que contiene regiones complementarias, que se puede hibridar y formar horquillas cortas.

- 55 La probabilidad de encontrar un único ARNip o ARNmi funcional individual dirigido a un gen específico es alta. La previsibilidad de una secuencia específica de ARNip, por ejemplo, es aproximadamente del 50 %, pero se pueden crear varios ARN de interferencia con la confianza de que al menos uno de ellos será eficaz.

- 60 Se pueden usar células *in vitro*, células *in vivo* o un animal editado genéticamente tal como un animal de ganado que exprese un ARNi dirigido contra un gen que codifica CD163. El ARNi puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en ARNip, ARNhc, ARNbc, RISC y miARN.

Sistemas inducibles

- 65 Se puede usar un sistema inducible para inactivar un gen CD163. Se conocen diversos sistemas inducibles que permiten el control espacial y temporal de la inactivación de un gen. Se ha demostrado que varios son funcionales *in vivo* en animales porcinos.

Un ejemplo de un sistema inducible es el sistema promotor de tetraciclina (tet)-on, que se puede usar para regular la transcripción del ácido nucleico. En este sistema, un represor Tet mutado (TetR) se fusiona con el dominio de activación de la proteína transactivadora VP 16 del virus del herpes simple para crear un activador transcripcional controlado por tetraciclina (tTA), que está regulado por tet o doxyciclina (dox). En ausencia de antibiótico, la transcripción es mínima, mientras que en presencia de tet o dox, se induce la transcripción. Los sistemas inducibles alternativos incluyen los sistemas de ecdisona o rapamicina. La ecdisona es una hormona de muda de insectos cuya producción está controlada por un heterodímero del receptor de ecdisona y el producto del gen ultraspiráculo (USP). La expresión se induce mediante tratamiento con ecdisona o un análogo de ecdisona como muristerona A. El agente que se administra al animal para activar el sistema inducible se denomina agente de inducción.

El sistema inducible por tetraciclina y el sistema recombinasa Cre/loxP (ya sea constitutivo o inducible) se encuentran entre los sistemas inducibles más comúnmente utilizados. El sistema inducible por tetraciclina implica un transactivador controlado por tetraciclina (tTA)/tTA inverso (rtTA). Un método para usar estos sistemas *in vivo* implica generar dos estirpes de animales editados génicamente. Una estirpe animal expresa el activador (tTA, rtTA o recombinasa Cre) bajo el control de un promotor seleccionado. Otra estirpe de animales expresa el aceptor, en el que la expresión del gen de interés (o el gen que se ha de modificar) está bajo el control de la secuencia diana para los transactivadores tTA/rtTA (o está flanqueada por secuencias loxP). El apareamiento de dos animales proporciona el control de la expresión génica.

Los sistemas reguladores dependientes de tetraciclina (sistemas tet) se basan en dos componentes, es decir, un transactivador controlado por tetraciclina (tTA o rtTA) y un promotor dependiente de tTA/rtTA que controla la expresión de un ADNc corriente abajo, de forma dependiente de la tetraciclina. En ausencia de tetraciclina o sus derivados (tales como doxyciclina), tTA se une a secuencias tetO, permitiendo la activación transcripcional del promotor dependiente de tTA. Sin embargo, en presencia de doxyciclina, tTA no puede interactuar con su diana y no se produce la transcripción. El sistema tet que usa tTA se denomina tet-OFF, porque la tetraciclina o la doxyciclina permiten una regulación transcripcional negativa. La administración de tetraciclina o sus derivados permite el control temporal de la expresión transgénica *in vivo*. rtTA es una variante de tTA que no es funcional en ausencia de doxyciclina, pero requiere la presencia del ligando para la transactivación. Por lo tanto, este sistema tet se denomina tet-ON. Los sistemas tet se han utilizado *in vivo* para la expresión inducible de varios transgenes, que codifican, por ejemplo, genes indicadores, oncogenes o proteínas implicadas en una cascada de señalización.

El sistema Cre/lox usa la recombinasa Cre, que cataliza la recombinación específica de sitio mediante el cruce entre dos secuencias de reconocimiento de Cre distantes, es decir, sitios loxP. Una secuencia de ADN introducida entre las dos secuencias loxP (denominada ADN flojado) se escinde mediante recombinación mediada por Cre. El control de la expresión de Cre en un animal transgénico y/o editado génicamente, usando control espacial (con un promotor específico de tejido o célula) o control temporal (con un sistema inducible), da como resultado el control de la escisión del ADN entre los dos sitios loxP. Una aplicación es para la inactivación condicional de genes (inactivación condicional). Otro enfoque es la sobreexpresión de proteínas, en donde se inserta un codón de parada flojado entre la secuencia promotora y el ADN de interés. Los animales editados genéticamente no expresan el transgén hasta que se expresa Cre, conduciendo a la escisión del codón de parada flojado. Este sistema se ha aplicado a la oncogénesis específica de tejido y a la expresión controlada de receptores de antígenos en linfocitos B. También se han desarrollado recombinasas Cre inducibles. La recombinasa Cre inducible se activa únicamente mediante la administración de un ligando exógeno. Las recombinasas Cre inducibles son proteínas de fusión que contienen la recombinasa Cre original y un dominio de unión a ligando específico. La actividad funcional de la recombinasa Cre depende de un ligando externo que es capaz de unirse a este dominio específico en la proteína de fusión.

Se pueden usar células *in vitro*, células *in vivo* o un animal editado genéticamente tal como un animal de ganado que comprende un gen CD163 bajo el control de un sistema inducible. La modificación genética de un animal puede ser genómica o en mosaico. El sistema inducible puede seleccionarse, por ejemplo, del grupo que consiste en Tet-On, Tet-Off, Cre-lox y Hif1 alfa.

Vectores y ácidos nucleicos

Se puede introducir una diversidad de ácidos nucleicos en las células con fines de inactivación, para la inactivación de un gen, para obtener la expresión de un gen o para otros fines. Como se usa en el presente documento, la expresión ácido nucleico incluye ADN, ARN y análogos de ácidos nucleicos, y ácidos nucleicos que son bicatenarios o monocatenarios (es decir, monocatenarios sentido o antisentido). Los análogos de ácidos nucleicos pueden modificarse en el resto de base, el resto de azúcar o el fosfato para mejorar, por ejemplo, la estabilidad, la hibridación o la solubilidad del ácido nucleico. Las modificaciones en el resto de base incluyen desoxiuridina por desoxitimidina y 5-metil-2'-desoxicitidina y 5-bromo-2'-doxicididina por desoxicitidina. Las modificaciones del resto de azúcar incluyen la modificación del 2' hidroxilo del azúcar ribosa para formar 2'-O-metil o 2'-O-alil azúcares. La cadena principal de fosfato de desoxirribosa se puede modificar para producir ácidos morfolino nucleicos, en los que cada resto de base está unido a un grupo de seis miembros, anillo morfolino o ácidos nucleicos peptídicos, en los que la cadena principal de desoxifosfato se reemplaza por una cadena principal de pseudopéptido y se conservan las cuatro bases. Véanse, Summerton y Weller (1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7(3):187; y Hyrup *et al.*

(1996) *Bioorgan. Med. Chem.* 4:5. Además, la cadena principal de desoxifosfato se puede reemplazar por, por ejemplo, una cadena principal de fosforotioato o fosforoditioato, una fosforoamidita o una cadena principal de alquilfosfotriéster.

La secuencia de ácido nucleico diana puede unirse operativamente a una región reguladora tal como un promotor. Las regiones reguladoras pueden ser regiones reguladoras porcinas o pueden ser de otras especies. Como se usa en el presente documento, unido operativamente se refiere al posicionamiento de una región reguladora con respecto a una secuencia de ácido nucleico de manera que permita o facilite la transcripción del ácido nucleico diana.

Cualquier tipo de promotor puede unirse operativamente a una secuencia de ácido nucleico diana. Los ejemplos de promotores incluyen, sin limitación, promotores específicos de tejidos, promotores constitutivos, promotores inducibles y promotores que responden o no a un estímulo particular. Los promotores específicos de tejido adecuados pueden dar como resultado la expresión preferencial de un transcrito de ácido nucleico en células beta e incluyen, por ejemplo, el promotor de la insulina humana. Otros promotores específicos de tejido pueden dar como resultado una expresión preferencial en, por ejemplo, hepatocitos o tejido cardíaco y pueden incluir los promotores de la cadena pesada de albúmina o alfa-miosina, respectivamente. Se puede usar un promotor que facilite la expresión de una molécula de ácido nucleico sin especificidad tisular o temporal significativa (es decir, un promotor constitutivo). Por ejemplo, se puede usar un promotor de beta-actina tal como el promotor del gen de beta-actina de pollo, promotor de ubiquitina, promotor de miniCAG, promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) o promotor de 3-fosfoglicerato cinasa (PGK), así como promotores víricos tales como el promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple (HSV-TK), el promotor SV40 o un promotor de citomegalovirus (CMV). Por ejemplo, como promotor se puede usar una fusión del promotor del gen de beta actina de pollo y el potenciador de CMV. Véanse, por ejemplo, Xu *et al.* (2001) *Hum. Gene Ther.* 12:563; y Kiwaki *et al.* (1996) *Hum. Gene Ther.* 7:821.

Las regiones reguladoras adicionales que pueden ser útiles en construcciones de ácidos nucleicos, incluyen, pero sin limitación, secuencias de poliadenilación, secuencias de control de traducción (por ejemplo, un segmento de entrada de ribosoma interno, IRES), potenciadores, elementos inducibles o intrones. Es posible que dichas regiones reguladoras no sean necesarias, aunque pueden aumentar la expresión al afectar a la transcripción, la estabilidad del ARNm, la eficiencia de la traducción o similares. Dichas regiones reguladoras pueden incluirse en una construcción de ácido nucleico según se desee para obtener una expresión óptima de los ácidos nucleicos en la célula o células. Sin embargo, en ocasiones se puede obtener una expresión suficiente sin dichos elementos adicionales.

Se puede usar una construcción de ácido nucleico que codifique péptidos señal o marcadores seleccionables. Se pueden usar péptidos señal de manera que un polipéptido codificado se dirija a una ubicación celular particular (por ejemplo, la superficie celular). Los ejemplos no limitantes de marcadores seleccionables incluyen puomicina, ganciclovir, adenosina desaminasa (ADA), aminoglucósido fosfotransferasa (neo, G418, APH), dihidrofolato reductasa (DHFR), higromicina-B-fosfotransferasa, timidina cinasa (TK) y xantina-guanina fosforribosiltransferasa (XGPRT). Dichos marcadores son útiles para seleccionar transformantes estables en cultivo. Otros marcadores seleccionables incluyen polipéptidos fluorescentes, tales como proteína fluorescente verde o proteína fluorescente amarilla.

Una secuencia que codifica un marcador seleccionable puede estar flanqueada por secuencias de reconocimiento para una recombinasa tal como, por ejemplo, Cre o Fip. Por ejemplo, el marcador seleccionable puede estar flanqueado por sitios de reconocimiento loxP (sitios de reconocimiento de 34 pb reconocidos por la recombinasa Cre) o sitios de reconocimiento FRT de manera que el marcador seleccionable pueda escindirse de la construcción. Véanse, Orban, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1992) 89:6861, para consultar una revisión de la tecnología Cre/lox, y Brand y Dymecki, *Dev. Cell* (2004) 6:7. También se puede usar un transposón que contiene un transgén activable por Cre o Fip interrumpido por un gen marcador seleccionable para obtener animales con expresión condicional de un transgén. Por ejemplo, un promotor que impulsa la expresión del marcador/transgén puede ser ubicuo o específico de tejido, lo que daría como resultado la expresión ubicua o específica de tejido del marcador en animales F0 (por ejemplo, cerdos). Se puede lograr la activación específica de tejido del transgén, por ejemplo, cruzando un cerdo que expresa de manera ubicua un transgén interrumpido con marcador con un cerdo que expresa Cre o Fip de una manera específica de tejido, o cruzando un cerdo que expresa un transgén interrumpido con marcador de una manera específica de tejido con un cerdo que expresa de manera ubicua recombinasa Cre o Fip. La expresión controlada del transgén o la escisión controlada del marcador permiten la expresión del transgén.

El ácido nucleico exógeno puede codificar un polipéptido. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido puede incluir una secuencia marcadora que codifica un "marcador" diseñado para facilitar la manipulación posterior del polipéptido codificado (por ejemplo, para facilitar la localización o detección). Se pueden insertar secuencias marcadoras en la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de manera que el marcador codificado esté ubicado en el extremo carboxilo o amino del polipéptido. Los ejemplos no limitantes de marcadores codificados incluyen glutatión S-transferasa (GST) y el marcador FLAG™ (Kodak, New Haven, Conn.).

Las construcciones de ácido nucleico se pueden metilar usando una metilasa SssI CpG (New England Biolabs,

Ipswich, Mass.). En general, la construcción de ácido nucleico se puede incubar con S-adenosilmetionina y Sssl CpG-metilasa en tampón a 37 °C. La hipermetilación se puede confirmar incubando la construcción con una unidad de endonucleasa HinP1I durante 1 hora a 37 °C y ensayando mediante electroforesis en gel de agarosa.

5 Las construcciones de ácido nucleico pueden introducirse en células animales embrionarias, fetales o adultas de cualquier tipo, incluyendo, por ejemplo, células germinales tales como un ovocito o un óvulo, una célula progenitora, una célula madre adulta o embrionaria, una célula germinal primordial, una célula de riñón tal como una célula PK-15, una célula de los islotes, una célula beta, una célula hepática o un fibroblasto tal como un fibroblasto dérmico, usando una diversidad de técnicas. Los ejemplos no limitantes de técnicas incluyen el uso de sistemas de transposones, virus recombinantes que pueden infectar células o liposomas u otros métodos no víricos tales como la electroporación, la microinyección o la precipitación de fosfato de calcio, que son capaces de suministrar ácidos nucleicos a las células.

15 En los sistemas de transposones, la unidad transcripcional de una construcción de ácido nucleico, es decir, la región reguladora unida operativamente a una secuencia de ácido nucleico exógena, está flanqueada por una repetición invertida de un transposón. Se han desarrollado varios sistemas de transposones, incluyendo, por ejemplo, Sleeping Beauty (véase, Pat. de los EE.UU. N.º 6.613.752 y Publicación de los EE.UU. N.º 2005/0003542); Frog Prince (Miskey *et al.* (2003) *Nucleic Acids Res.* 31:6873); Tol2 (Kawakami (2007) *Genome Biology* 8 (Supl.1): S7; Minos (Pavlopoulos *et al.* (2007) *Genome Biology* 8 (Supl.1):S2); Hsmar1 (Miskey *et al.* (2007)) *Mol Cell Biol.* 27:4589); y Passport, para introducir ácidos nucleicos en las células, incluyendo células de ratón, humanas y porcinas. El transposón Sleeping Beauty es particularmente útil. Una transposasa puede suministrarse en forma de una proteína, codificada en la misma construcción de ácido nucleico que el ácido nucleico exógeno, puede introducirse en una construcción de ácido nucleico separada o proporcionarse como un ARNm (por ejemplo, un ARNm transcrito *in vitro* y protegido terminalmente).

25 También se pueden incluir elementos aislantes en una construcción de ácido nucleico para mantener la expresión del ácido nucleico exógeno e inhibir la transcripción no deseada de genes del hospedador. Véanse, por ejemplo, Publicación de los EE.UU. N.º 2004/0203158. Normalmente, un elemento aislante flanquea cada lado de la unidad transcripcional y es interno a la repetición invertida del transposón. Los ejemplos no limitantes de elementos aislantes incluyen elementos aislantes de tipo región de unión de matriz (MAR) y elementos aislantes de tipo borde. Véanse, por ejemplo, las Pat. de los EE.UU. N.º 6.395.549, 5.731.178, 6.100.448 y 5.610.053, y la Publicación de los EE.UU. N.º 2004/0203158.

35 Los ácidos nucleicos se pueden incorporar en los vectores. Un vector es un término amplio que incluye cualquier segmento de ADN específico que esté diseñado para pasar de un ADN portador a un ADN diana. Un vector puede referirse a un vector de expresión, o un sistema de vectores, que es un conjunto de componentes necesarios para lograr la inserción de ADN en un genoma u otra secuencia de ADN diana, tal como un episoma, plásmido o incluso segmento de ADN de virus/fago. Los sistemas de vectores tales como vectores víricos (por ejemplo, retrovirus, virus adenoasociados y virus de fagos integradores) y vectores no víricos (por ejemplo, transposones) utilizados para la administración de genes en animales tienen dos componentes básicos: 1) un vector compuesto por ADN (o ARN que se transcribe de forma inversa en un ADNc) y 2) una transposasa, recombinasa u otra enzima integrasa que reconoce tanto el vector como una secuencia diana de ADN e inserta el vector en la secuencia de ADN diana. Los vectores contienen con mayor frecuencia uno o más casetes de expresión que comprenden una o más secuencias de control de expresión, en donde una secuencia de control de la expresión es una secuencia de ADN que controla y regula la transcripción y/o traducción de otra secuencia de ADN o ARNm, respectivamente.

50 Se conocen muchos tipos diferentes de vectores. Por ejemplo, se conocen vectores plasmídicos y víricos, por ejemplo, vectores retrovíricos. Los plásmidos de expresión en mamíferos normalmente tienen un origen de replicación, un promotor adecuado y un potenciador opcional, sitios de unión al ribosoma necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios donadores y aceptores de corte y empalme, secuencias de terminación transcripcional y secuencias no transcritas flanqueantes en 5'. Los ejemplos de vectores incluyen: plásmidos (que también pueden ser portadores de otro tipo de vector), adenovirus, virus adenoasociado (AAV), lentivirus (por ejemplo, VIH-1 modificado, SIV o FIV), retrovirus (por ejemplo, ASV, ALV o MoMLV) y transposones (por ejemplo, Sleeping Beauty, elementos P, Tol-2, Frog Prince, piggyBac).

55 Como se usa en el presente documento, la expresión ácido nucleico se refiere tanto al ARN como al ADN, incluyendo, por ejemplo, ADNc, ADN genómico, ADN sintético (por ejemplo, sintetizado químicamente), así como ácidos nucleicos de origen natural y modificados químicamente, por ejemplo, bases sintéticas o cadenas principales alternativas. Una molécula de ácido nucleico puede ser bicatenaria o monocatenaria (es decir, una cadena monocatenaria sentido o antisentido).

Animales fundadores, estirpes de animales, rasgos y reproducción

65 Los animales fundadores se pueden producir mediante clonación y otros métodos descritos en el presente documento. Los fundadores pueden ser homocigóticos para una modificación genética, como en el caso en que un cigoto o una célula primaria sufre una modificación homocigótica. De forma similar, también se pueden generar

fundadores que sean heterocigóticos. En el caso de los animales que comprenden al menos una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD 163, los fundadores son preferentemente heterocigóticos. Los fundadores pueden estar modificados genómicamente, lo que significa que todas las células de su genoma han sufrido modificaciones. Los fundadores pueden ser mosaicos para una modificación, como puede suceder cuando se introducen vectores en una de una pluralidad de células en un embrión, normalmente en una fase de blastocisto. La progenie de animales de mosaico puede someterse a ensayos para identificar progenie que esté modificada genómicamente. Se establece una estirpe animal cuando se ha creado un grupo de animales que pueden reproducirse sexualmente o mediante técnicas de reproducción asistida, con progenie heterogénea u homocigótica que expresa consistentemente la modificación.

En ganadería, se sabe que muchos alelos están relacionados con diversos rasgos, tales como rasgos de producción, rasgos de tipo, rasgos de trabajabilidad y otros rasgos funcionales. Los artesanos están acostumbrados a controlar y cuantificar estos rasgos, por ejemplo, Visscher *et al.*, *Livestock Production Science*, 40 (1994) 123-137, Pat. de los EE.UU. N.º 7.709.206, documento US 2001/0016315, documento US 2011/0023140 y documento US 2005/0153317. Una estirpe animal puede incluir un rasgo elegido entre un rasgo del grupo que consiste en un rasgo de producción, un rasgo de tipo, un rasgo de trabajabilidad, un rasgo de fertilidad, un rasgo maternal y un rasgo de resistencia a enfermedades. Otros rasgos incluyen la expresión de un producto génico recombinante.

Los animales con un rasgo o rasgos deseados pueden modificarse para impedir su maduración sexual. Puesto que los animales son estériles hasta que maduran, es posible regular la madurez sexual como medio para controlar la diseminación de los animales. Los animales que han sido criados o modificados para que tengan uno o más rasgos pueden proporcionarse de este modo a los receptores con un riesgo reducido de que los receptores críen los animales y se apropien del valor de los rasgos para sí mismos. Por ejemplo, el genoma de un animal puede modificarse genéticamente, en donde la modificación comprende la inactivación de un gen de maduración sexual, en donde el gen de maduración sexual en un animal de tipo silvestre expresa un factor selectivo para la maduración sexual. El animal puede tratarse administrando un compuesto para remediar una deficiencia provocada por la pérdida de expresión del gen para inducir la maduración sexual en el animal.

La reproducción de animales que requieren la administración de un compuesto para inducir la madurez sexual puede realizarse ventajosamente en una instalación de tratamiento. La instalación de tratamiento puede implementar protocolos normalizados en ganado bien controlado para producir eficientemente animales uniformes. La progenie animal puede distribuirse a una pluralidad de ubicaciones para ser criados. Las granjas y los agricultores (un término que incluye un rancho y ganaderos) pueden encargar de este modo un número deseado de progenie con un intervalo específico de edades y/o pesos y/o rasgos y hacer que se suministren en el momento y/o lugar deseados. Los receptores, por ejemplo, agricultores, después podrán criar los animales y suministrarlos al mercado como deseen.

Se puede suministrar un animal de ganado modificado genéticamente que tenga un gen de maduración sexual inactivado (por ejemplo, a una o más ubicaciones, a una pluralidad de granjas). Los animales pueden tener una edad de entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 180 días. El animal puede tener uno o más rasgos (por ejemplo uno que exprese un rasgo deseado o un rasgo de alto valor o un rasgo novedoso o un rasgo recombinante).

Métodos de reproducción y métodos para aumentar la resistencia de un animal a las infecciones y poblaciones de animales

En el presente documento se describe un método de reproducción para crear animales o linajes que tienen una susceptibilidad reducida a la infección por un patógeno. El método comprende modificar genéticamente un ovocito o un espermatozoide para introducir una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD 163 en al menos uno de entre el ovocito y el espermatozoide, y fertilizar el ovocito con el espermatozoide para crear un óvulo fertilizado que contiene la secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163. Como alternativa, el método comprende modificar genéticamente un óvulo fertilizado para introducir una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163 en el óvulo fertilizado. El método comprende además transferir el óvulo fertilizado a un animal hembra sustituto, en donde la gestación y el parto a término producen un animal de progenie; cribar dicho animal de progenie en busca de susceptibilidad al patógeno; y seleccionar animales de progenie que tienen una susceptibilidad reducida al patógeno en comparación con animales que no comprenden una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163.

Se describe otro método de reproducción para crear animales o linajes que tienen susceptibilidad reducida a la infección por un patógeno. El método comprende modificar genéticamente un ovocito o un espermatozoide para introducir una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD 163 en al menos uno de entre el ovocito y el espermatozoide, y fertilizar el ovocito con el espermatozoide para crear un óvulo fertilizado que contiene la secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163. Como alternativa, el método comprende modificar genéticamente un óvulo fertilizado para introducir una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163 en el óvulo fertilizado. El método comprende además transferir el óvulo fertilizado a un animal hembra sustituto, en donde la gestación y el parto a término producen un animal de progenie; cribar dicho animal de progenie en busca de susceptibilidad al patógeno; y seleccionar animales

de progenie que tienen una susceptibilidad reducida al patógeno en comparación con animales que no comprenden una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163. La secuencia cromosómica modificada da como resultado la producción sustancialmente nula de proteína CD163 funcional por parte del animal de progenie.

Se describe otro método más de reproducción para crear animales o linajes que tienen susceptibilidad reducida a la infección por un patógeno. El método comprende modificar genéticamente un ovocito o un espermatozoide para introducir una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD 163 en al menos uno de entre el ovocito y el espermatozoide, y fertilizar el ovocito con el espermatozoide para crear un óvulo fertilizado que contiene la secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163. Como alternativa, el método comprende modificar genéticamente un óvulo fertilizado para introducir una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163 en el óvulo fertilizado. El método comprende además transferir el óvulo fertilizado a un animal hembra sustituto, en donde la gestación y el parto a término producen un animal de progenie; cribar dicho animal de progenie en busca de susceptibilidad al patógeno; y seleccionar animales de progenie que tienen una susceptibilidad reducida al patógeno en comparación con animales que no comprenden una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163. La secuencia cromosómica modificada comprende una supresión en fase en el gen que codifica la proteína CD163.

El agente patógeno comprende preferentemente un virus, por ejemplo, PRRSV.

Por ejemplo, la modificación puede reducir la susceptibilidad a un virus PRRSV de Tipo 1, un PRRSV de Tipo 2 o a virus PRRSV tanto de Tipo 1 como de Tipo 2.

La modificación puede reducir la susceptibilidad a un aislado de PRRSV seleccionado del grupo que consiste en NVSL 97-7895, KS06-72109, P129, VR2332, CO90, AZ25, MLV-ResPRRS, KS62-06274, KS483 (SD23983), CO84, SD13-15, Lelystad, 03-1059, 03-1060, SD01-08, 4353PZ, y combinaciones de los mismos.

El animal puede ser un embrión, un animal juvenil o un adulto.

El animal puede ser un animal doméstico. El animal domesticado puede ser un animal de ganado, por ejemplo, un animal porcino, un animal bovino (por ejemplo, ganado vacuno o ganado lechero), un animal ovino, un animal caprino, un animal equino (por ejemplo, un caballo o un burro), búfalos, camellos o un animal aviar (por ejemplo, un pollo, un pavo, pato, ganso, una gallina de guinea o un pichón). El animal de ganado es preferentemente un animal bovino o porcino, y mucho más preferentemente es un animal porcino.

La etapa de modificar genéticamente el ovocito, el espermatozoide o el óvulo fecundado puede comprender la edición genética del ovocito, espermatozoide u óvulo fecundado. La edición genética puede comprender el uso de una endonucleasa de asentamiento. La endonucleasa de asentamiento puede ser una endonucleasa de origen natural, pero preferentemente es una endonucleasa de asentamiento de origen no natural diseñada racionalmente que tiene una secuencia de reconocimiento de ADN que se ha diseñado para que la endonucleasa se dirija a una secuencia cromosómica en un gen que codifica una proteína CD163. Por lo tanto, la endonucleasa de asentamiento puede ser una endonucleasa de asentamiento diseñada. La endonucleasa de asentamiento puede comprender, por ejemplo, un sistema de Grupos de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares (CRISPR) /Cas9, una Nucleasa efectora similar a activadores de la transcripción (TALEN), una Nucleasa de dedos de cinc (ZFN), una proteína de fusión de recombinasa, una meganucleasa o una combinación de los mismos). La edición genética comprende preferentemente el uso de un sistema CRISPR/Cas9.

El ovocito, el espermatozoide o el óvulo fecundado pueden ser heterocigóticos para la secuencia cromosómica modificada. Como alternativa, el ovocito, el espermatozoide o el óvulo fecundado pueden ser homocigóticos para la secuencia cromosómica modificada.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender una inserción en el gen que codifica la proteína CD 163, una supresión en el gen que codifica la proteína CD 163 o una combinación de las mismas. Por ejemplo, la secuencia cromosómica modificada comprende una supresión en el gen que codifica la proteína CD163 (por ejemplo, una supresión en fase). Como alternativa, la secuencia cromosómica modificada puede comprender una inserción en el gen que codifica la proteína CD163.

La inserción o supresión puede provocar que se reduzca la producción o actividad de la proteína CD163, en comparación con la producción o actividad de la proteína CD163 en un animal que carece de la inserción o supresión.

La inserción o supresión puede dar como resultado la producción sustancialmente nula de proteína CD163 funcional por parte del animal. Por "proteína CD163 funcional prácticamente nula", se entiende que el nivel de proteína CD163 en el animal, descendencia o célula es indetectable, o si es detectable, es al menos un 90 % inferior al nivel observado en un animal, descendencia o célula que no comprende la inserción o supresión.

Quando el animal es un animal porcino, la secuencia cromosómica modificada puede comprender una modificación en el exón 7 del gen que codifica la proteína CD 163, el exón 8 del gen que codifica la proteína CD163, un intrón que es contiguo al exón 7 o al exón 8 del gen que codifica la proteína CD163, o una combinación de los mismos. La secuencia cromosómica modificada comprende adecuadamente una modificación en el exón 7 del gen que codifica la proteína CD 163.

La modificación en el exón 7 del gen que codifica la proteína CD 163 puede comprender una supresión (por ejemplo, una supresión en fase en el exón 7). Como alternativa, la modificación en el exón 7 del gen que codifica la proteína CD163 puede comprender una inserción.

Quando el animal es un animal porcino, la secuencia cromosómica modificada puede comprender: (a) SEQ ID NO: 118; o (b) una modificación seleccionada del grupo que consiste en: una supresión de 11 pares de bases del nucleótido 3.137 al nucleótido 3.147 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una inserción de 2 pares de bases entre los nucleótidos 3.149 y 3.150 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, con una supresión de 377 pares de bases del nucleótido 2.573 al nucleótido 2.949 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el mismo alelo; una supresión de 124 pares de bases del nucleótido 3.024 al nucleótido 3.147 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 123 pares de bases del nucleótido 3.024 al nucleótido 3.146 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una inserción de 1 par de bases entre los nucleótidos 3.147 y 3.148 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 130 pares de bases del nucleótido 3.030 al nucleótido 3.159 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 132 pares de bases del nucleótido 3.030 al nucleótido 3.161 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1506 pares de bases del nucleótido 1.525 al nucleótido 3.030 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una inserción de 7 pares de bases entre el nucleótido 3.148 y el nucleótido 3.149 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1280 pares de bases del nucleótido 2.818 al nucleótido 4.097 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1373 pares de bases del nucleótido 2.724 al nucleótido 4.096 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1467 pares de bases del nucleótido 2.431 al nucleótido 3.897 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1930 pares de bases del nucleótido 488 al nucleótido 2.417 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 12 pares de bases que comienza en el nucleótido 488, y en donde hay una supresión adicional de 129 pares de bases en el exón 7 del nucleótido 3.044 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 28 pares de bases del nucleótido 3.145 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1387 pares de bases del nucleótido 3.145 al nucleótido 4.531 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1382 pares de bases del nucleótido 3.113 al nucleótido 4.494 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 11 pares de bases que comienza en el nucleótido 3.113; una supresión de 1720 pares de bases del nucleótido 2.440 al nucleótido 4.160 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 452 pares de bases del nucleótido 3.015 al nucleótido 3.466 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; o combinaciones de las mismas.

Quando el animal porcino comprende la inserción de 2 pares de bases entre los nucleótidos 3.149 y 3.150 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, la inserción de 2 pares de bases puede comprender la inserción del dinucleótido AG.

Quando el animal porcino comprende la inserción de 1 pares de bases entre los nucleótidos 3.147 y 3.148 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, la inserción de 1 par de bases puede comprender la inserción de un único resto adenina.

Quando el animal porcino comprende la inserción de 7 pares de bases entre el nucleótido 3.148 y el nucleótido 3.149 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, la inserción de 7 pares de bases puede comprender la secuencia TACTACT (SEQ ID NO: 115).

Quando el animal porcino comprende la supresión de 1930 pares de bases del nucleótido 488 al nucleótido 2.417 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 12 pares de bases que comienza en el nucleótido 488, y en donde hay una supresión adicional de 129 pares de bases en el exón 7 del nucleótido 3.044 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, la inserción de 12 pares de bases puede comprender la secuencia TGTGGAGAATTC (SEQ ID NO: 116).

Quando el animal porcino comprende la supresión de 1382 pares de bases del nucleótido 3.113 al nucleótido 4.494 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 11 pares de bases que comienza en el nucleótido 3.113, la inserción de 11 pares de bases puede comprender la secuencia AGCCAGCGTGC (SEQ ID NO: 117).

Quando la secuencia cromosómica modificada en el gen que codifica la proteína CD163 comprende una supresión,

la supresión comprende preferentemente una supresión en fase. En consecuencia, cuando el animal es un animal porcino, la inserción o supresión en el gen que codifica la proteína CD163 puede comprender una supresión en fase en el exón 7 seleccionado del grupo que consiste en la supresión de 1506 pares de bases del nucleótido 1.525 al nucleótido 3.030 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; la supresión de 1930 pares de bases del nucleótido 488 al nucleótido 2.417 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 12 pares de bases que comienza en el nucleótido 488, y en donde hay una supresión adicional de 129 pares de bases en el exón 7 del nucleótido 3.044 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; la supresión de 1373 pares de bases del nucleótido 2.724 al nucleótido 4.096 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; la supresión de 123 pares de bases del nucleótido 3.024 al nucleótido 3.146 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; la supresión de 1467 pares de bases del nucleótido 2.431 al nucleótido 3.897 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; la supresión de 1387 pares de bases del nucleótido 3.145 al nucleótido 4.531 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; la supresión de 1382 pares de bases del nucleótido 3.113 al nucleótido 4.494 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 11 pares de bases que comienza en el nucleótido 3.113; una supresión de 1720 pares de bases del nucleótido 2.440 al nucleótido 4.160 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; y combinaciones de los mismos.

Cuando el animal es un animal porcino, la inserción o supresión se puede seleccionar del grupo que consiste en: la inserción de 2 pares de bases entre los nucleótidos 3.149 y 3.150 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, con la supresión de 377 pares de bases del nucleótido 2.573 al nucleótido 2.949 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el mismo alelo; la supresión de 28 pares de bases del nucleótido 3.145 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; la supresión de 452 pares de bases del nucleótido 3.015 al nucleótido 3.466 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; y combinaciones de los mismos.

Por ejemplo, la secuencia cromosómica modificada puede comprender la inserción de 2 pares de bases entre los nucleótidos 3.149 y 3.150 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, con la supresión de 377 pares de bases del nucleótido 2.573 al nucleótido 2.949 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el mismo alelo.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender la supresión de 28 pares de bases del nucleótido 3.145 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender la supresión de 452 pares de bases del nucleótido 3.015 al nucleótido 3.466 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender cualquier combinación de cualquiera de las secuencias cromosómicas modificadas descritas en el presente documento.

Por ejemplo, la secuencia cromosómica modificada puede comprender la inserción de 7 pares de bases entre el nucleótido 3.148 y el nucleótido 3.149 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en un alelo del gen que codifica la proteína CD163; y la supresión de 11 pares de bases del nucleótido 3.137 al nucleótido 3.147 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD 163.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender la inserción de 7 pares de bases entre el nucleótido 3.148 y el nucleótido 3.149 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en un alelo del gen que codifica la proteína CD163; y la supresión de 1382 pares de bases del nucleótido 3.113 al nucleótido 4.494 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 11 pares de bases que comienza en el nucleótido 3.113 en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD163.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender la SEQ ID NO: 118 en un alelo del gen que codifica la proteína CD163; y la supresión de 11 pares de bases del nucleótido 3.137 al nucleótido 3.147 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD 163.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender la SEQ ID NO: 118 en un alelo del gen que codifica la proteína CD 163; y la inserción de 2 pares de bases entre los nucleótidos 3.149 y 3.150 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, con la supresión de 377 pares de bases del nucleótido 2.573 al nucleótido 2.949 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD 163.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender la supresión de 1280 pares de bases del nucleótido 2.818 al nucleótido 4.097 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en un alelo del gen que codifica la proteína CD 163; y la supresión de 11 pares de bases del nucleótido 3.137 al nucleótido 3.147 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD 163.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender la supresión de 1280 pares de bases del nucleótido 2.818 al nucleótido 4.097 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en un alelo del gen que codifica la proteína CD163; y la inserción de 2 pares de bases entre los nucleótidos 3.149 y 3.150 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, con la supresión de 377 pares de bases del nucleótido 2.573 al nucleótido 2.949 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD 163.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender la supresión de 1930 pares de bases del nucleótido 488 al nucleótido 2.417 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 12 pares de bases que comienza en el nucleótido 488, y en donde hay una supresión adicional de 129 pares de bases en el exón 7 del nucleótido 3.044 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en un alelo del gen que codifica la proteína CD163; y la inserción de 2 pares de bases entre los nucleótidos 3.149 y 3.150 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, con la supresión de 377 pares de bases del nucleótido 2.573 al nucleótido 2.949 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD 163.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender la SEQ ID NO: 118 en un alelo del gen que codifica la proteína CD163; y la supresión de 1930 pares de bases del nucleótido 488 al nucleótido 2.417 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 12 pares de bases que comienza en el nucleótido 488, y en donde hay una supresión adicional de 129 pares de bases en el exón 7 del nucleótido 3.044 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD163.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender la supresión de 1930 pares de bases del nucleótido 488 al nucleótido 2.417 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 12 pares de bases que comienza en el nucleótido 488, y en donde hay una supresión adicional de 129 pares de bases en el exón 7 del nucleótido 3.044 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en un alelo del gen que codifica la proteína CD163; y la supresión de 11 pares de bases del nucleótido 3.137 al nucleótido 3.147 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD163.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender la supresión de 1467 pares de bases del nucleótido 2.431 al nucleótido 3.897 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en un alelo del gen que codifica la proteína CD163; y la inserción de 2 pares de bases entre los nucleótidos 3.149 y 3.150 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, con la supresión de 377 pares de bases del nucleótido 2.573 al nucleótido 2.949 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD 163.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender la supresión de 1467 pares de bases del nucleótido 2.431 al nucleótido 3.897 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en un alelo del gen que codifica la proteína CD 163; y la supresión de 11 pares de bases del nucleótido 3.137 al nucleótido 3.147 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD 163.

La secuencia cromosómica modificada que comprende cualquiera de las inserciones o supresiones descritas anteriormente puede comprender una secuencia cromosómica que tiene un alto grado de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 47 fuera de la inserción o supresión. Por lo tanto, por ejemplo, el ovocito, el espermatozoide o el óvulo fecundado pueden comprender una secuencia cromosómica que tiene al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,9 % o un 100 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 47 en las regiones de la secuencia cromosómica fuera de la inserción o supresión.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender una secuencia cromosómica que comprende la SEQ ID NO: 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 118 o 119. Como se describe adicionalmente en los Ejemplos a continuación en el presente documento, SEQ ID NO: 98-114 y 119 proporcionan secuencias de nucleótidos para una región correspondiente a la región de CD163 porcino de tipo silvestre proporcionada en SEQ ID NO: 47, e incluyen las inserciones o supresiones en la secuencia cromosómica de CD163 porcino que se describen en el presente documento. La SEQ ID NO: 118 proporciona la secuencia para una región correspondiente a la región del CD 163 porcino de tipo silvestre proporcionada por la SEQ ID NO: 47, en donde el exón 7 se ha reemplazado con un exón sintetizado que codifica un homólogo de SRCR 8 de la proteína humana similar a CD163 1 (hCD163L1).

Por ejemplo, la secuencia cromosómica modificada puede comprender una secuencia cromosómica que comprende la SEQ ID NO: 98, 101, 105, 109, 110, 112, 113 o 114. Las SEQ ID NO: 98, 101, 105, 109, 110, 112, 113 o 114 proporcionan las secuencias de nucleótidos para las supresiones en fase en el exón 7 de la secuencia cromosómica de CD163 porcino.

Como otro ejemplo, la secuencia cromosómica modificada puede comprender una secuencia cromosómica que comprende la SEQ ID NO: 103, 111 o 119.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender la supresión de 11 pares de bases en un alelo del gen que codifica la proteína CD163 y la inserción de 2 pares de bases con la supresión de 377 pares de bases en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD163.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender la supresión de 124 pares de bases en un alelo del gen que codifica la proteína CD163 y la supresión de 123 pares de bases en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD163.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender la inserción de 1 par de bases.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender la supresión de 130 pares de bases en un alelo del gen que codifica la proteína CD163 y la supresión de 132 pares de bases en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD163.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender la supresión de 1506 pares de bases.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender la inserción de 7 par de bases.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender la supresión de 1280 pares de bases en un alelo del gen que codifica la proteína CD163 y la supresión de 1373 pares de bases en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD163.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender la supresión de 1467 pares de bases.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender la supresión del intrón 6 de 1930 pares de bases del nucleótido 488 al nucleótido 2.417, con una inserción de 12 pares de bases en el nucleótido 4.488 y una supresión adicional de 129 pares de bases en el exón 7.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender la supresión de 28 pares de bases en un alelo del gen que codifica la proteína CD163 y la supresión de 1387 pares de bases en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD163.

La secuencia cromosómica modificada puede comprender la supresión de 1382 pares de bases con la inserción de 11 pares de bases en un alelo del gen que codifica la proteína CD163 y la supresión de 1720 pares de bases en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD163.

En cualquiera de los métodos de reproducción, el animal seleccionado puede usarse como animal fundador.

En cualquiera de los métodos de reproducción la fecundación puede comprender inseminación artificial.

También se proporciona una población de animales obtenida mediante cualquiera de los métodos de reproducción. La población de animales es preferentemente resistente a la infección por un patógeno, por ejemplo, un virus tal como el PRRSV. Por ejemplo, la población puede ser resistente a la infección por un virus PRRSV de Tipo 1, un PRRSV de Tipo 2 o a virus PRRSV tanto de Tipo 1 como de Tipo 2. La población puede ser resistente a la infección por un aislado de PRRSV seleccionado del grupo que consiste en NVSL 97-7895, KS06-72109, P129, VR2332, CO90, AZ25, MLV-ResPRRS, KS62-06274, KS483 (SD23983), CO84, SD13-15, Lelystad, 03-1059, 03-1060, SD01-08, 4353PZ, y combinaciones de los mismos.

También se describe un método para aumentar la resistencia de un animal de ganado a la infección con un patógeno. El método comprende editar genéticamente al menos una secuencia cromosómica de un gen que codifica una proteína CD163 de manera que se reduzca la producción o actividad de la proteína CD163, en comparación con la producción o actividad de la proteína CD63 en un animal de ganado que no comprende una secuencia cromosómica editada en un gen que codifica una proteína CD163. El patógeno comprende preferentemente un virus (por ejemplo, PRRSV).

Se describe otro método para aumentar la resistencia de un animal de ganado a la infección con un patógeno. El método comprende editar genéticamente al menos una secuencia cromosómica de un gen que codifica una proteína CD 163 de manera que el animal de ganado produzca proteína CD163 funcional sustancialmente nula.

Se describe otro método más para aumentar la resistencia de un animal de ganado a la infección con un patógeno. El método comprende editar genéticamente al menos una secuencia cromosómica de un gen que codifica una proteína CD163 para introducir una supresión en fase, en donde la producción o actividad de la proteína CD163 se reduce en el animal de ganado, en comparación con la producción o actividad de la proteína CD63 en un animal de

ganado que no comprende una secuencia cromosómica editada en un gen que codifica una proteína CD163. La supresión en fase puede ser, por ejemplo, cualquiera de las supresiones en fase descritas en el presente documento.

5 Ácidos nucleicos

Se describen ácidos nucleicos. La molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 47; (b) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 47, en donde dicha secuencia de nucleótidos contiene al menos una sustitución, inserción o supresión con respecto a la SEQ ID NO: 47; y (c) una secuencia de ADNc de (a) o (b).

Como alternativa, la molécula de ácido nucleico puede comprender (a) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 87,5 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 47, en donde dicha secuencia de nucleótidos contiene al menos una sustitución, inserción o supresión con respecto a la SEQ ID NO: 47; y (b) una secuencia de ADNc de (a).

Cualquiera de las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento puede ser moléculas de ácido nucleico aisladas.

Por ejemplo, el ácido nucleico aislado puede comprender una secuencia de nucleótidos que comprende la SEQ ID NO: 47.

Como alternativa, la molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 47, en donde dicha secuencia de nucleótidos contiene al menos una sustitución, inserción o supresión con respecto a la SEQ ID NO: 47. El ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o al menos un 99,9 %, de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 47, en donde dicha secuencia de nucleótidos contiene al menos una sustitución, inserción o supresión con respecto a la SEQ ID NO: 47.

Preferentemente, la molécula de ácido nucleico tiene al menos un 87,5 % de identidad de secuencia con la secuencia de la SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia de nucleótidos contiene al menos una sustitución, inserción o supresión con respecto a la SEQ ID NO: 47.

La sustitución, inserción o supresión preferentemente reduce o elimina la producción o actividad de la proteína CD163, en comparación con un ácido nucleico que no comprende la sustitución, inserción o supresión.

El ácido nucleico puede comprender la SEQ ID NO: 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 118 o 119.

Por ejemplo, el ácido nucleico puede comprender la SEQ ID NO: 98, 101, 105, 109, 110, 112, 113 o 114.

Por ejemplo, el ácido nucleico puede comprender la SEQ ID NO: 103, 111 o 119.

El ácido nucleico puede comprender el ADNc.

Se proporcionan ácidos nucleicos adicionales. El ácido nucleico puede comprender la SEQ ID NO: 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 118 o 119. Por ejemplo, el ácido nucleico puede comprender la SEQ ID NO: 98, 101, 105, 109, 110, 112, 113 o 114. Como otro ejemplo, el ácido nucleico puede comprender la SEQ ID NO: 103, 111 o 119.

El alcance de la invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

55 Ejemplos

Los siguientes ejemplos no limitantes se proporcionan para ilustrar adicionalmente la presente invención.

Ejemplo 1: Uso del sistema CRISPR/Cas9 para producir cerdos modificados por ingeniería genética a partir de ovocitos y embriones derivados *In Vitro*

Informes recientes que describen endonucleasas de asentamiento, tales como las nucleasas de dedos de cinc (ZFN), las nucleasas efectoras similares a activadores de la transcripción (TALEN) y los componentes del sistema de grupo de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares (CRISPR)/asociado a CRISPR (Cas9) sugieren que la ingeniería genética (IG) en cerdos podría ahora ser más eficiente. Las endonucleasas de asentamiento pueden inducir roturas bicatenarias (DSB) en ubicaciones específicas del genoma y provocar mutaciones aleatorias

mediante la unión de extremos no homólogos (UENH) o la estimulación de la recombinación homóloga (RH) si se proporciona ADN donante. La modificación dirigida del genoma a través de RH se puede conseguir con endonucleasas de asentamiento si se proporciona ADN donante junto con la nucleasa dirigida. Después de introducir modificaciones específicas en las células somáticas, estas células se usaron para producir cerdos de IG para diversos fines a través de TNCS. Por lo tanto, las endonucleasas de asentamiento son una herramienta útil para generar cerdos de IG. Entre las diferentes endonucleasas de asentamiento, el sistema CRISPR/Cas9, adaptado de procariotas donde se usa como mecanismo de defensa, parece ser un enfoque eficaz. En la naturaleza, el sistema Cas9 requiere tres componentes, un ARN (~20 bases) que contiene una región que es complementaria a la secuencia diana (ARN cis-reprimido [ARNcr]), un ARN que contiene una región que es complementaria al ARNcr (ARNcr trans-activador [ARNtracr]) y Cas9, el componente proteico enzimático de este complejo. Se puede construir un ARN guía único (ARNg) para que cumpla las funciones del ARNcr y el ARNtracr de bases apareadas. El complejo ARNg/proteína puede barrer el genoma y catalizar una DSB en regiones que son complementarias al ARNcr/ARNg. A diferencia de otras nucleasas diseñadas, sólo es necesario diseñar un oligómero corto para construir los reactivos necesarios para dirigirse a un gen de interés, mientras que son necesarias una serie de etapas de clonación para ensamblar ZFN y TALEN.

A diferencia de los métodos convencionales actuales para la alteración genética, el uso de nucleasas diseñadas ofrece la oportunidad de usar cigotos como material de partida para IG. Los métodos convencionales para la alteración génica en el ganado implican la RH en células cultivadas y la posterior reconstrucción de embriones mediante transferencia nuclear de células somáticas (TNCS). Debido a que los animales clonados producidos mediante TNCS en ocasiones muestran signos de defectos de desarrollo, la progenie de los fundadores de TNCS/IG normalmente se usa para la investigación para evitar confundir las anomalías de TNCS y el fenotipo que podrían ocurrir si los animales fundadores se usan para experimentos. Teniendo en cuenta el período de gestación más largo y los mayores costes de alojamiento de los cerdos en comparación con los roedores, la reducción de la necesidad de reproducción conlleva beneficios de tiempo y costos. Un informe reciente demostró que la inyección directa de ZFN y TALEN en cigotos porcinos podría alterar un gen endógeno y producir lechones con las mutaciones deseadas. Sin embargo, sólo aproximadamente el 10 % de los lechones mostraron modificación bialélica del gen diana y algunos presentaron genotipos en mosaico. Un artículo reciente demostró que el sistema CRISPR/Cas9 podría inducir mutaciones en embriones en desarrollo y producir cerdos de IG con mayor eficiencia que las ZFN o TALEN. Sin embargo, Los cerdos de IG producidos a partir del sistema CRISPR/Cas9 también poseían genotipos en mosaico. Además, todos los estudios mencionados anteriormente utilizaron cigotos derivados *in vivo* para los experimentos, los que requieren mucha mano de obra y numerosas cerdas para obtener un número suficiente de cigotos.

El presente ejemplo describe un enfoque eficiente para usar el sistema CRISPR/Cas9 en la generación de cerdos de IG mediante inyección de cigotos derivados *in vitro* y modificación de células somáticas seguida de TNCS. Se usaron como diana dos genes endógenos (CD163 y CD1D) y un transgén (eGFP), y sólo se usaron ovocitos o cigotos derivados *in vitro* para inyecciones de TNCS o ARN, respectivamente. CD163 parece ser necesario para la infección productiva por el virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, un virus que se sabe que provoca una pérdida económica significativa a la industria porcina. CD1D se considera una proteína del complejo mayor de histocompatibilidad no clásica y participa en la presentación de antígenos lipídicos a los linfocitos T citolíticos naturales invariantes. Los cerdos con deficiencia de estos genes se diseñaron para ser modelos para la agricultura y la biomedicina. El transgén eGFP se usó como diana para experimentos preliminares de prueba de concepto y optimizaciones de métodos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Productos químicos y reactivos. A menos que se indique otra cosa, todos los productos químicos utilizados en este estudio se adquirieron en Sigma.

Diseño de ARNg para construir CRISPR específicos

Los ARN guía se diseñaron para regiones dentro del exón 7 de *CD163* que eran exclusivas del *CD163* de tipo silvestre y no están presentes en el vector de direccionamiento de intercambio de dominio (que se describe a continuación), para que CRISPR de como resultado DSB dentro del *CD163* de tipo silvestre, pero no en el vector de direccionamiento de intercambio de dominio. Sólo había cuatro ubicaciones en las que el vector de direccionamiento introduciría un polimorfismo de nucleótido único (SNP, por sus siglas en inglés) que alteraría un motivo adyacente al protoespaciador (PAM) de *S. pyogenes* (*Spy*). Se seleccionaron las cuatro dianas, incluyendo:

(SEQ ID NO: 1) GGAAACCCAGGCTGGTTGGA_gGG (CRISPR 10),
 (SEQ ID NO: 2) GGAAC_TACAGTGCGGCACTGtGG (CRISPR 13 1),
 (SEQ ID NO: 3) CAGTAGCACCCCGCCCTGACgGG (CRISPR 256) y
 (SEQ ID NO: 4) TGTAGCCACAGCAGGGACGTcGG (CRISPR 282). El PAM se puede identificar por la fuente en negrita en cada ARNg.

Para mutaciones de *CD1D*, la búsqueda de dianas de CRISPR se limitó arbitrariamente a la cadena codificante

dentro de los primeros 1000 pb del transcrito primario. Sin embargo, RepeatMasker [26] (biblioteca de repetición "Cerdo") identificó un elemento repetitivo que comienza en la base 943 del transcrito primario. Después, la búsqueda de dianas de CRISPR se limitó a los primeros 942 pb del transcrito primario. La búsqueda se limitó aún más a los primeros 873 pb del transcrito primario puesto que el último PAM *Spy* está ubicado en la base 873. Se seleccionó la primera diana (CRISPR 4800) porque se superponía con el codón de inicio ubicado en la base 42 en el transcrito primario (CCAGCCTCGCCCAGCGACATgGG (SEQ ID NO: 5)). Se seleccionaron dos dianas adicionales (CRISPR 5620 y 5626) porque eran las más distales a la primera selección dentro de la región seleccionada arbitrariamente (CTTTCATTTATCTGAACTCAGGG (SEQ ID NO: 6) y TTATCTGAACTCAGGGTCCCcGG (SEQ ID NO: 7)). Estas dianas se superponen. Con respecto al codón de inicio, los PAM *Spy* más proximales estaban ubicados en una secuencia simple que contenía una secuencia ampliamente homopolimérica según lo determinado mediante evaluación visual. Se seleccionó la cuarta diana (CRISPR 5350) porque, con respecto a la primera selección de dianas, era la diana más proximal que no contenía regiones homopoliméricas extensas (CAGCTGCAGCATATATTTAAgGG (SEQ ID NO: 8)). La especificidad de los ARNcr diseñados se confirmó mediante la búsqueda de secuencias porcinas similares en GenBank. Los oligonucleótidos (Tabla 1) se hibridaron y clonaron en el vector p330X que contenía dos casetes de expresión, un Cas9 de *S. pyogenes* optimizado con codones humanos (*hSpy*) y el ARN guía quimérico. P330X se digirió con *BbsI* (New England Biolabs) siguiendo el protocolo del laboratorio Zhang (<http://www.addgene.org/crispr/zhang/>).

Para dirigirse a *eGFP*, se diseñaron dos ARNg específicos dirigidos a la secuencia codificante de *eGFP* dentro de los primeros 60 pb del codón de inicio de *eGFP*. Ambos ARNg de *eGFP1* y *eGFP2* estaban en la cadena antisentido y *eGFP1* se dirigió directamente al codón de inicio. La secuencia de ARNg de *eGFP1* fue CTCCTCGCCCTTGCTCACCATGG (SEQ ID NO:9) y la secuencia de ARNg de *eGFP2* fue GACCAGGATGGGCACCACCCcGG (SEQ ID NO: 10).

Tabla 1. ARNcr diseñados. Los cebadores 1 y 2 se hibridaron siguiendo el protocolo Zhang.

Cebador	Secuencia (5' - 3')	SEQ ID NO.
CD163 10 1	CACCGGAAACCCAGGCTGGTTGGA	48
CD163 10 2	AAACTCCAACCAGCCTGGGTTTCC	49
CD163 131 1	CACCGGAACTACAGTGCGGCACTG	50
CD163 131 2	AAACCACTGCCGCACTGTAGTTCC	51
CD163 256 1	CACCGCAGTAGCACCCCGCCCTGAC	52
CD163 256 2	AAACGTCAGGGCGGGGTGCTACTGC	53
CD163 282 1	CACCGTGTAGCCACAGCAGGGACGT	54
CD163 282 2	AAACACGTCCCTGCTGTGGCTACAC	55
CD1D 4800 1	CACCGCCAGCCTCGCCCAGCGACAT	56
CD1D 4800 2	AAACATGTCGCTGGGCGAGGCTGGC	57
CD1D 5350 1	CACCGCAGCTGCAGCATATATTTAA	58
CD1D 5350 2	AAACTTAAATATATGCTGCAGCTGC	59
CD1D 5620 1	CACCGCTTTTCATTTATCTGAACTCA	60
CD1D 5620 2	AAACTGAGTTCAGATAAATGAAAGC	61
CD1D 5626 1	CACCGTTATCTGAACTCAGGGTCCC	62
CD1D 5626 2	AAACGGGACCCTGAGTTCAGATAAC	63
eGFP 1 1	CACCGCTCCTCGCCCTTGCTCACCA	64
eGFP 1 2	AAACTGGTGAGCAAGGGCGAGGAGC	65
eGFP 2 1	CACCGGACCAGGATGGGCACCACCC	66
eGFP 2 2	AAACGGGTGGTGCCCATCCTGGTCC	67

Síntesis de ADN donante para genes CD 163 y CD1D

Tanto CD163 como CD1D porcinos se amplificaron mediante PCR a partir de ADN aislado de fibroblastos fetales que se usarían para transfecciones posteriores para garantizar un emparejamiento isogénico entre el vector de direccionamiento y la estirpe celular transfectada. Brevemente, se usaron LA taq (Clontech) usando el cebador directo CTCTCCCTCACTCTAACCTACTT (SEQ ID NO: 11), y el cebador inverso TATTTCTCTCACATGGCCAGTC (SEQ ID NO: 12) para amplificar un fragmento de 9538 pb de CD 163. El fragmento fue una secuencia de ADN validada y utilizada para construir el vector de direccionamiento de intercambio de dominio (Fig. 1). Este vector incluía 33 mutaciones puntuales dentro del exón 7 para que codificase la misma secuencia de aminoácidos que el CD163L humano del exón 11. El exón de reemplazo tenía 315 pb. Además, el intrón posterior se reemplazó con un intrón B de miostatina modificado que albergaba un gen marcador seleccionable que podía eliminarse con Cre-recombinasa (Cre) y que previamente había demostrado un corte y empalme normal cuando albergaba el sitio loxP retenido (Wells, resultados no publicados). El brazo largo de la construcción tenía 3469 pb e incluía el exón DS de intercambio de dominio. El brazo corto tenía 1578 pb e incluía los exones 7 y 8 (Fig. 1, panel B). Este plásmido se usó para intentar reemplazar la región codificante del exón 7 en los primeros experimentos de transfección y permitió la selección de eventos de direccionamiento a través del marcador seleccionable (G418). Si se produjera un direccionamiento, el marcador podría suprimirse mediante Cre-recombinasa. Después se modificó el vector de direccionamiento a DS CD163 para su uso con estirpes celulares que ya contenían un gen SIGLEC1 interrumpido

con Neo que no podía suprimirse con Cre. En este vector de direccionamiento, el casete Neo, loxP y el intrón B de miostatina, se retiraron y sólo permaneció el exón DS con el brazo largo y corto de TS (Fig. 1, panel C).

La secuencia genómica para CD1D porcino se amplificó con LA taq usando el cebador directo CTCTCCCTCACTCTAACCTACTT (SEQ ID NO: 13) y el cebador inverso GACTGGCCATGTGAGAGAAATA (SEQ ID NO: 14), dando como resultado un fragmento de 8729 pb. El fragmento fue ADN secuenciado y utilizado para construir el vector de direccionamiento que se muestra en la Fig. 2. El casete Neo está bajo el control de un promotor de fosfoglicerol cinasa (PGK) y flanqueado por secuencias loxP, que se introdujeron para su selección. El brazo largo de la construcción tenía 4832 pb y el brazo corto tenía 3563 pb e incluía los exones 6 y 7. Si se produjo una RH exitosa, los exones 3, 4 y 5 se retirarían y se reemplazarían con el casete Neo. Si la reparación de la UENH se realizó incorrectamente, entonces el exón 3 se alteraría.

Recogida de fibroblastos fetales

Se recogió tejido fetal porcino el Día 35 de gestación para crear estirpes celulares. Se establecieron dos estirpes celulares de fibroblastos fetales masculinos y femeninos de tipo silvestre (TS) a partir de un gran cruce doméstico blanco. En estos estudios también se usaron fibroblastos fetales masculinos y femeninos que habían sido modificados previamente para contener un casete Neo (genética SIGLEC1-/-). Los fibroblastos fetales se recogieron como se describe con modificaciones menores; el tejido picado de cada feto se digirió en 20 ml de medio de digestión (medio Eagle modificado por Dulbecco [DMEM] que contiene L-glutamina y 1 g/l de D-glucosa [Cellgro] suplementado con 200 unidades/ml de collagenasa y 25 unidades Kunitz/ml de DNaseI) durante 5 h a 38,5 °C. Después de la digestión, las células de fibroblastos fetales se lavaron y cultivaron con DMEM, 15 % de suero bovino fetal (SFB) y 40 µg/ml de gentamicina. Después del cultivo durante la noche, las células se tripsinizaron y se congelaron a -80 °C en alícuotas en FBS con sulfoxido de dimetilo al 10 % y se almacenaron en nitrógeno líquido.

Transfección celular y genotipado

Las condiciones de transfección fueron esencialmente las publicadas anteriormente. El ADN donante siempre se usó en una cantidad constante de 1 µg con cantidades variables de plásmido CRISPR/Cas9 (enumerados a continuación). El ADN donante se linealizó con MLUI (CD163) (NEB) o AFLII (CD1D) (NEB) antes de la transfección. El género de las estirpes celulares establecidas se determinó mediante PCR como se describió anteriormente antes de la transfección. Se transfectaron estirpes celulares masculinas y femeninas y los datos de modificación del genoma se analizaron juntos entre las transfecciones. Se cultivaron estirpes celulares de fibroblastos fetales con un número de pases similar (2-4) durante 2 días y se cultivaron hasta una confluencia del 75 %-85 % en DMEM que contenía L-glutamina y 1 g/l de D-glucosa (Cellgro) suplementado con el 15 % de FBS, 2,5 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico y 10 mg/ml de gentamicina. Las células de fibroblastos se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Life Technologies) y se tripsinizaron. Tan pronto como las células se desprendieron, las células se aclararon con un medio de electroporación (75 % de citosales [KCl 120 mM, CaCl₂ 0,15 mM, K₂HPO₄ 10 mM, pH 7,6, MgCl₂ 5 mM]) y 25 % de Opti-MEM (Life Technologies). La concentración celular se cuantificó mediante el uso de un hemocitómetro. Las células se sedimentaron a 600 x g durante 5 minutos y se resuspendieron a una concentración de 1 x 10⁶ en medio de electroporación. Cada electroporación usó 200 µl de células en cubetas con un espacio de 2 mm con tres pulsos de onda cuadrada (1 ms) administrados a través de un BTX ECM 2001 a 250 V. Después de la electroporación, las células se resuspendieron en DMEM descrito anteriormente. Para la selección, se añadieron 600 µg/ml de G418 (Life Technologies) 24 h después de la transfección y el medio se cambió el día 7. Las colonias se recogieron el día 14 después de la transfección. Los fibroblastos fetales se sembraron en placas a 10.000 células/placa si se usó selección G418 y a 50 células/placa si no se usó selección G418. Se recogieron colonias de fibroblastos fetales aplicando cilindros de clonación autoclavados de 10 mm sellados alrededor de cada colonia con grasa de vacío esterilizada en autoclave. Las colonias se lavaron con PBS y se recogieron mediante tripsina; después se resuspendieron en medio de cultivo DMEM. Una parte (1/3) de la colonia resuspendida se transfirió a una placa de PCR de 96 pocillos y las células restantes (2/3) se cultivaron en un pocillo de una placa de 24 pocillos. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 6 µl de tampón de lisis (Tris 40 mM, pH 8,9, 0,9 % de Triton X-100, 0,4 mg/ml de proteinasa K [NEB]), se incubaron a 65 °C durante 30 min para la lisis celular, seguido de 85 °C durante 10 min para inactivar la proteinasa K.

Cribado por PCR de DS y supresiones grandes y pequeñas

Detección de reparación dirigida por RH. Se usaron PCR de largo alcance para identificar mutaciones en CD163 o CD1D. Se usaron tres ensayos de PCR diferentes para identificar eventos de RH: Amplificación por PCR de regiones que abarcan desde las secuencias CD163 o CD1D en el ADN donante hasta las secuencias endógenas de CD163 o CD1D en el lado derecho o izquierdo y una PCR de largo alcance que amplificó grandes regiones de CD163 o CD1D que abarcan los ADN donante diseñados. Un aumento del tamaño de un producto de PCR, ya sea 1,8 kb (CD1D) o 3,5 kb (CD163), que surge de la adición de secuencias Neo exógenas, se consideró evidencia de reparación de los genes dirigida por RH. Todas las condiciones de la PCR incluyeron una desnaturalización inicial de 95 °C durante 2 min seguida de 33 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 50 °C y 7-10 min a 68 °C. se usó LA taq para todos los ensayos siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Los cebadores se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Cebadores utilizados para identificar la reparación dirigida por RH de CD163 y CD1D

Cebador	Secuencia (5' - 3')	SEQ ID NO.
Cebador 1230D de ensayo de largo alcance de CD163	TTGTTGGAAGGCTCACTGTCCTTG	68
Cebador 7775 I de ensayo de largo alcance de CD163	ACAACCTAAGGTGGGGCAAAG	69
Cebador 1230 D de ensayo de brazo izquierdo de CD163	TTGTTGGAAGGCTCACTGTCCTTG	70
Cebador 8491 I de ensayo de brazo izquierdo de CD163	GGAGCTCAACATTCTTGGGTCCT	71
Cebador 3752 D de ensayo de brazo derecho de CD163	GGCAAAATTTTCATGCTGAGGTG	72
Cebador 7765 I de ensayo de brazo derecho de CD163	GCACATCACTTCGGGTTACAGTG	73
Cebador D 3991 D de ensayo de largo alcance de CD1D	CCCAAGTATCTTCAGTTCTGCAG	74
Cebador I 12806 I de ensayo de largo alcance de CD1D	TACAGGTAGGAGAGCCTGTTTTG	75
Cebador D 3991 D de ensayo de brazo izquierdo de CD1D	CCCAAGTATCTTCAGTTCTGCAG	76
Cebador 7373 I de ensayo de brazo izquierdo de CD1D	CTCAAAGGATGTAAACCCTGGA	77
Cebador 4363 D de ensayo de brazo derecho de CD1D	TGTTGATGTGGTTTGTTCGCC	78
Cebador 12806 I de ensayo de brazo derecho de CD1D	TACAGGTAGGAGAGCCTGTTTTG	79

- 5 *Ensayo de supresiones pequeñas (UENH).* Las supresiones pequeñas se determinaron mediante amplificación por PCR de CD163 o CD1D que flanquean un sitio de corte proyectado introducido por el sistema CRISPR/Cas9. El tamaño de los amplicones fue de 435 pb y 1244 pb para CD163 y CD1D, respectivamente. Los lisados de embriones y fibroblastos fetales se amplificaron por PCR con LA taq. Las condiciones de PCR de los ensayos fueron una desnaturalización inicial de 95 °C durante 2 min seguida de 33 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 56 °C y 1 min a 72 °C. Para el genotipado de las células transfectadas, las inserciones y supresiones (INDEL) se
- 10 identificaron separando amplicones de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa. Para el genotipado de embriones, posteriormente, los productos de PCR resultantes se secuenciaron con ADN para identificar supresiones pequeñas usando cebadores directos utilizados en la PCR. La información de los cebadores se muestra en la Tabla 3.

- 15 Tabla 3. Cebadores utilizados para identificar mutaciones a través de UENH en CD163 y CD1D

Cebador	Secuencia (5' - 3')	SEQ ID NO.
GCD163D	GGAGGTCTAGAATCGGCTAAGCC	80
GCD163I	GGCTACATGTCCCGTCAGGG	81
GCD7DD	GCAGGCCACTAGGCAGATGAA	82
GCD1DI	GAGCTGACACCCAAGAAGTTCCT	83
eGFP1	GGCTCTAGAGCCTCTGCTAACC	84
eGFP2	GGACTTGAAGAAGTCGTGCTGC	85

Transferencia nuclear de células somáticas (TNCS)

- 20 Para producir embriones de TNCS, se usaron ovocitos de cerdas (ART, Inc.) u ovocitos de cerdas jóvenes de un matadero local. Los ovocitos derivados de cerda se enviaron durante la noche en medio de maduración (TCM-199 con Hepes 2,9 mM, 5 µg/ml de insulina, 10 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico [EGF], 0,5 µg/ml de hormona foliculoestimulante porcina [p-FSH], piruvato 0,91 mM, cisteína 0,5 mM, 10 % de líquido folicular porcino y 25 ng/ml de gentamicina) y se transfirieron a medio fresco después de 24 h. Después de 40-42 h de maduración, las células del cúmulo se eliminaron de los ovocitos mediante agitación en presencia de hialuronidasa al 0,1 %. Los ovocitos
- 25 derivados de cerdas jóvenes se maduraron como se describe a continuación para la fecundación *in vitro* (FIV). Durante la manipulación, los ovocitos se colocaron en el medio de manipulación (TCM-199 [Life Technologies] con NaHCO 0,6 mM₃, Hepes 2,9 mM, NaCl 30 mM, 10 ng/ml de gentamicina y 3 mg/ml de BSA, con osmolaridad de 305 mOsm) suplementado con 7,0 µg/ml de citocalasina B. El cuerpo polar junto con una porción del citoplasma adyacente, presumiblemente que contenía la placa de metafase II, se extrajo y se colocó una célula donante en el
- 30 espacio perivitelino usando un capilar fino de vidrio. Después, los embriones reconstruidos se fusionaron en un medio de fusión (manitol 0,3 M, CaCl 0,1 mM₂, MgCl 0,1 mM₂ y Hepes 0,5 mM) con dos pulsos de CC (intervalo de 1 segundo) a 1,2 kV/cm durante 30 ls usando un manipulador de electrocélulas BTX (aparato de Harvard). Después de la fusión, los embriones fusionados se activaron totalmente con timerosal 200 µM durante 10 minutos en la oscuridad y ditiotretol 8 mM durante 30 minutos. Después, los embriones se incubaron en medio de cigoto porcino modificado PZM3-MU1 con Scriptaid 0,5 µM (S7817; Sigma-Aldrich), un inhibidor de la histona desacetilasa, durante
- 35 14-16 h, como se ha descrito anteriormente.

Fecundación in vitro (FIV)

- 40 Para la FIV, se obtuvieron ovarios de cerdas jóvenes prepúberes de un matadero (Farmland Foods Inc.). Se aspiraron ovocitos inmaduros de folículos de tamaño mediano (3-6 mm) usando una aguja hipodérmica de calibre 18 unida a una jeringa de 10 ml. Después se seleccionaron para la maduración ovocitos con citoplasma uniformemente

oscuro y células del cúmulo circundantes intactas. Se colocaron aproximadamente 50 complejos de cúmulos de ovocitos en un pocillo que contenía 500 µl de medio de maduración, TCM-199 (Invitrogen) con glucosa 3,05 mM, piruvato de sodio 0,91 mM, cisteína 0,57 mM, 10 ng/ml de EGF, 0,5 µg/ml de hormona luteinizante (LH), 0,5 µg/ml de FSH, 10 ng/ml de gentamicina (APP Pharm) y alcohol polivinílico al 0,1 % durante 42-44 h a 38,5 °C, CO₂ al 5 %, en aire humidificado. Al final de la maduración, las células del cúmulo circundantes se eliminaron de los ovocitos mediante agitación durante 3 minutos en presencia de hialuronidasa al 0,1%. Después, los ovocitos madurados *in vitro* se colocaron en gotitas de 50 µl de medio de FIV (medio tamponado con Tris modificado que contenía NaCl 113,1 mM, KCl 3 mM, CaCl₂ 7,5 mM, glucosa 11 mM, Tris 20 mM, cafeína 2 mM, piruvato de sodio 5 mM y 2 mg/ml de albúmina sérica bovina [BSA]) en grupos de 25-30 ovocitos. Se descongeló un sedimento de semen congelado de 100 µl en 3 ml de Dulbecco PBS suplementado con BSA al 0,1 %. Se lavó el semen de TS congelado o de eGFP fresco en Percoll al 60 % durante 20 minutos a 650 3 g y en medio tamponado con Tris modificado durante 10 minutos mediante centrifugación. En algunos casos, el semen heterocigótico recién recogido para un transgén eGFP descrito previamente se lavó tres veces en PBS. Después se resuspendió el sedimento de semen con medio de FIV a 0,5 X 10⁶ células/ml. Se introdujeron cincuenta microlitros de suspensión de semen en las gotitas con ovocitos. Los gametos se coincubaron durante 5 h a 38,5 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % en aire. Después de la fecundación, los embriones se incubaron en PZM3-MU1 a 38,5 °C y CO₂ al 5 % en aire.

Transferencia de embriones

Los embriones generados para producir cerdos CD163 o CD1D de IG se transfirieron a madres sustitutas el día 1 (TNCS) o el día 6 (cigoto inyectado) después del primer estro. Para la transferencia del día 6, los cigotos se cultivaron durante cinco días adicionales en PZM3-MU1 en presencia de 10 ng/ml de ps48 (Stemgent, Inc.). Los embriones se transfirieron quirúrgicamente a la unión ampular-ístmica del oviducto de la madre sustituta.

Síntesis *in vitro* de ARN para el sistema CRISPR/Cas9

El molde de ADN para la transcripción *in vitro* se amplificó usando PCR (Tabla 4). El plásmido de CRISPR/Cas9 utilizado para experimentos de transfección celular sirvió como molde para la PCR. Para expresar la Cas9 en los cigotos, se usó el kit mMMESSAGE mMACHINE Ultra (Ambion) para producir ARNm de Cas9. Después, se añadió una señal poli A al ARNm de Cas9 usando un kit de cola Poli (A) (Ambion). Los ARN guía de CRISPR fueron producidos por MEGAshortscript (Ambion). La calidad de los ARN sintetizados se visualizó en un gel de agarosa al 1,5 % y después se diluyó hasta una concentración final de 10 ng/µl (tanto ARNg como Cas9) y se distribuyó en alícuotas de 3 µl.

Tabla 4. Cebadores utilizados para amplificar moldes para transcripción *in vitro*.

Cebadores	Secuencia (5' - 3')	SEQ ID NO.
Cas9	D: TAATACGACTCACTATAGGGAGAATGGACTATAAGGACCACGAC	86
	I: GCGAGCTCTAGGAATTCTTAC	87
eGFP 1	D: TTAATACGACTCACTATAGGCTCCTCGCCCTTGCTCACCA	88
	I: AAAAGCACCGACTCGGTGCC	89
CD163 10	D: TTAATACGACTCACTATAGGAAACCCAGGCTGGTTGGA	90
	I: AAAAGCACCGACTCGGTGCC	91
CD163 131	D: TTAATACGACTCACTATAGGAACTACAGTGC GGCACTG	92
	I: AAAAGCACCGACTCGGTGCC	93
CD1D 4800	D: TTAATACGACTCACTATAGGCCAGCCTCGCCCAGCGACAT	94
	I: AAAAGCACCGACTCGGTGCC	95
CD1D 5350	D: TTAATACGACTCACTATAGGCAGCTGCAGCATATATTTAA	96
	I: AAAAGCACCGACTCGGTGCC	97

Microinyección de sistema CRISPR/Cas9 diseñado en cigotos

Se inyectó ARN mensajero que codificaba Cas9 y ARNg en el citoplasma de ovocitos fecundados 14 h después de la fecundación (presuntos cigotos) usando un microinyector FemtoJet (Eppendorf). La microinyección se realizó en medio de manipulación en la platina calentada de un microscopio invertido Nikon (Nikon Corporation; Tokio, Japón). Después, los cigotos inyectados se transfirieron al PZM3-MU1 con 10 ng/ml de ps48 hasta su uso posterior.

Análisis estadístico

El número de colonias con genoma modificado se clasificó como 1 y las colonias sin modificación del genoma se clasificaron como 0. Las diferencias se determinaron usando PROC GLM (SAS) considerándose significativo un valor de P de 0,05. Las medias se calcularon como medias de mínimos cuadrados. Los datos se presentan como medias numéricas ± ETM.

RESULTADOS

Inactivación de CD163 y CD1D mediada por CRISPR/Cas9 en células somáticas

Se sometió a ensayo la eficacia de cuatro plásmidos de CRISPR diferentes (guías 10, 131, 256 y 282) dirigidos a CD163 en una cantidad de 2 µg/µl de ADN donante (Tabla 5). CRISPR 282 dio como resultado una formación de colonias promedio significativamente mayor que los tratamientos de CRISPR 10 y 256 ($P < 0,05$). A partir del ensayo de PCR de largo alcance descrito anteriormente, se encontraron grandes supresiones que van desde 503 pb hasta 1506 pb en lugar de un DS a través de RH como se pretendía originalmente (Fig. 3, panel A). Esto no se esperaba porque informes anteriores con otros sistemas de edición de ADN mostraron supresiones mucho más pequeñas, de 6 a 333 pb, usando ZFN en cerdos. CRISPR 10 y una combinación de los cuatro CRISPR dieron como resultado un mayor número de colonias con un genoma modificado que CRISPR 256 y 282 (Tabla 5, $P < 0,002$). La transfección con CRISPR 10 y un plásmido que contenía Neo pero sin homología con CD163 no produjo colonias que presentaran la gran supresión. Curiosamente, también se detectó una supresión monoalélica cuando el ADN donante se introdujo sin ningún CRISPR. Este ensayo probablemente representa una subestimación de la tasa de mutación porque no se analizaron posibles supresiones pequeñas mediante secuenciación que no pudieron detectarse en un gel de agarosa en las células somáticas transfectadas.

Tabla 5. Eficiencia de cuatro plásmidos de CRISPR diferentes (guías 10, 131, 256 y 282) dirigidos a CD163. Se sometieron a ensayo cuatro CRISPR diferentes en una cantidad de 2 µg a 1 µg de ADN donante (que se muestra en la Fig. 1).

Tratamiento*	N.º total de colonias	N.º total de placas	N.º promedio de colonias/placa†	N.º de Colonias UENH	Colonia con RH	Porcentaje de colonias con un genoma modificado‡	Réplicas
10 + ADN donante	76	102	0,75 ^{bc}	11	1‡	15,79 ^a	4
131 + ADN donante	102	51	2,00 ^{ab}	11	0	10,78 ^{ab}	3
256 + ADN donante	43	49	0,88 ^c	2	0	4,65 ^{bc}	3
282 + ADN donante	109	46	2,37 ^a	3	0	2,75 ^{bc}	3
mezcla de 4 + ADN donante	111	55	2,02 ^{ab}	20	0	18,02 ^a	3
ADN donante	48	52	0,92 ^{bc}	1	0	2,08 ^{bc}	3
10 + Neo (sin CD163)	26	20	1,3 ^{n/d}	0	0	0,00 ^c	1

* La mezcla de 4 + ADN donante representa una mezcla igual de 0,5 µg de cada CRISPR con 1 µg de ADN donante. El tratamiento con ADN donante sirvió como control sin CRISPR y el tratamiento con 10 + Neo ilustra que las grandes supresiones observadas en los tratamientos con CRISPR estaban presentes sólo cuando también estaba presente el ADN donante de CD163.

† Se realizó ANOVA comparando el número promedio de colonias/placa para estimar la toxicidad de CRISPR y el porcentaje de colonias con un genoma modificado. Los valores de P fueron 0,025 y 0,0002, respectivamente. n/d = No hubo réplicas para este tratamiento, por lo que no se realizó ningún análisis estadístico.

‡ La única colonia con RH representa un evento de RH parcial.

^{a-c} Las letras en superíndice indican una diferencia significativa entre los tratamientos tanto para el número promedio de colonias/placa como para el porcentaje de colonias con un genoma modificado ($P < 0,05$).

El objetivo inicial era obtener un evento de direccionamiento a intercambio de dominio (DS, por sus siglas en inglés) por RH para CD163, pero los CRISPR no aumentaron la eficiencia de direccionamiento a CD 163. Cabe señalar que se usaron diversas combinaciones de este vector de direccionamiento para modificar CD 163 por RH mediante transfecciones tradicionales y dieron como resultado 0 eventos de direccionamiento después de cribar 3399 colonias (Whitworth y Prather, resultados no publicados). Se obtuvieron dos cerdos con un DS completo resultante de RH que contenía las 33 mutaciones que se intentó introducir mediante transfección con CRISPR 10 y el vector de direccionamiento a DS como ADN donante.

A continuación, se sometió a ensayo la eficacia de las mutaciones inducidas por CRISPR/Cas9 sin selección por fármacos; la estirpe celular de fibroblastos fetales utilizada en este estudio ya tenía una integración del casete resistente a Neo y una inactivación de SIGLEC1. También se sometió a ensayo si la relación de CRISPR/Cas9 y el ADN donante aumentaría la modificación del genoma o daría como resultado un efecto tóxico a una concentración alta. Se seleccionó CRISPR 131 para este ensayo porque en el experimento anterior, dio como resultado un elevado número de colonias totales y un mayor porcentaje de colonias que poseían un genoma modificado. Cantidades crecientes de ADN de CRISPR 131 de 3:1 a 20:1 no tuvieron un efecto significativo sobre la supervivencia de los fibroblastos fetales. El porcentaje de colonias con un genoma modificado por UENH no fue significativamente diferente entre las distintas concentraciones de CRISPR, pero tuvo el mayor número de UENH en una relación de

10:1 (Tabla 6, $P = 0,33$). Incluso con la relación más alta de ADN de CRISPR a ADN donante (20:1), no se observó RH.

- 5 Tabla 6. Eficiencia de mutaciones inducidas por CRISPR/Cas9 sin selección por fármacos. Se compararon cuatro proporciones diferentes de ADN donante y ADN de CRISPR 131 en una estirpe celular previamente modificada sin el uso de la selección G418.

ADN donante: Relación de CRISPR	Número de placas	Número de colonias	Número medio de colonias/placa	Número de colonias UENH	Porcentaje de colonias con UENH	Colonia con RH	Porcentaje de colonias con RH	Réplicas
1:0	30	79	2,6	1	1,3 ^a	0	0,0	2
1:3	30	84	2,8	1	1,2 ^a	0	0,0	2
1:5	27	76	2,8	2	2,6 ^a	0	0,0	2
1:10	32	63	2,0	5	7,9 ^a	0	0,0	2
1:20	35	77	2,2	3	3,9 ^a	0	0,0	2

^a Diferencia significativa entre tratamientos para el porcentaje de colonias con reparación por UENH ($P>0,05$).
^b No hubo una diferencia significativa en el número de colonias con genoma modificado con una concentración creciente de CRISPR ($P>0,33$).

- 10 Basándose en esta experiencia, se intentó la alteración dirigida de CD1D en células somáticas. Se diseñaron y sometieron a ensayo cuatro CRISPR diferentes en células masculinas y femeninas. Se pudieron detectar modificaciones de CD1D a partir de tres de los CRISPR aplicados, pero el uso de CRISPR 5350 no dio como resultado la modificación de CD1D con una supresión lo suficientemente grande como para detectarla mediante electroforesis en gel de agarosa (Tabla 7). Curiosamente, no se obtuvo ninguna modificación genética a través de RH aunque se proporcionó ADN de un donante. Sin embargo, se observaron grandes supresiones similares a los experimentos de supresión de CD 163 (Fig. 3, panel B). No se detectó ninguna modificación dirigida de CD1D con una supresión grande cuando no se usó CRISPR/Cas9 con el ADN donante. La modificación de CD1D a partir del direccionamiento guiado por CRISPR/Cas9 fue de 4/121 y 3/28 en colonias de células masculinas y femeninas, respectivamente. En los datos de transfección sólo se incluyeron INDEL detectables mediante electroforesis en gel de agarosa.

- 20 Tabla 7. Se sometieron a ensayo cuatro CRISPRs diferentes en una cantidad de 2 µg a 1 µg de ADN donante (que se muestra en la Fig. 2). El tratamiento con ADN donante sirvió como control sin CRISPR.

Género	Tratamiento	Número total de colonias	INDEL	Eficiencia (%)
macho	4800 + ADN donante	29	2	6,9
macho	5350 + ADN donante	20	0	0
macho	5620 + ADN donante	43	1	2,33
macho	5626 + ADN donante	29	2	6,9
macho	ADN donante	28	0	0
hembra	4800 + ADN donante	2	0	0
hembra	5350 + ADN donante	8	0	0
hembra	5620 + ADN donante	10	0	0
hembra	5626 + ADN donante	8	3	37,5
hembra	ADN donante	7	0	0

Producción de cerdos CD163 y CD1D mediante TNCS usando las células de IG

- 25 Las células que presentaban modificación de CD163 o CD1D se usaron para TNCS para producir cerdos con inactivación de CD163 y CD1D (Fig. 3). Se realizaron siete transferencias de embriones (CD163 Tabla 8), seis transferencias de embriones (CD163-Sin Neo) y cinco transferencias de embriones (CD1D) en cerdas jóvenes receptoras con embriones de TNCS de fibroblastos fetales masculinos y femeninos transfectados con sistemas CRISPR/Cas9. Seis (CD163), dos (CD163-Sin Neo) y cuatro (CD1D) (Tabla 9) de las cerdas jóvenes receptoras permanecieron gestantes hasta el término, lo que dio como resultado tasas de gestación del 85,7 %, 33,3% y 80 %, respectivamente. De las receptoras de CD163, cinco parieron lechones sanos mediante cesárea. Una (O044) parió de forma natural. El tamaño de la camada varió entre uno y ocho. Cuatro cerdos se sacrificaron debido a que no prosperaban después del nacimiento. Un lechón fue sacrificado debido a una severa fisura del paladar. Todos los lechones restantes parecen sanos (Fig. 3, panel C). Dos camadas de lechones macho resultantes de fibroblastos fetales transfectados con CRISPR 10 y ADN donante descrito en la Fig. 3, el panel B tenían una supresión de 30 pb en el exón 7 adyacente a CRISPR 10 y una supresión adicional de 1476 pb del intrón anterior, eliminando de este modo la unión intrón 6/exón 7 de CD163 (Fig. 3, panel E). Los genotipos y las traducciones predichas se resumen en la Tabla 10. Se obtuvieron un lechón macho y una camada hembra (4 lechones) a partir de la transfección con CD163-Sin Neo de células SIGLEC1 modificadas previamente. Los cinco lechones tuvieron inactivación doble para SIGLEC1 y CD163. El lechón macho tenía una modificación bialélica de CD163 con una supresión de 28 pb en el exón 7 en un alelo y una supresión de 1387 pb en el otro alelo que incluía una supresión parcial del exón 7 y una supresión completa del exón 8 y el intrón anterior, eliminando de este modo la unión del intrón y el exón. Los

lechones hembra tenían una mutación bialélica de CD163, incluyendo una supresión de 1382 pb con una inserción de 11 pb en un alelo y una supresión de 1720 pb de CD163 en el otro alelo. En la Tabla 10 se puede encontrar un resumen de las modificaciones del CD 163 y las traducciones predichas. En la Tabla 11 se puede encontrar un resumen de las modificaciones de CD1D y las traducciones predichas mediante modificación por CRISPR. Brevemente, nacieron camadas de una hembra y dos machos, dando como resultado 13 lechones. Un lechón murió inmediatamente después del nacimiento. Doce de los 13 lechones contenían una supresión bialélica u homocigótica de CD1D (Fig. 3, panel F). Un lechón era TS.

Tabla 8. Datos de transferencia de embriones para CD163.

ID del cerdo	Estirpe*	Género	N.º de embriones transferidos	Fuente de ovocitos†	Día del estro	Resultado de lechones
O047	NT de CRISPR de CD163	Macho	240	ART	2	4 lechones vivos (2 sacrificados después del nacimiento)
O015	NT de CRISPR de CD163	Macho	267	ART	1	3 lechones vivos (todos sanos)
O044	NT de CRISPR de CD163	Macho	206	ART	1	7 lechones vivos (1 nacido muerto, 1 sacrificado después del nacimiento)
O053	NT de CRISPR de CD163	Macho	224	ART	2	1 lechón macho (sacrificado el día 13)
O08	NT de CRISPR de CD163	Macho	226	ART	1	0 lechones
O094	NT de CRISPR de CD163	Hembra	193	MU	2	8 lechones vivos (1 sacrificado debido al FTT)
O086	NT de CRISPR de CD163	Hembra	213	MU	1	9 lechones vivos (2 sacrificados el día 0, 2 debido a FTT)
O082	CRISPR inyectado CD163 10/131	Macho/hembra	50 Blast	MU	5	0 lechones
O083	CRISPR inyectado CD163 10/131	Macho	46 Blast	MU	5	4 lechones vivos
O99	NT de CRISPR de CD 163-sin Neo	Macho	156	ART	1	1 lechón vivo, 1 lechón muerto
O128	NT de CRISPR de CD 163-sin Neo	Macho	196	ART	2	0 lechones
O100	NT de CRISPR de CD 163-sin Neo	Macho	261	MU	3	0 lechones
O134	NT de CRISPR de CD 163-sin Neo	Macho/hembra	181	MU	1	0 lechones
200889	NT de CRISPR de CD 163-sin Neo	Hembra	202	ART	1	4 lechones vivos
O135	NT de CRISPR de CD 163-sin Neo	Hembra	169	ART	2	0 lechones

*La estirpe NT de CRISPR de CD163 representa embriones creados por NT con una estirpe de fibroblastos fetales modificada mediante transfección. Los embriones inyectados con CRISPR fueron embriones de FIV inyectados en la fase de 1 célula con ARN guía de CD163 con ARN de CAS9. La estirpe fetal NT de CRISPR de CD163-sin Neo representa embriones creados por NT con un fibroblasto fetal previamente modificado que ya era una estirpe resistente a Neo modificada por transfección sin el uso de un marcador seleccionable.

† MU se refiere a ovocitos de cerdas jóvenes que fueron aspirados y madurados en la Universidad de Missouri como se describe en la sección FIV de Materiales y métodos. ART se refiere a ovocitos de cerda que se compraron y maduraron como se describe en la sección TNCS de Materiales y métodos.

Tabla 9. Datos de transferencia de embriones para CD1D.

ID del cerdo	Estirpe*	Género	N.º de embriones transferidos	Fuente de ovocitos†	Día del estro	Resultado
200888	NT de CRISPR de CD1D	Macho	201	ART	2	7 lechones vivos
O61	NT de CRISPR de CD1D	Macho	239	ART	0	4 lechones vivos

(continuación)

ID del cerdo	Estirpe*	Género	N.º de embriones transferidos	Fuente de ovocitos†	Día del estro	Resultado
O164	NT de CRISPR de <i>CD1D</i>	Hembra	199	MU	2	0 lechones
O156	NT de CRISPR de <i>CD1D</i>	Hembra	204	MU	2	0 lechones
O165	<i>CD1D</i> Inyectado 4800/5350	Macho/hembra	55 Blast	MU	6	4 lechones (1 hembra, 3 machos)
O127	<i>CD1D</i> Inyectado 4800/5350	Macho/hembra	55 Blast	MU	6	0 lechones
O121	NT de CRISPR de <i>CD1D</i>	Hembra	212	ART	1	2 lechones vivos

*La estirpe de NT de CRISPR de *CD1D* representa embriones creados por NT con una estirpe de fibroblastos fetales modificada mediante transfección. Los embriones inyectados con CRISPR fueron embriones de FIV inyectados en la fase de 1 célula con ARN guía de *CD1D* con ARN de CAS9.

† MU se refiere a ovocitos de cerdas jóvenes que fueron aspirados y madurados en la Universidad de Missouri como se describe en la sección FIV de Materiales y métodos. ART se refiere a ovocitos de cerda que se compraron y maduraron como se describe en la sección TNCS de Materiales y métodos.

Tabla 10. Genotipo y predicción de traducción para cerdos modificados con CD163. Algunos cerdos contienen un tipo bialélico de modificación, pero sólo tienen un alelo descrito y otro alelo modificado que no se amplificó mediante PCR

Carnada	N.º de lechones	Mecanismo de reparación	Tipo	Tamaño de los INDEL	Descripción	Traducción de proteínas*	Codón de parada prematuro	Con interferencia a la SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO†
63 y 64	7	UENH	Bialélico	Supresión de 1506 pb Otro alelo	Supresión de 30 pb en exón 7 Sin caracterizar, no amplificable	KO o CD163 ^{Δ422-527}	No	Supresión del nt 1.525 al nt 3.030	98
65	3	UENH	Bialélico	Inserción de 7 pb Otro alelo	Inserción en el exón 7	KO	Sí (491)	Inserción entre los nt 3.148 y 3.149 ^s	99
65	2	UENH	Bialélico	Supresión de 503 pb Otro alelo	Supresión parcial del exón 7 y 8 Sin caracterizar	KO	Sí (491)	**	**
65	2	UENH	Bialélico	Supresión de 1280 pb Supresión de 1373 pb	Supresión completa de los exones 7 y 8 Supresión completa de los exones 7 y 8	CD163 ^{Δ422-531} CD163 ^{Δ422-531}	No No	Supresión del nt 2.818 al nt 4.097 Supresión del nt 2.724 al nt 4.096	100 101
66	1	UENH	Homocigótico	Inserción de 2015 pb	Inserción de cadena principal de vector de direccionamiento en el exón 7			**	**
67-1	1	UENH	Bialélico	Supresión de 11 pb Inserción de 2 pb, supresión de 377 pb en intrón 6	Supresión en el exón 7 Inserción en el exón 7	KO	Sí (486)	Supresión del nt 3.137 al nt 3.147 Inserción de 2 pb entre el nt 3.149 y el nt 3.150 ^b con una supresión de 377 pb del nt 2.573 al nt 2.949	102 103
67-2	1	UENH	Bialélico	Supresión de 124 pb Supresión de 123 pb	Supresión en el exón 7 Supresión en el exón 7	KO CD163 ^{Δ129-470}	Sí (464) No	Supresión del nt 3.024 al nt 3.147 Supresión del nt 3.024 al nt 3.146	104 105
67-3	1	UENH	Bialélico	Inserción de 1 pb Otro alelo	Inserción en el exón 7 Sin caracterizar, no amplificable	KO	Sí (489)	Inserción entre los nt 3.147 y 3.148 ^c	106

67-4	1	UENH	Bialélico	Supresión de 130 pb	Supresión en el exón 7	KO	Si (462)	Supresión del nt 3.030 al nt 3.159	107
				Supresión de 132 pb	Supresión en el exón 7	CD163 ^{a330-474}	No	Supresión del nt 3.030 al nt 3.161	108
68 y 69	6	UENH	Bialélico	Supresión de 1467 pb	Supresión completa de los exones 7 y 8	CD163 ^{a642-653}	No	Supresión del nt 2.431 al nt 3.897	109
				Otro alelo	Sin caracterizar, no amplificable				
68 y 69	2	UENH	Bialélico	Supresión de 129 pb, Supresión de 1930 pb en intrón 6	Supresión en el exón 7	CD163 ^{a643b-476}	No	Supresión del nt 488 al nt 2.417 en el exón 6, la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción ^e de 12 pb comenzando en el nt 488, y una supresión adicional de 129 pb del nt 3.044 al nt 3.172	110
65 y 69	3	TS		otro alelo	Sin caracterizar, no amplificable			SEQ ID NO: 47	47
70	2	UENH	En SIGLEC1 ^{+/+} Bialélico	Supresión de 28 pb	Cerdos de tipo silvestre creados a partir de una colonia mixta	KO	Si (528)	Supresión del nt 3.145 al nt 3.172	111
				Supresión de 1387 pb	Supresión parcial en el exón 7 y todo el exón 8	KO	No	Supresión del nt 3.145 al nt 4.531	112
73	4	UENH	En SIGLEC1 ^{+/+} Bialélico	Supresión de 1382 pb Inserción de +11 pb	Supresión parcial en el exón 7 y todo el exón 8	CD163 ^{a332-651KO}	No	Supresión del nt 3.113 al nt 4.494, la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción ^e de 11 pb comenzando en el nt 3.113	113
				Supresión de 1720 pb	Supresión completa de los exones 7 y 8			Supresión del nt 2.440 al nt 4.160	114

*KO, inactivación

** No se incluye porque se sacrificaron los lechones.

† Las SEQ ID NO. de esta columna se refieren a las SEQ ID NO. para las secuencias que muestran los INDEL con respecto a la SEQ ID NO: 47.

^a La secuencia insertada fue TACTACT (SEQ ID NO: 115)

^b La secuencia insertada fue AG.

^c La secuencia insertada fue un único resto de adenina (A).

^d La secuencia insertada fue TGTGGAGAAATTC (SEQ ID NO: 116).

^e La secuencia insertada fue AGCCAGCGTGC (SEQ ID NO: 117).

Tabla 11. Genotipo y predicción de la traducción para cerdos modificados con *CD1D*

Camada	Número de lechones	Mecanismo de reparación	Tipo	Tamaño del INDEL	Descripción	Traducción de proteínas
158, 159	11	UENH	homocigoto	Supresión de 1653 pb	Supresión del exón 3, 4 y 5	KO*
167	2	UENH	homocigoto	Supresión de 1265 pb	Supresión del exón 5 y 72 pb del exón 6	KO
166-1	1	UENH	bialélico	Supresión de 24 pb	Eliminación del codón de inicio en el exón 3	KO
				Supresión de 27 pb	Alteración del codón de inicio en el exón 3	
				Supresión de 362 pb + 5 pb	Supresión del exón 3	
166-2	1	UENH	bialélico	Inserción de 6 pb + emparejamiento erróneo de 2 pb	Adición de 6 pb antes del codón de inicio en el exón 3	<i>CD1D</i> ^{ko/+}
				Supresión de 1598 pb	Supresión del codón de inicio en el exón 3 y supresión de los exones 4,5	
166-3	1	UENH	bialélico	Inserción de 1 pb	Adición de G/T en el exón 3 antes del codón de inicio en el exón 3	<i>CD1D</i> ^{+/+}
166-4	1	UENH	homocigoto	Inserción de 1 pb	Adición de A en el exón 3 antes del codón de inicio en el exón 3	<i>CD1D</i> ^{+/+}

*KO, inactivada

Eficiencia del sistema CRISPR/Cas9 en cigotos porcinos

- 5 Basándose en la alteración dirigida de CD163 y CD1D en células somáticas usando el sistema CRISPR/Cas9, este enfoque se aplicó a la embriogénesis porcina. En primer lugar, se sometió a ensayo la eficacia del sistema CRISPR/Cas9 en embriones en desarrollo. El sistema CRISPR/Cas9 dirigido a eGFP se introdujo en cigotos fecundados con semen de un verraco heterocigótico para el transgén eGFP. Después de la inyección, se controlaron los embriones posteriores que expresaban eGFP. Se sometieron a ensayo diversas concentraciones del sistema
- 10 CRISPR/Cas9 y se observó citotoxicidad del sistema CRISPR/Cas9 administrado (Fig. 4, panel A); el desarrollo embrionario después de la inyección de CRISPR/Cas9 fue menor en comparación con el control. Sin embargo, todas las concentraciones de CRISPR/Cas9 que se examinaron fueron eficaces para generar modificación de eGFP porque no se encontraron embriones con expresión de eGFP en el grupo inyectado con CRISPR/Cas9 (Fig. 4, panel B); de los embriones de control no inyectados, el 67,7 % eran verdes, indicando la expresión de eGFP. Cuando se
- 15 genotiparon los blastocistos individuales, fue posible identificar pequeñas mutaciones cerca de los sitios de unión de CRISPR (Fig. 4, panel C). Basándose en la toxicidad y la eficacia, se usaron 10 ng/μl de ARNg y ARNm de Cas9 para los siguientes experimentos.

- 20 Cuando los componentes de CRISPR/Cas9 diseñados para dirigirse a CD163 se introdujeron en presuntos cigotos, se observó una modificación dirigida de los genes en los blastocistos posteriores. Cuando se genotiparon blastocistos individuales para detectar la mutación de CD163, se encontraron mutaciones específicas en todos los embriones (100 % de eficiencia de IG). Y lo que es más importante, aunque se pudieron encontrar embriones con modificaciones homocigóticas o bialélicas (8/18 y 3/18, respectivamente) (Fig. 5), también se detectaron genotipos en mosaico (modificaciones monoalélicas) (4/18 embriones). A algunos embriones (8/10) del grupo se les inyectaron
- 25 2 ng/μl de Cas9 y 10 ng/μl de CRISPR y no se encontraron diferencias en la eficiencia de la mutagénesis. A continuación, basándose en los resultados *in vitro*, se introdujeron dos CRISPR que representaban diferentes ARNg para alterar CD163 o CD1D durante la embriogénesis para inducir una supresión específica de los genes diana. Como resultado, fue posible inducir satisfactoriamente una supresión diseñada de CD163 y CD1D mediante la introducción de dos guías. Una supresión diseñada se define como una supresión que elimina la secuencia
- 30 genómica entre las dos guías introducidas. Entre los embriones que recibieron dos CRISPR dirigidos a CD163, todos los embriones menos uno dieron como resultado una modificación dirigida de CD163. Además, se encontró que 5/13 embriones tenían una supresión diseñada en CD163 (Fig. 6, panel A) y 10/13 embriones parecían tener una modificación de CD163 de forma homocigótica o bialélica. El direccionamiento a CD1D con dos CRISPR también fue eficaz porque todos los embriones (23/23) mostraron una modificación de CD1D. Sin embargo, la supresión
- 35 diseñada de CD1D sólo se pudo encontrar en dos embriones (2/23) (Fig. 6, panel B). También se encontraron cinco de veintitrés embriones que poseían genotipos en mosaico, pero el resto de los embriones tenían modificación homocigótica o bialélica de CD1D. Por último, se sometió a ensayo si el sistema CRISPR/Cas9 puede atacar múltiples genes dentro del mismo embrión. Para este fin, el direccionamiento tanto CD163 como a eGFP se realizó en los cigotos que fueron fecundados con semen heterocigótico de eGFP. Cuando se genotiparon los blastocistos
- 40 de los embriones inyectados para CD163 y eGFP, se descubrió que el direccionamiento a CD163 y eGFP fue

satisfactorio durante la embriogénesis. Los resultados de la secuenciación demostraron que múltiples genes pueden ser diana de direccionamiento mediante la introducción de múltiples CRISPR con Cas9 (Fig. 6, panel C).

Producción de mutantes de CD163 y CD1D a partir de cigotos inyectados con CRISPR/Cas9

Basándose en el éxito del anterior estudio *in vitro*, se produjeron algunos cigotos inyectados con CRISPR/Cas9 y se transfirieron entre 46 y 55 blastocistos por receptora (porque se ha demostrado que este número es eficaz en la producción de cerdos a partir de los embriones derivados *in vitro*). Se realizaron cuatro transferencias de embriones, dos para CD163 y dos para CD1D, y se obtuvo una gestación para cada modificación. Se produjeron cuatro lechones sanos que portaban modificaciones en CD163 (Tabla 8). Todos los lechones, la camada 67 de la cerda receptora ID O083 mostró una modificación homocigótica o bialélica de CD163 (Fig. 7). Dos lechones mostraron la supresión diseñada de CD163 mediante los dos CRISPR suministrados. Todos los lechones estaban sanos. Para CD1D, una gestación también produjo cuatro lechones (camada 166 de la cerda receptora número de identificación O165): una hembra y tres machos (Tabla 9). Un lechón (166-1) portaba una mutación en mosaico de CD1D, incluyendo una supresión de 362 pb que eliminó por completo el exón 3 que contiene el codón de inicio (Fig. 8). Un lechón contenía una inserción de 6 pb con una discrepancia de 2 pb en un alelo con una supresión grande en el otro alelo. Dos lechones adicionales tenían una inserción bialélica de un solo pb. No se detectaron mutaciones en mosaico para CD163.

ANÁLISIS

Un aumento en la eficiencia de la producción de cerdos de IG puede tener un amplio impacto al proporcionar más cerdos de IG para la agricultura y la biomedicina. Los datos descritos anteriormente muestran que al usar el sistema CRISPR/Cas9, se pueden producir cerdos de IG con mutaciones específicas con alta eficiencia. El sistema CRISPR/Cas9 se aplicó satisfactoriamente para modificar genes tanto en células somáticas como en embriones preimplantacionales.

Cuando se introdujo el sistema CRISPR/Cas9 en células somáticas, indujo satisfactoriamente la alteración dirigida de los genes diana por UENH, pero no aumentó la capacidad de atacar por direccionamiento de RH. La eficacia de direccionamiento de CRISPR/Cas9 individual en células somáticas fue variable, lo que indicó que el diseño de la guía puede afectar a la eficiencia del direccionamiento. Específicamente, no fue posible encontrar una modificación específica de CD1D cuando se introdujeron CRISPR 5350 y Cas9 en células somáticas. Esto sugiere que podría resultar beneficioso diseñar múltiples ARNg y validar su eficiencia antes de producir cerdos. Aún no está clara la razón de la falta de reparación dirigida por RH con la presencia de ADN donante. Después de cribar 886 colonias (CD163 y CD1D) transfectadas con CRISPR y ADN donante, sólo una colonia tuvo evidencia de un evento de RH parcial. Los resultados demostraron que el sistema CRISPR/Cas9 funcionó con ADN donante introducido para provocar grandes supresiones inesperadas en los genes diana, pero no aumentó la eficiencia de la FC para estos dos vectores de direccionamiento particulares. Sin embargo, se desconoce un mecanismo específico para la observación de supresión grande. Informes anteriores de nuestro grupo sugirieron que el ADN de un donante se puede usar eficazmente con una ZFN para inducir la reparación dirigida por RH. De forma similar, se observó un aumento en la eficiencia del direccionamiento cuando se usó ADN donante con el sistema CRISPR/Cas9, pero no se observó una reparación completa dirigida por RH. En un estudio anterior usando ZFN, se observó que puede ocurrir una modificación dirigida a través de una combinación de RH y UENH porque se encontró una recombinación parcial del ADN donante introducido después de las DSB inducidas por la ZFN. Una explicación podría ser que las vías de RH y UENH no son independientes, pero pueden actuar juntas para completar el proceso de reparación después de las DSB inducidas por endonucleasas de asentamiento. Concentraciones más altas de CRISPR podrían mejorar la eficiencia del direccionamiento en células somáticas, aunque no se encontraron diferencias estadísticas en estos resultados experimentales. Esto puede sugerir que CRISPR es un factor limitante en el sistema CRISPR/Cas9, pero se necesita mayor validación. Se usaron satisfactoriamente células específicas para producir cerdos de IG mediante TNCS, lo que indica que la aplicación de CRISPR/Cas9 no afecta a la capacidad de las células para ser clonadas. Algunos lechones fueron sacrificados por problemas de salud; sin embargo, esto no es infrecuente en lechones derivados de TNCS.

Cuando se introdujo el sistema CRISPR/Cas9 en embriones en desarrollo mediante inyección de cigoto, casi el 100 % de los embriones y cerdos contenían un INDEL en el gen diana, demostrando que la tecnología es muy eficaz durante la embriogénesis. La eficiencia observada durante este estudio supera las frecuencias informadas en otros estudios que utilizan endonucleasas de asentamiento durante la embriogénesis. Una disminución en el número de embriones que alcanzan la fase de blastocisto sugirió que la concentración de CRISPR/Cas9 introducida en este estudio puede ser tóxica para los embriones. Una mayor optimización del sistema de suministro puede aumentar la supervivencia de los embriones y mejorar de este modo la eficiencia general del proceso. La tasa de mutagénesis de casi el 100 % observada en este caso fue diferente de un informe anterior sobre la inactivación mediada por CRISPR/Cas9 en cerdos; sin embargo, la diferencia en eficiencia entre los estudios podría ser una combinación de la guía y la diana que se seleccionó. En el presente estudio, concentraciones más bajas de CRISPR/Cas9 (10 ng/μl cada una) fueron eficaces para generar mutaciones en embriones en desarrollo y producir cerdos de IG. La concentración es menor que la publicada anteriormente en cigotos de cerdo (125 ng/μl de Cas9 y 12,5 ng/μl de CRISPR). La menor concentración de componentes de CRISPR/Cas9 podría ser beneficiosa para los embriones en

desarrollo porque la introducción de cantidades excesivas de ácido nucleico en los embriones en desarrollo puede ser tóxica. Se observaron algunos genotipos en mosaico en embriones inyectados con CRISPR/Cas9 de los ensayos *in vitro*; sin embargo, sólo un lechón producido mediante este método tenía un genotipo en mosaico. Potencialmente, una inyección con componentes de CRISPR/Cas9 puede ser más eficaz que la introducción de otras endonucleasas de asentamiento porque se consideraba que el genotipo en mosaico era el principal obstáculo para el uso del sistema CRISPR/Cas9 en cigotos. Otro beneficio del uso del sistema CRISPR/Cas9 demostrado por los presentes resultados es que no se perdieron cerdos con inactivación de CD163 producidos a partir de cigotos derivados de FIV inyectados con el sistema CRISPR/Cas9, mientras que algunos lechones resultantes de la TNCS fueron sacrificados después de unos días. Esto sugiere que la tecnología no sólo podría evitar la necesidad de TNCS para generar cerdos nuligénicos, sino que también podría superar los problemas de salud comunes asociados a TNCS. Ahora que se ha optimizado la inyección de ARNm de CRISPR/Cas9 en cigotos, los experimentos futuros también incluirán la coinyección de ADN donante.

El presente estudio demuestra que la introducción de dos CRISPR con Cas9 en cigotos puede inducir supresiones cromosómicas en embriones en desarrollo y producir cerdos con una supresión prevista, es decir, supresión específica entre las dos guías de CRISPR. Esta supresión diseñada puede resultar beneficiosa porque es posible especificar el tamaño de la supresión en lugar de depender de eventos aleatorios provocados por la UENH. Específicamente, si hay inserción/supresión de nucleótidos en un múltiplo de tres provocada por una endonucleasa de asentamiento, la mutación puede más bien dar como resultado una mutación hipomórfica porque no se produciría ningún desplazamiento de marco. Sin embargo, mediante la introducción de dos CRISPR, es posible provocar supresiones más grandes que tendrán una mayor probabilidad de generar proteínas no funcionales. Curiosamente, se diseñaron CRISPR de CD1D en un área mayor del genoma que CD163; hubo una distancia de 124 pb entre CRISPR 10 y 131 de CD163, mientras que hubo una distancia de 550 pb entre CRISPR 4800 y 5350 para CD1D. La mayor distancia entre CRISPR no fue muy eficaz para generar una supresión como se muestra en el estudio. Sin embargo, debido a que el presente estudio incluyó solo un número limitado de observaciones y es necesario considerar la eficacia de los CRISPR individuales, que no se aborda en el presente documento, se necesitan más estudios para verificar la relación entre la distancia entre CRISPR y la probabilidad de provocar las supresiones previstas.

El sistema CRISPR/Cas9 también fue eficaz en el direccionamiento de dos genes simultáneamente dentro del mismo embrión, siendo la única etapa adicional la introducción de un CRISPR adicional con ARNcr. Esto ilustra la facilidad para alterar múltiples genes en comparación con otras endonucleasas de asentamiento. Estos resultados sugieren que esta tecnología se puede usar para el direccionamiento a grupos de genes o familias de genes que pueden tener un efecto compensatorio, por lo que resulta difícil determinar el papel de genes individuales a menos que todos los genes estén alterados. Los resultados demuestran que la tecnología CRISPR/Cas9 se puede aplicar en la generación de cerdos de IG aumentando la eficiencia del direccionamiento de genes en células somáticas y mediante inyección directa de cigoto.

Ejemplo 2: Aumento de la resistencia al PRRSV en cerdos que tienen una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163

El virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV) ha devastado a la industria porcina durante el último cuarto de siglo. Las especulaciones sobre el modo de entrada vírica han incluido tanto SIGLEC1 como CD 163. Aunque la inactivación de *SIGLEC1* no afectó a la respuesta a una exposición vírica, se muestra en el presente ejemplo que los animales nulos para *CD163* no muestran signos clínicos de infección, patología pulmonar, viremia o producción de anticuerpos que son características distintivas de la infección por PRRSV. No sólo se ha confirmado un mediador de entrada de PRRSV; sino que si a animales creados de manera similar se les permitiera ingresar al suministro de alimentos, entonces se ha descrito una estrategia para evitar pérdidas económicas importantes y sufrimiento animal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Genotipado

El genotipado se basó tanto en la secuenciación del ADN como en la secuenciación del ARNm. El genotipo del semental tenía una supresión de 11 pb en un alelo que cuando se tradujo predijo 45 aminoácidos en el dominio 5, dando como resultado un codón de parada prematuro en el aminoácido 64. En el otro alelo hubo una adición de 2 pb en el exón 7 y una supresión de 377 pb en el intrón antes del exón 7, que cuando se tradujo predijo los primeros 49 aminoácidos del dominio 5, dando como resultado un codón de parada prematuro en el aminoácido 85. Una cerda tenía una adición de 7 pb en un alelo que, cuando se tradujo, predijo los primeros 48 aminoácidos del dominio 5, dando como resultado un codón de parada prematuro en el aminoácido 70. El otro alelo no estaba caracterizado (A), ya que no había ninguna banda del exón 7 ni en la PCR ni en la PCR de largo alcance de 6,3 kb. Las otras 3 cerdas eran clones y tenían una supresión de 129 pb en el exón 7 que se predice que dará como resultado una supresión de 43 aminoácidos del dominio 5. El otro alelo no estaba caracterizado (B).

El crecimiento del PRRSV en cultivo y la producción de inóculo vírico para la infección de cerdos están cubiertos por

la solicitud IBC aprobada 973

- Una cepa tipo de PRRSV, aislado NVSL 97-7895 (N.º de GenBank AF325691 2001-02-11), se cultivó como se describe en el protocolo IBC 973 aprobado. Este aislado de laboratorio se ha utilizado en estudios experimentales durante aproximadamente 20 años (Ladinig *et al.*, 2015). Se usó un segundo aislado para el 2.º ensayo, KS06-72109 como se ha descrito anteriormente (Prather *et al.*, 2013).

Infección de cerdos por PRRSV

- Se usó un protocolo de infección normalizado para PRRSV para la infección de cerdos. Se inocularon lechones de tres semanas de edad con aproximadamente 10^4 DICC50 del virus de PRRS que se administró por vía intramuscular (IM) e intranasal (IN). Los cerdos se controlaron diariamente y aquellos que presentan síntomas de enfermedad son tratados de acuerdo con las recomendaciones de los veterinarios del CMG. Los cerdos que muestran un malestar severo y están en peligro de sucumbir a la infección son sacrificados humanamente y se recogen muestras. El personal y los veterinarios desconocían el estado genético de los cerdos para eliminar sesgos en la evaluación o el tratamiento. El PRRSV está presente en los fluidos corporales durante la infección; por lo tanto, se recogieron muestras de sangre y se almacenaron a -80°C hasta que se midieron para determinar la cantidad o el grado de viremia en cada cerdo. Al final del experimento, los cerdos se pesaron y se sacrificaron humanamente, y los tejidos se recogieron y fijaron en formol tamponado al 10 %, se influyeron en parafina y se procesaron para histopatología por un patólogo certificado.

Puntuación del fenotipo de los cerdos expuestos

- El fenotipo de los cerdos se puntuó a ciegas diariamente de la siguiente manera: ¿Cuál es la actitud del cerdo? Puntuación de actitud: 0: BAR (Brillante, alerta y reactivo), 1: QAR (Silencioso, alerta y reactivo), 2: Ligeramente deprimido, 3: Deprimido, 4: Moribundo. ¿Cuál es la condición corporal del cerdo? Puntuación de estado corporal: 1: Demacrado, 2: Delgado, 3: Ideal, 4: Gordo, 5: Sobrepeso/Obeso. ¿Cuál es la temperatura rectal del cerdo? Temperatura corporal normal $38,67\text{--}39,78^\circ\text{C}$ ($101,6\text{--}103,6^\circ\text{F}$) (fiebre considerada $\geq 40^\circ\text{C}$ (104°F)). ¿Hay alguna cojera (grado)? ¿Qué miembro? Evaluar las extremidades en busca de inflamación de las articulaciones y lesiones en las pezuñas (revise la parte inferior y los lados de las pezuñas). Puntuación de cojera: 1: Sin cojera, 2: Ligeramente desigual al caminar, parece rígido en algunas articulaciones pero sin cojera, 3: Cojera leve, ligera cojera al caminar, 4: Cojera moderada, cojera obvia incluyendo cojera de dedos, 5: Cojera severa, sin soportar peso en la extremidad, necesita estímulo para ponerse de pie/caminar. ¿Hay alguna dificultad respiratoria (grado)? ¿Hay respiración con la boca abierta? ¿Hay alguna secreción nasal (color de la secreción, cantidad de la secreción: leve/moderada/grave)? ¿Ha notado que el animal tose? ¿Hay alguna secreción ocular? Puntuación respiratoria: 0: Normal, 1: disnea y/o taquipnea leves cuando está estresado (cuando se manipula), 2: disnea y/o taquipnea leves en reposo, 3: disnea y/o taquipnea moderadas cuando está estresado (cuando se manipula), 4: disnea y/o taquipnea moderadas en reposo, 5: disnea y/o taquipnea graves cuando está estresado (cuando se manipula), 6: disnea y/o taquipnea graves en reposo. ¿Hay evidencia de diarrea (grado) o vómitos? ¿Hay sangre o moco? Puntuación de diarrea: 0: no se observaron heces, 1: heces normales, 2: heces blandas pero con forma (consistencia de yogur blando, crea boñiga de vaca), 3: diarrea líquida de coloración parda/castaña con material fecal particulado, 4: diarrea líquida de coloración parda/castaña sin material fecal particulado, 5: diarrea líquida que parece similar al agua.

- Este sistema de puntuación fue desarrollado por la Dra. Megan Niederwerder en KSU y se basa en las siguientes publicaciones (Halbur *et al.*, 1995; Merck; Miao *et al.*, 2009; Patience y Thacker, 1989; Winckler y Willen, 2001). Las puntuaciones y temperaturas se analizaron usando ANOVA separadas basándose en los genotipos como tratamientos.

Medición de la viremia de PRRSV

- La viremia se determinó a través de dos enfoques. La titulación del virus se realizó añadiendo diluciones en serie 1:10 de suero a células MARC-145 confluentes en una placa de 96 pocillos. El suero se diluyó en medio mínimo esencial de Eagle suplementado con suero fetal bovino al 8 %, penicilina, estreptomycin y anfotericina B como se ha descrito anteriormente (Prather *et al.*, 2013). Las células se examinaron después de 4 días de incubación para detectar la presencia de un efecto citopático mediante el uso de un microscopio. La dilución más alta que mostró un efecto citopático se calificó como punto final de la titulación. El ARN total se aisló del suero usando el kit de aislamiento de ARN vírico MagMAX-96 de Life Technologies para medir el ácido nucleico vírico. La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa se realizó usando el kit EZ-PRRSV MPX 4.0 de Tetracore en un sistema de PCR en tiempo real CFX-96 (Bio-Rad) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada reacción (25 μl) contenía ARN de 5,8 μl de suero. La curva patrón se construyó preparando diluciones en serie de un control de ARN suministrado en el kit (Tetracore). Se informa el número de moldes por PCR.

Tinción de SIGLEC1 y CD 163 de células PAM

- Se recogieron macrófagos alveolares porcinos (PAM) extirpando los pulmones y llenándolos con aproximadamente 100 ml de solución salina tamponada con fosfato fría. Después de recuperar el lavado con solución salina

tamponada con fosfato, las células se sedimentaron y se resuspendieron en 5 ml de solución salina tamponada con fosfato fría y se almacenaron en hielo. Se incubaron aproximadamente 10^7 PAM en 5 ml de diversos anticuerpos (anti-CD169 porcino (clon 3B11/11; AbD Serotec); anti-CD163 porcino (clon 2A10/11; AbD Serotec)) diluidos en solución salina tamponada con fosfato con suero bovino fetal al 5 % y azida sódica al 0,1 % durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron y se resuspendieron en una dilución 1/100 de isotiocianato de fluoresceína (FITC) conjugado con IgG de cabra anti-ratón (Iife Technologies) diluida en tampón de tinción y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Se analizaron al menos 10^4 células usando un citómetro de flujo FACSCalibur y el software Cell Quest (Becton Dickinson).

Medición de Ig específica de PRRSV

Para medir la Ig específica de PRRSV, la proteína N recombinante de PRRSV se expresó en bacterias (Trible *et al.*, 2012) y se conjugó con perlas magnéticas Luminex usando un kit (Luminex Corporation). Las perlas acopladas a proteína N se diluyeron en solución salina tamponada con fosfato que contenía suero de cabra al 10 % a 2500 perlas/50 μ l y se colocaron en los pocillos de una placa de poliestireno de fondo redondo de 96 pocillos. El suero se diluyó 1:400 en solución salina tamponada con fosfato que contenía suero de cabra al 10 % y se añadieron 50 μ l en pocillos por duplicado y se incubaron durante 30 minutos con agitación suave a temperatura ambiente. A continuación, la placa se lavó (3X) con solución salina tamponada con fosfato que contenía suero de cabra al 10 % y 50 μ l de anticuerpo secundario de cabra anti-porcino purificado por afinidad conjugado con biotina-SP (IgG, Jackson ImmunoResearch) o IgM de cabra anti-porcino purificada por afinidad marcada con biotina (KPL) diluida a 2 μ g/ml en solución salina tamponada con fosfato que contenía suero de cabra al 10 %. Las placas se lavaron (3X) después de 30 minutos de incubación y después se añadieron 50 μ l de ficoeritrina conjugada con estreptavidina (2 μ g/ml (Moss, Inc.) en solución salina tamponada con fosfato que contenía suero de cabra al 10 %). Las placas se lavaron 30 minutos después y las microesferas se resuspendieron en 100 μ l de solución salina tamponada con fosfato que contenía suero de cabra al 10 % y se analizaron usando el software MAGPIX y Luminex xPONENT 4.2. Se publica la intensidad de fluorescencia media (IFM).

RESULTADOS

Se crearon mutaciones en *CD163* usando la tecnología CRISPR/Cas9 como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1. Se produjeron varios animales fundadores a partir de inyección de cigoto y de transferencia nuclear de células somáticas. Algunos de estos fundadores se aparearon creando descendencia para estudiar. Un único macho fundador se apareó con hembras con dos genotipos. El macho fundador (67-1) poseía una supresión de 11 pb en el exón 7 de un alelo y una adición de 2 pb en el exón 7 (y una supresión de 377 pb en el intrón anterior) del otro alelo y se predijo que sería un animal nulo (*CD163^{-/-}*). Una hembra fundadora (65-1) tenía una adición de 7 pb en el exón 7 en un alelo y un alelo correspondiente sin caracterizar y, por lo tanto, se predijo que era heterocigótica para la inactivación (*CD163^{-/-}*). Un segundo genotipo femenino fundador (3 animales que eran clones) contenía un alelo aún sin caracterizar y un alelo con una supresión de 129 pb en el exón 7. Se predice que esta supresión dará como resultado una supresión de 43 aminoácidos en el dominio 5. Los apareamientos entre estos animales dieron como resultado que todos los lechones heredaran un alelo nulo del verraco y la supresión de 43 aminoácidos o uno de los alelos sin caracterizar de las cerdas. Además de los lechones de tipo silvestre que sirvieron como controles positivos para la exposición vírica, esto produjo 4 genotipos adicionales (Tabla 8).

Tabla 12. Genotipos sometidos a ensayo para determinar la resistencia a la exposición a PRRSV (cepas NVSL y KS06)

Alelos		Resistencia a la exposición a PRRSV medida por viremia	
Paterno	Materno	NVSL	KS06
Nulo	Nulo	Resistente	N/D
Nulo	Δ 43 Aminoácidos	N/D	Resistente
Nulo	A sin caracterizar	Susceptible	N/D
Nulo	B sin caracterizar	Susceptible	Susceptible
Tipo silvestre	Tipo silvestre	Susceptible	Susceptible

En el destete, los lechones editados genéticamente y los lechones de la misma edad de tipo silvestre fueron transportados a la Universidad Estatal de Kansas para una exposición al PRRSV. Se realizó una exposición a PRRSV como se ha descrito previamente (Prather *et al.*, 2013). Los lechones, de tres semanas de edad, se llevaron a las instalaciones de desafío y se mantuvieron como un único grupo. Todos los experimentos se iniciaron después de la aprobación de los comités institucionales de bioseguridad y uso de animales. Después de la aclimatación, los cerdos se expusieron a un aislado de PRRSV, NVSL 97-7895 (Ladinig *et al.*, 2015), propagado en células MARC-145 (Kim *et al.*, 1993). Los cerdos se expusieron a aproximadamente 10^5 DICC₅₀ de virus. La mitad del inóculo se suministró por vía intramuscular y el resto por vía intranasal. Todos los cerdos infectados se mantuvieron como un único grupo, lo que permitió la exposición continua al virus de los compañeros de corral infectados. Se recogieron muestras de sangre en varios días hasta 35 días después de la infección y al finalizar, día 35. Se practicó la necropsia a los cerdos y se fijaron los tejidos en formol tamponado al 10 %, se influyeron en parafina y se procesaron para histopatología. Los signos clínicos asociados a PRRSV registrados durante el curso de la infección

incluyeron dificultad respiratoria, inapetencia, letargo y fiebre. Los resultados de los signos clínicos durante el período de estudio se resumen en la Fig. 9. Como se esperaba, los cerdos de tipo silvestre Tipo Silvestre (*CD163+/+*) mostraron signos tempranos de infección por PRRSV, que alcanzaron su punto máximo entre los días 5 y 14 y persistieron en el grupo durante el resto del estudio. El porcentaje de cerdos febriles alcanzó su punto máximo aproximadamente el día 10. Por el contrario, Los lechones nulos (*CD163-/-*) no mostraron evidencia de signos clínicos durante todo el período del estudio. Los signos respiratorios durante la infección aguda por PRRSV se reflejan en cambios histopatológicos significativos en el pulmón (Tabla 9). La infección de los cerdos de tipo silvestre mostró una histopatología compatible con PRRS, incluyendo edema intersticial con infiltración de células mononucleares (Fig. 10). Por el contrario, no hubo evidencia de cambios pulmonares en los cerdos nulos (*CD163-/-*). El tamaño de la muestra para los distintos genotipos es pequeño; sin embargo, las puntuaciones medias fueron 3,85 (n = 7) para el tipo silvestre, 1,75 (n = 4) para el A sin caracterizar, 1,33 (n = 3) para el B sin caracterizar y 0 (n = 3) y para el nulo (*CD163-/-*).

Tabla 13. Evaluación pulmonar microscópica

Cerdo	Genotipo	Descripción	Puntuación
41	Tipo silvestre	Congestión del 100 %. Áreas multifocales de edema. Infiltración de un número moderado de linfocitos y macrófagos	3
42	Tipo silvestre	Congestión del 100 %. Áreas multifocales de edema. Infiltración de un número moderado de linfocitos y macrófagos	3
47	Tipo silvestre	75 % de infiltración multifocal con células mononucleares y edema leve	2
50	Tipo silvestre	75 % de infiltración multifocal de células mononucleares dentro de los espacios alveolares y alrededor de pequeños vasos sanguíneos edema perivascular	3
51	Tipo silvestre	25 % de atelectasia con infiltración moderada de células mononucleares	1
52	Tipo silvestre	el 10 % de los espacios alveolares colapsaron con infiltración de pequeñas cantidades de células mononucleares	1
56	Tipo silvestre	100 % de infiltración intersticial moderada difusa de células mononucleares. Septos interalveolares moderadamente engrosados por hemorragia y edema.	4
45	A sin caracterizar	75 % de infiltrados multifocales de células mononucleares, especialmente alrededor de los bronquios, vasos sanguíneos, espacios subpleurales y septos interalveolares.	3
49	A sin caracterizar	75 % de infiltración multifocal de moderada a grande de células mononucleares. Algunos vasos con edema leve.	2
53	A sin caracterizar	10 % de infiltración pequeña multifocal de células mononucleares	1
57	A sin caracterizar	15 % de infiltración de células mononucleares	1
46	B sin caracterizar	Neumonía intersticial moderada	2
48	B sin caracterizar	Edema perivascular e infiltración de células mononucleares alrededor de vasos pequeños y medianos y alrededor de septos interalveolares	2
54	B sin caracterizar	Sin cambios	0
40	Nulo	Sin cambios	0
43	Nulo	Sin cambios	0
55	Nulo	Sin cambios	0

Los signos clínicos máximos se correlacionaron con los niveles de PRRSV en la sangre. La medición del ácido nucleico vírico se realizó mediante el aislamiento del ARN total del suero seguido de la amplificación del ARN del PRRSV usando un ensato comercial de PCR de PRRSV en tiempo real con transcriptasa inversa (Tetracore, Rockville, MD). Se generó una curva patrón preparando diluciones en serie de un control de ARN de PRRSV, suministrado en el kit de RT-PCR y los resultados se normalizaron como el número de moldes por 50 µl de reacción de PCR. El aislado de PRRSV siguió el curso de la viremia de PRRSV en los cerdos *CD163+/+* de tipo silvestre (Fig. 11). La viremia fue evidente al cuarto día, alcanzó un máximo el día 11 y disminuyó hasta el final del estudio. Por el contrario, no se detectó ARN vírico en los cerdos *CD163^{-/-}* en ningún momento durante el período de estudio. Coherente con la viremia, la producción de anticuerpos por los cerdos con alelos nulos y sin caracterizar fue detectable el día 14 años y aumentó hasta el día 28. No hubo producción de anticuerpos en los animales nulos (Fig. 12). En conjunto, estos datos muestran que los cerdos de tipo silvestre respaldan la replicación del PRRSV con la producción de signos clínicos compatibles con el PRRS. Por el contrario, los cerdos nuligénicos no produjeron viremia ni signos clínicos, a pesar de que los cerdos se inocularon y se expusieron constantemente a compañeros de corral infectados.

Al final del estudio, los macrófagos alveolares porcinos se eliminaron mediante lavado pulmonar y se tiñeron para determinar la expresión en la superficie de SIGLEC1 (CD169, clon 3B11/11) y CD163 (clon 2A10/11), como se ha

descrito anteriormente (Prather *et al.*, 2013). Se detectaron niveles relativamente altos de expresión de CD163 en animales de tipo silvestre *CD163*^{+/+} (Fig. 13). Por el contrario, los cerdos *CD163*^{-/-} sólo mostraron niveles de fondo de tinción anti-CD163, confirmando por lo tanto el fenotipo nuligénico. Los niveles de expresión para otro marcador de macrófagos, CD 169, fueron similares tanto para los cerdos de tipo silvestre como para los cerdos nuligénicos (Fig. 14). Otros marcadores de superficie de macrófagos, incluyendo MHC II y CD172 fueron los mismos para ambos genotipos (datos no mostrados).

Aunque el tamaño de la muestra fue pequeño, los cerdos de tipo silvestre tendieron a ganar menos peso durante el transcurso del experimento (ganancia diaria promedio de 0,81 kg \pm 0,33, n = 7) frente a los cerdos de los otros tres genotipos (sin caracterizar A 1,32 kg \pm 0,17, n = 4; sin caracterizar B 1,20 kg \pm 0,16, n = 3; nulo 1,21 kg \pm 0,16, n = 3).

En un segundo ensayo, 6 cerdos de tipo silvestre, 6 Δ 43 aminoácidos y 6 cerdos con un alelo sin caracterizar (B) se expusieron como se ha descrito anteriormente, excepto por que se usó KS06-72109 para inocular a los lechones. De manera similar a los datos del NVSL, los lechones de tipo silvestre y sin caracterizar B desarrollaron viremia. Sin embargo, en los cerdos con Δ 43 aminoácidos, el KS06 no dio como resultado viremia (Fig. 15; Tabla 7).

IMPLICACIONES Y CONCLUSIÓN

La enfermedad clínicamente más relevante para la industria porcina es el PRRS. Aunque los programas de vacunación han tenido éxito en prevenir o mejorar la mayoría de los patógenos porcinos, el PRRSV ha demostrado ser un desafío mayor. En este caso se identifica CD163 como un mediador de entrada para esta cepa vírica. El verraco fundador se creó mediante inyección de CRISPR/Cas9 en cigotos (Whitworth *et al.*, 2014) y, por lo tanto, no existe ningún transgén. Además, uno de los alelos de la cerda (también creado mediante CRISPR/Cas9) no contiene un transgén. Por lo tanto, el lechón N.º 40 porta una adición de 7 pb en un alelo y una supresión de 11 pb en el otro alelo, pero ningún transgén. Estos alelos de resistencia al virus de CD163 representan ediciones menores del genoma considerando que el genoma porcino tiene aproximadamente 2.800 millones de pb (Groenen *et al.*, 2012). Si se introdujeran animales creados de manera similar en el suministro de alimentos, se podrían evitar pérdidas económicas importantes.

Ejemplo 3: Aumento de la resistencia a los virus de PRRS y reproductivos porcinos de genotipo 1 en cerdos con el dominio SRCR 5 de CD163 reemplazado por el dominio 8 de SRCR de homología similar a CD163 humano

CD163 se considera el principal receptor del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV). En este estudio, los cerdos se modificaron genéticamente (MG) para poseer uno de los siguientes genotipos: inactivación completa (KO) de CD163, supresiones dentro del dominio 5 rico en cisteína (SRCR) del receptor eliminador de CD163, o reemplazo (intercambio de dominio) del dominio 5 de SRCR con un exón sintetizado que codifica un homólogo del dominio 8 de SRCR similar a CD163 humano (hCD 163L 1). El inmunofenotipado de macrófagos alveolares porcinos (PAM) mostró que los cerdos con supresiones del dominio 5 KO o SRCR no expresaban CD163 y los PAM no respaldaban la infección por PRRSV. Los PAM de cerdos que poseían el homólogo del dominio 8 hCD163L1 expresaron CD163 y respaldaron la replicación de los virus de genotipo de Tipo 2, pero no los de Tipo 1. La infección de cerdos con CD163 modificado con virus representativos de Tipo 1 y Tipo 2 produjo resultados similares. Aunque los virus de Tipo 1 y Tipo 2 se consideran genética y fenotípicamente similares a varios niveles, incluyendo el requisito de CD163 como receptor, los resultados demuestran una clara diferencia entre los genotipos de PRRSV en el reconocimiento de la molécula CD163.

MATERIALES Y MÉTODOS

Modificaciones genómicas del gen CD163 porcino

Los experimentos con animales y virus se realizaron de acuerdo con la Guía de la Federación de Sociedades de Ciencia Animal para el cuidado y uso de animales agrícolas en la investigación y la enseñanza, la Ley de Bienestar Animal del USDA y las Regulaciones de Bienestar Animal, y fueron aprobados por los Comités Institucionales de Cuidado y Uso de Animales y los Comités Institucionales de Bioseguridad de la Universidad Estatal de Kansas y la Universidad de Missouri. Las mutaciones en *CD163* utilizadas en este estudio se crearon usando la tecnología CRISPR/Cas9 como se ha descrito anteriormente en los ejemplos anteriores. Las mutaciones se esquematizan en la Fig. 17. La región genómica esquematizada que se muestra en la Fig. 17 cubre la secuencia del intrón 6 al intrón 8 del gen CD 163 porcino. Los intrones y exones esquematizados en la Fig. 17 no están dibujados a escala. El producto proteico predicho se ilustra a la derecha de cada estructura genómica. La expresión relativa de macrófagos, medida por el nivel de CD163 de superficie en PAM, se muestra en el extremo derecho de la Fig. 17. Las regiones de color negro indican intrones; las regiones de color blanco indican exones; la región sombreada indica mimético del exón 11 de hCD163L1, el homólogo del exón 7 porcino; y la región gris indica un intrón sintetizado con la construcción de Neo de PGK como se muestra en la Fig. 17.

La construcción génica de *CD163*, KO-d7(11), mostrada en la Fig. 17 posee una supresión de 11 pares de bases en el exón 7 del nucleótido 3.137 al nucleótido 3.147. La construcción génica de *CD163*, KO-i7(2), posee una inserción

de 2 pares de bases en el exón 7 entre los nucleótidos 3.149 y 3.150, así como una supresión de 377 pares de bases en el intrón en dirección 5' del exón 7, del nucleótido 2.573 al nucleótido 2.949. Se predice que estas ediciones provocarán mutaciones de desplazamiento de marco y codones de parada prematuros, dando como resultado sólo una traducción parcial de SRCR 5 y el fenotipo KO. Otras tres mutaciones produjeron supresiones en el exón 7. La primera, *d7(129)*, tiene una supresión de 129 pares de bases en el exón 7 del nucleótido 3.044 al nucleótido 3.172. La construcción *d7(129)* también tiene una supresión del nucleótido 488 al nucleótido 2.417 en el exón 6, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 12 pb. Las otras dos construcciones de supresión, *d7(1467)* y *d7(1280)*, tienen supresiones completas de los exones 7 y 8 como se ilustra en la Fig. 17. *d7(1467)* tiene una supresión de 1467 pares de bases del nucleótido 2431 al nucleótido 3897, y *d7(1280)* tiene una supresión de 1280 pares de bases del nucleótido 2818 al nucleótido 4097. Para estas construcciones de supresión los otros exones de *CD163* permanecieron intactos.

La última construcción mostrada en la Fig. 17, *HL11m*, se produjo usando un evento de direccionamiento que suprimió el exón 7 y lo reemplazó con un exón sintetizado que codificaba un homólogo de SRCR 8 de la proteína humana similar a *CD163* 1 (el dominio 8 de *hCD163L1* está codificado por el exón 11 de *hCD163L1*). La secuencia peptídica de SRCR 8 se creó realizando cambios de 33 nucleótidos en la secuencia del exón 7 porcino. Se incluyó un casete de neomicina en el exón sintetizado para permitir la detección de la modificación. La SEQ ID NO: 118 proporciona la secuencia de nucleótidos para la construcción *HL11m* en la región correspondiente a la misma región en la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47.

En la Fig. 18 se proporciona un diagrama de la proteína y el gen *CD163* porcinos. Los dominios SCRC (óvalos) y PST (cuadrados) de la proteína *CD163* junto con los exones del gen correspondiente se muestran en el panel A de la Fig. 18. En el panel B de la Fig. 18 se muestra una comparación de secuencia peptídica para el homólogo de SRCR 5 de *CD163* porcino (SEQ ID NO: 120) y el homólogo de SRCR 8 de *CD163* humano (SEQ ID NO: 121). La figura se basa en los números de acceso de GenBank AJ311716 (*CD163* de cerdo) y GQ397482 (*hCD163-L1*).

Virus

El panel de virus utilizado en este ejemplo se enumera en la Tabla 14. Los aislados se propagaron y valoraron en células MARC-145 (Kim *et al.*, 1993). Para la titulación, cada virus se diluyó en serie 1:10 en MEM suplementado con FBS al 7 %, Pen-Strep (80 unidades/ml y 80 µg/ml, respectivamente), 3 µg/ml de FUNGIZONA (anfotericina B) y HEPES 25 mM. Se añadieron muestras diluidas por cuadruplicado a células MARC-145 confluentes en una placa de 96 pocillos hasta un volumen final de 200 µl por pocillo y se incubaron durante cuatro días a 37 °C en CO₂ al 5 %. El punto final de la titulación se identificó como el último pocillo con efecto citopático (CPE). La dosis infecciosa del 50 % en cultivo de tejidos (DICC₅₀/ml) se calculó usando un método como el descrito anteriormente (Reed y Muench 1938).

Tabla 14. Aislados de PRRSV.

Virus	Genotipo	Año aislado	N.º de GenBank
NVSL 97-7895	2	1997	AY545985
KS06-72109	2	2006	KM252867
P129	2	1995	AF494042
VR2332	2	1992	AY150564
CO90	2	2010	KM035799
AZ25	2	2010	KM035800
MLV-ResPRRS	2	ND*	AF066183
KS62-06274	2	2006	KM035798
KS483 (SD23983)	2	1992	JX258843
CO84	2	2010	KM035802
SD13-15	1	2013	ND
Lelystad	1	1991	M96262
03-1059	1	2003	ND
03-1060	1	2003	ND
SD01-08	1	2001	DQ489311
4353PZ	1	2003	ND
*ND, No disponible			

40 Infección de macrófagos alveolares

La preparación e infección de macrófagos se realizó como se describió anteriormente (Gaudreault, *et al.*, 2009 y Patton, *et al.*, 2008). Se extrajeron los pulmones de los cerdos sacrificados y se lavaron vertiendo 100 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) fría en la tráquea. Se pinzaron las tráqueas y se masajearon suavemente los pulmones. Los contenidos alveolares se vertieron en tubos de centrifuga de 50 ml y se almacenaron en hielo. Los macrófagos alveolares porcinos (PAM) se sedimentaron mediante centrifugación a 1200 x g durante 10 minutos a 4 °C. Los sedimentos se resuspendieron y se lavaron una vez en PBS frío y estéril. Los sedimentos celulares se

resuspendieron en medio de congelación que contenía 45 % de RPMI 1640, 45 % de suero bovino fetal (FBS) y 10 % de sulfóxido de dimetilo (DMSO) y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso. Las células congeladas se descongelaron en hielo, se contaron y se ajustaron a 5×10^5 células/ml en medio (RPMI 1640 suplementado con FBS al 10 %, PenStrep y FUNGIZONA; RPMI-FBS). Se añadieron aproximadamente 10^3 PAM por pocillo a placas de 96 pocillos y se incubaron durante la noche a 37 °C en CO₂ al 5 %. Las células se lavaron suavemente para retirar las células no adherentes. Se añadieron diluciones en serie 1:10 de virus a pocillos por triplicado. Después la incubación durante la noche, las células se lavaron con PBS y se fijaron durante 10 minutos con acetona al 80 %. Después del secado, los pocillos se tiñeron con mAb SDOW-17 específico de proteína N de PRRSV (Rural Technologies Inc.) diluido 1:1000 en PBS con gelatina de pescado al 1% (PBS-FG; Sigma Aldrich). Después de una incubación de 30 minutos a 37 °C, las células se lavaron con PBS y se tiñeron con IgG anti-ratón marcada con ALEXAFUOR 488 (ThermoFisher Scientific) diluida 1:200 en PBS-FG. Las placas se incubaron durante 30 minutos en la oscuridad a 37 °C, se lavaron con PBS y se observaron con un microscopio de fluorescencia. La dosis infecciosa del 50 % en cultivo de tejidos (DICC₅₀)/ml se calculó de acuerdo con un método como el descrito anteriormente (Reed y Muench 1938).

Medición de la expresión en la superficie de CD169 y CD163 en los PAM

La tinción para la expresión en la superficie de CD 169 y CD 163 se realizó como se ha descrito anteriormente (Prather *et al.*, 2013). Se colocaron aproximadamente 1×10^6 PAM en tubos de citometría de flujo (FACS) de poliestireno de 12 mm x 75 mm y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en 1 ml de PBS con suero de ratón normal al 10 % para bloquear los receptores de Fc. Las células se sedimentaron mediante centrifugación y se resuspendieron en 5 µl de mAb de ratón anti-CD169 porcino conjugado con FITC (clon 3B11/11; AbD Serotec) y 5 µl de mAb de ratón anti-CD163 porcino conjugado con PE (clon: 2A10/11, AbD Serotec). Después de 30 minutos de incubación, las células se lavaron dos veces con PBS que contenía albúmina sérica bovina al 1 % (Fracción V de BSA; Hyclone) y se analizaron inmediatamente en un citómetro de flujo BD LSR Fortessa (BD Biosciences) con el software FCS Express 5 (De Novo Software). Se analizó un mínimo de 10.000 células por cada muestra.

Medición de la viremia de PRRS

Se aisló ARN de 50 µl de suero usando el kit de aislamiento vírico MagMAX 96 de Ambion (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ARN de PRRSV se cuantificó usando reactivos específicos de diana de RT-PCR en tiempo real EZ-PRRSV MPX 4.0 (Tetracore) realizados de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Cada placa contenía patrones de cuantificación Tetracore y conjuntos de controles diseñados para usarse con los reactivos de RT-PCR. La PCR se realizó en un sistema de detección de PCR en tiempo real CFX96 Touch (Bio-Rad) en un formato de 96 pocillos usando los parámetros de ciclado recomendados. Los resultados del ensayo de PCR se publicaron como número lógico de copias de ARN de PRRSV por 50 µl de volumen de reacción, que se aproxima al número de copias por ml de suero. El área bajo la curva (ABC) de la viremia a lo largo del tiempo se calculó usando GraphPad Prism versión 6.00 para Windows.

Medición del anticuerpo contra PRRSV

El inmunoensayo de fluorescencia de microesferas (FMIA) para la detección de anticuerpos contra la proteína de la nucleocápside (N) del PRRSV se realizó como se ha descrito anteriormente (Stephenson *et al.*, 2015). La proteína N recombinante de PRRSV se acopló a microesferas de poliestireno Luminex MAGPLEX carboxiladas de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para el FMIA, se colocaron aproximadamente 2500 perlas recubiertas de antígeno, suspendidas en 50 µl de PBS con suero de cabra al 10 % (PBS-GS), en cada pocillo de una placa de fondo redondo de poliestireno de 96 pocillos. Se diluyeron sueros 1:400 en PBS-GS y se añadieron 50 µl a cada pocillo. La placa se envolvió en papel de aluminio y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. La placa se colocó en un imán y las microesferas se lavaron tres veces con 190 µl de PBS-GS. Para la detección de IgG, se diluyeron 50 µl de anticuerpo secundario de cabra anti-porcino purificado por afinidad conjugado con biotina-SP (IgG, Jackson ImmunoResearch) a 2 µg/ml en PBS-GS y se añadieron 100 µl a cada pocillo. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos y se lavó tres veces seguido de la adición de 50 µl de ficoeritrina conjugada con estreptavidina (2 µg/ml en PBS-GS; SAPE). Después de 30 minutos, las microesferas se lavaron, se resuspendieron en 100 µl de PBS-GS y se analizaron usando un instrumento MAGPIX (LUMINEX) y el software LUMINEX xPONENT 4.2. La intensidad de fluorescencia media (IFM) se calculó en un mínimo de 100 microesferas.

Medición de haptoglobina (HP)

La cantidad de Hp en suero se midió usando un kit de ELISA de Hp específico de porcino (Genway Biotech Inc.) y las etapas se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las muestras de suero se diluyeron 1:10.000 en solución diluyente 1X y se pipetearon por duplicado en una placa de ELISA de 96 pocillos anti-Hp de cerdo pre-recubierta, se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos, después se lavaron tres veces. Se añadió el conjugado Anti-Hp-HRP a cada pocillo y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. La placa se lavó y se añadieron 100 µl de solución de sustrato cromógeno a cada pocillo. Después de incubación en la oscuridad durante 10 minutos, se añadieron 100 µl de solución de parada a cada pocillo. La placa se

leyó a 450 nm en un lector de microplacas basado en filtro Fluostar Omega (BMG Labtech).

RESULTADOS

5 *Propiedades fenotípicas de PAM de cerdos con el gen CD163 modificado*

Las propiedades de dispersión frontal y lateral de las células en el material de lavado pulmonar se usaron para detectar la subpoblación mononuclear de células. En la Fig. 19 se presentan resultados representativos de la tinción de CD169 y CD163 para las diferentes modificaciones genéticas que se muestran en la Fig. 17. En el ejemplo representativo presentado en el panel A de la Fig. 19, más del 91 % de los PAM de los cerdos de TS fueron positivos tanto para CD169 como para CD163. Los resultados de 12 cerdos de TS utilizados en este estudio mostraron una media de 85 +/- 8 % de células doblemente positivas. Como se muestra en el panel B de la Fig. 19, los PAM de los cerdos KO para CD163 no mostraron evidencia de CD163, pero mantuvieron niveles superficiales normales de CD169. Aunque se predijo que los polipéptidos CD163 derivados de los genotipos de supresión *d7(1467)* y *d7(1280)* deberían producir polipéptidos CD163 modificados anclados a la superficie de PAM, los resultados de la inmunotinción no mostraron expresión de CD163 en la superficie (véase la Fig. 19, panel D). Puesto que MAAb 2A10 reconoce un epítipo ubicado en los primeros tres dominios de SRCR, la ausencia de detección no fue el resultado de la supresión de un epítipo inmunorreactivo. Se predijo que el genotipo *d7(129)* poseería una supresión de 43 aminoácidos en SRCR 5 (véase la Fig. 17). En el ejemplo presentado en el panel C de la Fig. 19, sólo el 2,4 % de las células cayeron en el cuadrante doble positivo. El análisis de los PAM de nueve cerdos *d7(129)* utilizados en este estudio mostraron porcentajes de células doblemente positivas que variaron entre el 0 % y el 3,6% (media = 0,9%). La expresión en la superficie de CD169 siguió siendo similar a la de los PAM de TS. A efectos de este estudio, los cerdos que poseían los genotipos KO, *d7(1467)*, *d7(1280)* y *d7(129)* se clasificaron todos como poseedores de un fenotipo nulo para CD163.

La modificación de CD163 que contiene la secuencia peptídica del dominio 8 de hCD163L1 *HL11m*, mostró expresión dual de CD163⁺ y CD169⁺ en PAM (panel E de la Fig. 19). Sin embargo, en todos los cerdos *HL11m* analizados en este estudio, la expresión en la superficie de CD163 se redujo notablemente en comparación con los PAM de TS. Los niveles de CD163 cayeron en un continuo de expresión, variando de CD163 no detectable a cerdos que poseen niveles moderados de CD163. En el ejemplo mostrado en el panel E de la Fig. 19, aproximadamente el 60 % de las células estaban en el cuadrante doble positivo, mientras que el 40 % de las células se tiñeron sólo para CD169. El análisis de PAM de un total de 24 cerdos *HL11m* mostraron que el 38 +/- 12 % de las células PAM eran positivas sólo para CD169 y el 54 +/- 14 % eran doblemente positivas (CD169⁺CD163⁺).

35 *Niveles circulantes de haptoglobina en cerdos TS y con CD163 modificados*

Como molécula eliminadora, CD163 es responsable de retirar los complejos HbHp de la sangre (Fabriek, *et al.*, 2005; Kristiansen *et al.*, 2001; y Madsen *et al.*, 2004). El nivel de Hp en suero proporciona un método conveniente para determinar las propiedades funcionales generales de los macrófagos que expresan CD163. Se midieron los niveles de Hp en sueros de cerdos de TS, *HL11m* y nulos para CD163 a las tres o cuatro semanas de edad, justo antes de la infección con PRRSV. Los resultados, presentados en la Fig. 20, mostraron que los sueros de cerdos de TS tenían las cantidades más bajas de Hb (media A450 = 23 +/- 0,18, n = 10). La media y la desviación típica de cada grupo fueron TS, 0,23 +/- 0,18, n = 10; *HL11m*, 1,63 +/- 0,8, n = 11; y 2,06 +/- 0,57, n = 9, para el grupo nulo. El grupo nulo estaba compuesto por genotipos que no expresaban CD163 (cerdos con fenotipo nulo de CD163). Las mediciones de Hp se realizaron en una única placa ELISA. Los grupos con la misma letra no fueron significativamente diferentes ($p > 0,05$, Kruskal-Wallis ANOVA unidireccional con ensayo posterior de Dunnett). El valor medio de A450 para los cerdos de TS fue significativamente diferente del de los cerdos *HL11m* y nulos para CD163 ($p < 0,05$). Aunque el valor medio de A450 fue menor para el grupo de *HL11m* en comparación con el grupo nulo para CD163 (A450 = 1,6 +/- 0,8 frente a 2,1 +/- 0,6), la diferencia no fue estadísticamente significativa. Puesto que la interacción entre HbHp y CD163 se produce a través de SRCR 3 (Madsen *et al.*, 2004), el aumento de Hp circulante en los cerdos *HL11m* en comparación con los cerdos de TS probablemente no fue consecuencia de una afinidad reducida de CD163 por Hb/Hp, sino el resultado de un número reducido de macrófagos CD163⁺ junto con una expresión reducida de CD163 en los macrófagos restantes (véase el panel E de la Fig. 19).

55 *Infección de PAM con virus de tipo 1 y tipo 2*

La permisividad de los cerdos con CD163 modificado para PRRSV se evaluó inicialmente infectando células PAM *in vitro* con un panel de seis aislados de PRRSV de tipo 1 y nueve de tipo 2 (consulte la Tabla 14 para ver la lista de virus). Los virus en el panel representan diferentes genotipos, así como diferencias en las secuencias de nucleótidos y péptidos, patogenia y años de aislamiento. Los datos presentados en la Tabla 15 muestran los resultados de experimentos usando PAM de tres cerdos para cada grupo de genotipo de CD163. Los virus listados corresponden a los aislados de PRRSV listados en la Tabla 14. Los resultados se muestran como media +/- desviación típica del porcentaje de PAM infectados. Los PAM nulos para CD163 procedían de cerdos que expresaban el alelo *d7(129)* (véanse las Fig. 17 y 19 para consultar construcciones del gen CD163 y la expresión de CD163 en PAM, respectivamente).

Tabla 15. Infección de PAM de cerdos de tipo silvestres y MG con diferentes aislados de PRRSV

	Genotipo/Fenotipo (% de Infección)		
Tipo 1	TS (%)	HL11m	Nulo
13-15	56 +/- 9	0	0
Lelystad	62 +/- 15	0	0
03-1059	50 +/- 18	0	0
03-1060	61 +/- 12	0	0
01-08	64 +/- 20	0	0
4353-PZ	62 +/- 15	0	0
Tipo 2	TS (%)	HL11m	Nulo
NVSL 97	59 +/- 15	8 +/-08	0
KS-06	56 +/- 20	12 +/-09	0
P129	64 +/-11	8 +/-06	0
VR2332	54 +/-05	6 +/-03	0
CO 10-90	43 +/- 18	8 +/-08	0
CO 10-84	51 +/-22	7 +/-04	0
MLV-ResP	55 +/- 12	3 +/-01	0
KS62	49 +/-03	10 +/-11	0
KS483	55 +/-23	6 +/-03	0

Como se esperaba, los PAM de TS estaban infectados por todos los virus. Por el contrario, los cerdos con fenotipo nulo para CD163 fueron negativos para la infección por todos los virus. Se observó una marcada diferencia en la respuesta de los PAM de los cerdos *HL11m*. Ninguno de los virus de Tipo 1 pudo infectar los PAM *HL11m*; mientras que, todos los virus en el panel de Tipo 2 infectaron los PAM *HL11m*, aunque en porcentajes mucho más bajos en comparación con los PAM de TS.

La permisividad también se evaluó comparando los puntos finales de la titulación de virus entre TS y *HL11m* PAM para los mismos virus tipo 2. Se muestran los resultados para dos cerdos de TS y *HL11m* (Fig. 21). Los valores de $\log_{10}DICC_{50}$ se calcularon basándose en la infección de cultivos de macrófagos con la misma muestra de virus. Los resultados de la infección representan dos cerdos diferentes de cada genotipo. Los virus utilizados para la infección se enumeran en la Tabla 14. Los valores de $\log_{10}DICC_{50}$ para los PAM de los cerdos *HL11m* tenían 1-3 log menos en comparación con los PAM de TS infectados con el mismo virus. La única excepción fue la infección con una cepa vacunal de virus vivo modificado. Cuando se toman en conjunto, los resultados sugieren que los PAM de los cerdos *HL11m* poseen una susceptibilidad o permisividad reducida a la infección con virus de Tipo 2.

Infección de cerdos con CD163 modificado con virus tipo 1 y tipo 2

Se infectaron cerdos de dTS (círculos), *HL11m* (cuadrados) y nulos para CD163 (triángulos) con el virus de Tipo 1 representativo (SD13-15) (Fig. 22, panel A, gráfico izquierdo) y de Tipo 2 (NVSL 97-7895) (Fig. 22, panel A, gráfico derecho). Los cerdos de fenotipo nulo se derivaron de alelos KO y *d(1567)* (véase la Fig. 17). Se mezclaron cerdos de los tres genotipos inoculados con el mismo virus en un corral, lo que permitió la exposición continua de los cerdos con CD163 modificado al virus diseminado por sus compañeros de corral TS. El número de cerdos infectados con el virus de Tipo 1 representativo fue: TS (n = 4), *HL11m* (n = 5) y nulos (n = 3); y virus de Tipo 2: TS (n = 4), *HL11m* (n = 4) y nulos (n = 3). Como se muestra en la Fig. 22, los cerdos nulos para CD163 infectados con el virus de Tipo 1 o Tipo 2 dieron resultados negativos para la viremia en todos los puntos temporales y no se seroconvirtieron. Como se esperaba, los cerdos de TS fueron infectados productivamente y poseían niveles medios de viremia cercanos a 10^6 moldes por 50 μ l de reacción de PCR 7 días después de la infección para ambos virus. Hacia los 14 días, todos los cerdos de TS se habían seroconvertido (véase la Fig. 22, panel B). De acuerdo con los resultados de infección de PAM (Tabla 15), los cinco cerdos *HL11m* infectados con el virus de Tipo 1 no mostraron evidencia de viremia o anticuerpos contra PRRSV. Todos los cerdos *HL11m* infectados con el aislado de Tipo 2, NVSL, soportaron infección y se seroconvirtieron (Fig. 22, panel B). La presencia de una permisividad reducida de los cerdos *HL11m* no estaba clara. La viremia media para tres de los cuatro cerdos *HL11m* era similar a la de los cerdos de TS. Sin embargo, para un cerdo *HL11m*, N.º 101 (cuadrados abiertos en la Fig. 22, gráfico de la derecha del panel A), la viremia se redujo considerablemente en comparación con los otros cerdos en el grupo de genotipo *HL11m*. No había una explicación clara para la reducción de 3 a 4 log en la viremia para el Cerdo N.º 101, pero se sugirió que algunos cerdos *HL11m* pueden ser menos permisivos con el PRRSV, una observación que respalda los resultados de infección de PAM *in vitro* (Tabla 15). Puesto que todos los cerdos se inocularon con la misma cantidad de virus y permanecieron mezclados con los cerdos de TS, la viremia más baja en el Cerdo N.º 101 no fue el resultado de recibir una menor cantidad de virus o de una menor exposición al virus. La citometría de flujo de macrófagos mostró que la expresión de CD163 para el Cerdo N.º 101 era comparable a la de los otros cerdos *HL11m* (datos no mostrados). No hubo diferencias en la secuencia en la secuencia mimética del exón 11.

Se realizaron ensayos adicionales de infección vírica usando dos virus, NVSL 97-7895 y KS06-72109. Los resultados se muestran en la Fig. 23. Se siguió a los cerdos durante 35 días después de la infección y los datos se

informaron como el área bajo la curva (ABC) para las mediciones de viremia tomadas 3, 7, 11, 14, 21, 28 y 35 días después de la infección. Como se muestra en la Fig. 23, para NVSL, el valor medio de ABC para los siete cerdos de TS infectados con NVSL fue de 168 ± 8 frente a 165 ± 15 para los siete cerdos *HL11m*. Para KS06, los valores medios de ABC para los seis cerdos de TS y seis *HL11m* fueron de 156 ± 9 y 163 ± 13 , respectivamente. Para ambos virus, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los cerdos de TS y *HL11m* ($p > 0,05$). Cuando se toman en conjunto, los resultados mostraron que los cerdos *HL11m* no pudieron resistir la infección por PRRSV de Tipo 1, pero mantuvieron la permisividad para la infección con virus de Tipo 2. Aunque hubo una reducción en la permisividad a PRRSV de los PAM de cerdos *HL11m* infectados *in vitro* con los aislados de Tipo 2, esta diferencia no se tradujo en el cerdo. Para obtener los resultados mostrados en la Fig. 23, la carga vírica se determinó calculando el área bajo la curva (ABC) para cada cerdo durante un período de infección de 35 días. El cálculo del ABC se realizó usando \log_{10} de mediciones de viremia por PCR tomadas 0, 4, 7, 10, 14, 21, 28 y 35 días después de la infección. Las líneas horizontales muestran la media y la desviación típica. Clave: TS = cerdos de tipo silvestre, *HL11* = cerdos de genotipo *HL11m*; Nulo = genotipo nulo para CD163.

ANÁLISIS

CD163 es una proteína de la superficie de los macrófagos importante para eliminar el exceso de Hb de la sangre y modular la inflamación en respuesta al daño tisular. También actúa como receptor de virus. CD163 participa en respuestas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias (Van Gorp *et al.*, 2010). Los macrófagos CD163-positivos se colocan dentro del grupo de macrófagos M2 activados como alternativa, que generalmente se describen como altamente fagocíticos y antiinflamatorios. Los macrófagos M2 participan en la limpieza y reparación después de una infección o daño mecánico del tejido (Stein *et al.*, 1992). En cuanto a la capacidad antiinflamatoria, la expresión de CD163 es regulada positivamente por proteínas antiinflamatorias, tales como IL-10 (Sulahian, *et al.*, 2002). Durante la inflamación, CD163 disminuye la inflamación al reducir la oxidación a través de la eliminación del hemo circulante de la sangre. Los productos de degradación del hemo, tales como biliverdina, bilirrubina y monóxido de carbono son moléculas antiinflamatorias potentes (Soares y Bach, 2009 y Jeney *et al.*, 2002). En cuanto a la capacidad proinflamatoria, la reticulación de CD 163 en la superficie de los macrófagos por anticuerpos o bacterias anti-CD 163 da como resultado la liberación localizada de citocinas proinflamatorias, incluyendo IL-6, MG-CSF, TNF α e IL-1 β (Van den Heuvel *et al.*, 1999 y Fabrick *et al.*, 2009).

Los cerdos transgénicos que carecen de CD163 no respaldan la replicación de un aislado de PRRSV de Tipo 2 (Whitworth *et al.*, 2016). En este estudio, los ensayos de infección *in vitro* demuestran la resistencia de los macrófagos de fenotipo nulo para CD163 a un amplio panel de aislados de PRRSV de Tipo 1 y 2, ampliando aún más la resistencia para incluir potencialmente todos los aislados de PRRSV (Tabla 15). Se confirmó la resistencia de los macrófagos de fenotipo nulo para CD163 a los virus de Tipo 1 y Tipo 2 *in vivo* (Fig. 22 y Fig. 23). Basándose en estos resultados, se puede descartar la contribución de otros receptores de PRRSV anteriormente descritos en la literatura (Zhang y Yoo, 2015). Por ejemplo, Shanmukhappa *et al.* (2007) demostraron que las células BHK no permisivas transfectadas con un plásmido CD151 adquirieron la capacidad de respaldar la replicación del PRRSV, y se demostró que la incubación con un anticuerpo policlonal anti-CD151 reduce significativamente la infección de las células MARC-145. Además, una estirpe celular de simio, SJPL, desarrollada originariamente para su uso en la propagación de virus de la influenza porcina, anteriormente se demostró que respalda la replicación del PRRSV (Provost, *et al.*, 2012). Las propiedades importantes de la estirpe celular SJPL incluyeron la presencia de CD 151 y la ausencia de sialoadhesina y CD163. Considerados en conjunto, estos datos proporcionaron evidencia convincente de que la presencia de CD151 por sí sola es suficiente para respaldar la replicación del PRRSV. Los resultados de este estudio que muestran la ausencia de infección por PRRSV en macrófagos y cerdos que poseen un fenotipo nulo para CD163 indican que CD151 como receptor alternativo para PRRSV no es biológicamente relevante.

Las proteínas víricas GP2a y GP4, que forman parte del GP2a, GP3, complejo heterotrimérico de GP4 en la superficie del PRRSV, puede coprecipitarse con CD163 en ensayos descendentes de células transfectadas con plásmidos GP2 y GP4 (Das, *et al.*, 2009). Presumiblemente, GP2 y GP4 forman una interacción con uno o más de los dominios SRCR de CD 163. Los ensayos de infectividad *in vitro* que incorporan una cadena principal de ADNc de CD163 porcino que contiene un intercambio de dominio entre SRCR 5 porcino y el homólogo de SRCR 8 de hCD163-L1 localizaron adicionalmente la región utilizada por los virus de Tipo 1 en SRCR 5 (Van Gorp, *et al.*, 2010). Es interesante especular que la interacción estable entre GP2/GP4 y CD163 se produce a través de SRCR 5. Glicoproteínas víricas adicionales, tales como GP3 y GP5, pueden estabilizar adicionalmente el complejo virus-receptor o pueden actuar como moléculas correceptoras. En este estudio se investigó el requisito de SRCR 5 infectando macrófagos y cerdos que poseían el alelo *HL11m*, lo que recreó el intercambio de dominio SRCR 8 de CD163L1 realizando sustituciones de 33 pb en el exón 7 porcino. El alelo *HL11m* también incluía un casete de neomicina para la selección de células positivas para la modificación genética (Fig. 17). Los cerdos *HL11m* expresaron CD163 en PAM, aunque a niveles reducidos en comparación con los PAM de TS (Fig. 19, compare los paneles A y E). La expresión reducida probablemente se debió a la presencia del casete de neomicina, que estaba ubicado entre el mimético del exón 11 y el siguiente intrón. Los cerdos *HL11m* no eran permisivos para la infección con un virus de Tipo 1, confirmando la importancia de SRCR 5. Sin embargo, los macrófagos *HL11m* y los cerdos *HL11m* sí respaldaron la infección con virus de Tipo 2. Basándose en la titulación de virus y los resultados del porcentaje de infección, los PAM de los cerdos *HL11m* mostraron una disminución general en la permisividad para el

virus en comparación con los macrófagos de TS (Tabla 15 y Fig. 17). La disminución de la permisividad puede deberse a niveles reducidos de CD163 en los macrófagos *HL11m*, combinados con una afinidad reducida del virus por la proteína CD163 modificada. Suponiendo que los virus de Tipo 2 poseen un requisito de SRCR 5 y que SRCR 8 L1 puede actuar como un sustituto adecuado, la menor afinidad puede explicarse por la diferencia en las secuencias peptídicas entre el SRCR 8 humano y el SRCR 5 porcino (véase la Fig. 18, panel B). Sin embargo, la permisividad reducida de los PAM no se tradujo al cerdo. La viremia media para los cerdos *HL11m* no fue significativamente diferente en comparación con los cerdos de TS (Fig. 23). Además de los PAM, la infección por PRRSV de macrófagos del tejido intravascular, septal y linfode contribuye a la viremia (Lawson *et al.*, 1997 y Morgan *et al.*, 2014). Las contribuciones potenciales de estas y otras poblaciones de células positivas para CD163 en el mantenimiento de la carga vírica general en cerdos *HL11m* merecen más estudio.

Aunque se expresan establemente plásmidos de CD163 que poseen supresiones de dominios SRCR en células HEK (Van Gorp *et al.*, 2010), la supresión de los exones 7 y 8 en *d7(1467)* y *d7(1280)* dio como resultado una falta de expresión en la superficie detectable de CD163 (Fig. 19, panel D). Puesto que el mAB 2A10 utilizado para la citometría de flujo reconoce los tres dominios SRCR N-terminales (Van Gorp *et al.*, 2010), y posiblemente los dominios 7.^o y 8.^o (Sanchez, *et al.*, 1999), la ausencia de detección no se debió a la eliminación de un epítipo 2A10 en las proteínas mutadas. Aunque se pudo detectar una pequeña cantidad de expresión de CD163 en PAM de algunos de los cerdos *d7(129)* (véase la Fig. 19, panel C), la cantidad de proteína expresada no fue suficiente para respaldar la infección por PRRSV en PAM o cerdos. La ausencia de expresión de CD163 en los mutantes con supresión de los exones 7 y 8 no se comprende totalmente, pero es probable que sea el resultado de la degradación de ARNm y/o proteínas.

En 2003, CD163 fue identificado como un receptor del virus de la fiebre porcina africana (ASFV, por sus siglas en inglés; Sánchez-Torres *et al.*, 2003). Esta conclusión se basó en la observación de que los macrófagos infectados poseen un fenotipo positivo para CD163 maduro, y anticuerpos anti-CD163, tales como 2A10, bloquean la infección de macrófagos por ASFV *in vitro*. Queda por determinar si los cerdos nulos para CD163 son resistentes a la infección por ASFV.

Los modelos de cultivo celular que incorporan modificaciones al receptor de PRRSV han proporcionado información valiosa sobre los mecanismos de entrada, replicación y patogenia de PRRSV. Un aspecto único de este estudio fue la realización de un experimento paralelo *in vivo* usando cerdos con receptores modificados. Esta investigación tiene repercusiones importantes en la viabilidad de desarrollar curas preventivas para una de las enfermedades más graves que jamás haya enfrentado la industria porcina mundial.

Los ejemplos desvelados en el presente documento se proporcionan a modo de ejemplificación y no tienen por objeto limitar el alcance de la invención.

En vista de lo anterior, se observará que se consiguen los diversos objetos de la invención y se obtienen otros resultados ventajosos.

REFERENCIAS

Allende R, et al., 1999. North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome viruses differ in non-structural protein coding regions. J. Gen. Virol. 80: 307-315.

Bauer BK, et al., Arginine supplementation *in vitro* increases porcine embryo development and affects mRNA transcript expression. Reprod Fertil Dev 2011; 23:107.

Beaton BP, et al., Compound transgenics: recombinase-mediated gene stacking. In: Pinkert CA (ed.). Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook, 3rd ed. Waltham, MA: Elsevier; 2014:565-578.

Benfield DA, et al., 1992. Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (Isolate ATCC VR-2332). J Vet Diag Invest 4:127-133.

Boddicker, et al., 2014. Genome-wide association and genomic prediction for host response to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. Genetics, selection, evolution : GSE 46, 18.

Borg NA, et al., CD1d-lipid- antigen recognition by the semi-invariant NKT T-cell receptor. Nature 2007; 448:44-49.

Brinster RL, et al., Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. Proc Natl Acad Sci U S A 1985; 82:4438-4442.

Calvert JG, et al., 2007. CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. J Virol. 81:7371-7379.

- Carter DB, et al., Phenotyping of transgenic cloned piglets. *Cloning Stem Cells* 2002; 4:131-145.
- Cong L, et al., Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013; 339:819-823.
- 5 Dai Y, et al., Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* 2002; 20:251-255.
- 10 Das PB, et al., 2009. The minor envelope glycoproteins GP2a and GP4 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus interact with the receptor CD163. *J Virol.* 84:1731-40.
- Delputte PL, et al., 2002. Involvement of the matrix protein in attachment of porcine reproductive and respiratory syndrome virus to a heparin-like receptor on porcine alveolar macrophages. *J Virol.* 76:4312-4320.
- 15 Etzerodt, A., et al., 2013. Plasma clearance of hemoglobin and haptoglobin in mice and effect of CD163 gene targeting disruption. *Antioxidants & redox signaling* 18, 2254-2263.
- Etzerodt, A., et al., 2013. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxidants & redox signaling* 18, 2352-2363.
- 20 Fabrick BO, et al., 2005. The macrophage scavenger receptor CD163. *Immunobiology.* 210:153-160.
- Fabrick BO, et al., 2009. The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood.* 113:887-892.
- 25 Gaj T, et al., ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas- based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* 2013; 31: 397-405.
- Gaudreault N, et al., 2009. Factors affecting the permissiveness of porcine alveolar macrophages for porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Archiv Virol.* 154:133-136.
- 30 Graversen, J.H., et al., 2012. Targeting the hemoglobin scavenger receptor CD163 in macrophages highly increases the anti-inflammatory potency of dexamethasone. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 20, 1550-1558.
- 35 Groenen, M.A., et al., 2012. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature* 491, 393-398.
- Hai T, et al., One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res* 2014; 24: 372-375.
- 40 Halbur, P.G., et al., 1995. Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Veterinary pathology* 32, 648-660.
- 45 Hammer RE, et al., Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 1985; 315:680-683.
- Hauschild J, et al., Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:12013-12017.
- 50 Holtkamp, D.J., et al., 2013. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *Journal of Swine Health and Production* 21, 72-84.
- Hwang WY, et al., Efficient genome editing in zebrafish using a knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning. *Cell Res* 2011; 21:979-982.
- 55 Hwang WY, et al., Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 2013; 31:227-229.
- 60 Jeney V, et al., 2002. Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood.* 100:879-887.
- Keffaber, K.K., 1989. Reproductive failure of unknown etiology. *American Association of Swine Practitioners Newsletter* 1, 1-10.
- 65 Kim, H.S., et al., 1993. Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch Virol* 133, 477-483.

- Kristiansen M, et al., 2001. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*. 409:198-201.
- Kwon DN, et al., Production of biallelic CMP-Neu5Ac hydroxylase knock-out pigs. *Sci Rep* 2013; 3:1981.
- 5 Ladinig, A., et al., 2015. Pathogenicity of three type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains in experimentally inoculated pregnant gilts. *Virus Res* 203, 24-35.
- Lai L, et al., Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science* 2002; 295:1089-1092.
- 10 Lai L, et al., Creating genetically modified pigs by using nuclear transfer. *Reprod Biol Endocrinol* 2003; 1:82.
- Lai L, et al., Production of cloned pigs by using somatic cells as donors. *Cloning Stem Cells* 2003; 5:233-241.
- 15 Lawson SR, et al., 1997. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of gnotobiotic pigs: sites of virus replication and co-localization with MAC-387 staining at 21 days post-infection. *Virus Res*. 51:105-113.
- Lee K, et al., Engraftment of human iPS cells and allogeneic porcine cells into pigs with inactivated RAG2 and accompanying severe combined immunodeficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111:7260-7265.
- 20 Lee K, et al., Piglets produced from cloned blastocysts cultured in vitro with GM-CSF. *Mol Reprod Dev* 2013; 80: 145-154.
- Li D, et al., Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system. *Nat Biotechnol* 2013; 31:681-683.
- 25 Lillico SG, et al., Live pigs produced from genome edited zygotes. *Sci Rep* 2013; 3:2847.
- Machaty Z, et al., Complete activation of porcine oocytes induced by the sulfhydryl reagent, thimerosal. *Biol Reprod* 1997; 57:1123-1127.
- 30 Madsen M, et al., 2004. Molecular characterization of the haptoglobin-hemoglobin receptor CD 163. Ligand binding properties of the scavenger receptor cysteine-rich domain region. *J Biol Chem*. 279:51561-51567.
- 35 Merck, The Merck Veterinary Manual. http://www.merckmanuals.com/vet/appendixes/reference_guides/normal_rectal_temperature_ranges.html.
- Miao, Y.L., et al., 2009. Centrosome abnormalities during porcine oocyte aging. *Environmental and molecular mutagenesis* 50, 666-671.
- 40 Morgan SB, et al., 2014. Pathology and Virus Distribution in the Lung and Lymphoid Tissues of Pigs Experimentally Inoculated with Three Distinct Type 1 PRRS Virus Isolates of Varying Pathogenicity. *Transbound Emerg Dis*. Nov 10. pp 1-11.
- 45 Nelsen CJ, et al., 1999. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus comparison: divergent evolution on two continents. *J. Virol*. 73, 270-280.
- Neumann EJ, et al., Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 2005; 227:385-392.
- 50 Niu Y, et al., Generation of gene-modified Cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell* 2014; 156:836-843.
- Patience, J.F., et al., 1989. Swine Nutrition Guide, in: Center, P.S. (Ed.), University of Saskatchewan, Saskatoon, CA, pp. 149-171.
- 55 Patton JP, et al., 2008. Modulation of CD163 receptor expression and replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine macrophages. *Virus Res*. 140: 161-171.
- 60 Prather RS, et al., An intact sialoadhesin (Sn/SIGLEC1/CD 169) is not required for attachment/ internalization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol* 2013; 87:9538-9546.
- Prather, R.S., et al., 2013. An intact sialoadhesin (Sn/SIGLEC1/CD169) is not required for attachment/internalization of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol* 87, 9538-9546.
- 65 Provost C, et al., 2012. Identification of a new cell line permissive to porcine reproductive and respiratory

syndrome virus infection and replication which is phenotypically distinct from MARC-145 cell line. *Viro J.* 9:267.

Reed JL, et al., 1938. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene* 27:493-497.

Ross JW, et al., Optimization of square-wave electroporation for transfection of porcine fetal fibroblasts. *Transgenic Res* 2010; 19:611-620.

Rowland, R.R., et al., 2012. Control of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) through genetic improvements in disease resistance and tolerance. *Frontiers in genetics* 3, 260.

Sanchez C, et al., 1999. The porcine 2A10 antigen is homologous to human CD163 and related to macrophage differentiation. *Journal of Immunology* 162:5230-5237.

Sánchez-Torres C, et al., 2003. Expression of porcine CD163 on monocytes/macrophages correlates with permissiveness to African swine fever infection. *Arch Virol.* 148:2307-2323.

Schaer, C.A., et al., 2006a. Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin. *Circulation research* 99, 943-950.

Schaer, D.J., et al., 2006b. CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin. *Blood* 107, 373-380.

Schaer, D.J., et al., 2006c. Hemophagocytic macrophages constitute a major compartment of heme oxygenase expression in sepsis. *European journal of haematology* 77, 432-436.

Shanmukhappa, K, et al., 2007. Role of CD151, A tetraspanin, in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Viro J.* 4:62.

Shimozawa N, et al., Abnormalities in cloned mice are not transmitted to the progeny. *Genesis* 2002; 34:203-207.

Smit, AFA, et al., RepeatMasker Open-3.0. 1996-2010. Current Version: open-4.0.5 (RMLib: 20140131 and Dfam: 1.2). [http:// www.repeatmasker.org](http://www.repeatmasker.org)>. CD163: accessed July 25, 2014; CD1D: accessed August 27, 2013.

Soares MP, et al., 2009. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential. *Trends Mol Med.* 15:50-58.

Stein M, et al.,1992. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med.* 176:287-292.

Stephenson R, et al., 2015. Multiplex serology for common viral infections in feral pigs in Hawaii between 2007 and 2010. Accepted for publication. *J Wildlife Dis* 51:239-2343.

Sulahian TH1, et al., 2002. 2002. Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. *Cytokine.* 2000 12:1312-1321.

Terns MP, et al., CRISPR-based adaptive immune systems. *Curr Opin Microbiol* 2011; 14:321-327.

Tribble, B.R., et al., 2012. Recognition of the different structural forms of the capsid protein determines the outcome following infection with porcine circovirus type 2. *J Virol* 86, 13508-13514.

U.S. Department of Agriculture and U.S. Department of Health and Human Services. *Dietary Guidelines for Americans*, 2010. 7th Edition,

Van Breedam W, et al., Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. *J Gen Virol* 2010; 91:1659-1667.

Van Breedam, W., et al., 2010. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus entry into the porcine macrophage. *J Gen Virol* 91, 1659-1667.

Van den Heuvel MM, et al., 1999. Regulation of CD 163 on human macrophages: cross-linking of CD163 induces signaling and activation. *J Leukoc Biol.* 66:858-866.

van den Hoff MJ, et al., Electroporation in 'intracellular' buffer increases cell survival. *Nucleic Acids Res* 1992; 20:2902.

- Van Gorp, H., et al., 2010. Scavenger receptor CD163, a Jack-of-all-trades and potential target for cell-directed therapy. *Mol Immunol* 47, 1650-1660.
- 5 Van Gorp H, et al., 2010. Identification of the CD163 protein domains involved in infection of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Virol.* 84:3101-3105.
- Walters EM, et al., Advancing swine models for human health and diseases. *Mo Med* 2013; 110:212-215.
- 10 Wang H, et al., One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 2013; 153: 910-918.
- Welch SK, et al., 2010. A brief review of CD163 and its role in PRRSV infection. *Virus Res.* 154:98-103.
- 15 Wells, K.D., et al., 2014. Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from in vitro-derived oocytes and embryos. *Biol Reprod* 91, 78.
- Wensvoort, G., et al., 1991. Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Veterinary Quarterly* 13, 121-130.
- 20 Whitworth KM, et al., 2016. CD163 facilitates both entry and replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Nature Biotech.* 34:20-22.
- Whitworth KM, et al., Method of oocyte activation affects cloning efficiency in pigs. *Mol Reprod Dev* 2009;76:490-500.
- 25 Whitworth KM, et al., Activation method does not alter abnormal placental gene expression and development in cloned pigs. *Mol Reprod Dev* 2010; 77:1016-1030.
- Whitworth KM, et al., Scriptaid corrects gene expression of a few aberrantly reprogrammed transcripts in nuclear transfer pig blastocyst stage embryos. *Cell Reprogram* 2011; 13:191-204.
- 30 Whitworth, K.M., et al., 2014. Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from in vitro-derived oocytes and embryos. *Biol Reprod* 91, 78.
- 35 Whyte JJ, et al., Genetic modifications of pigs for medicine and agriculture. *Mol Reprod Dev* 2011; 78:879-891.
- Whyte JJ, et al., Gene targeting with zinc finger nucleases to produce cloned eGFP knockout pigs. *Mol Reprod Dev* 2011; 78:2.
- 40 Wiedenheft B, et al., RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 2012; 482:331-338.
- Winckler, C., et al., 2001. The reliability and repeatability of a lameness scoring system for use as an indicator of welfare in dairy cattle. *Acta Agricultura Scandinavica Section A. Animal Science*, 103-107.
- 45 Yang D, et al., Generation of PPARgamma mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning. *Cell Res* 2011; 21:979-982.
- Yoshioka K, et al., Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol Reprod* 2002; 66:112-119.
- 50 Zhang Q, et al., 2015. PRRS virus receptors and their role for pathogenesis. *Vet Microbiol.* 177:229-241.
- Zhao J, et al., Histone deacetylase inhibitors improve in vitro and in vivo developmental competence of somatic cell nuclear transfer porcine embryos. *Cell Reprogram* 2010; 12:75-83.
- 55 Zhao J, et al., Significant improvement in cloning efficiency of an inbred miniature pig by histone deacetylase inhibitor treatment after somatic cell nuclear transfer. *Biol Reprod* 2009; 81:525-530.

TABLA DE SECUENCIAS

SEQ	TIPO	DESCRIPCIÓN
SEQ ID NO: 1	nucleótido	CRISPR 10
SEQ ID NO: 2	nucleótido	CRISPR 131
SEQ ID NO: 3	nucleótido	CRISPR 256
SEQ ID NO: 4	nucleótido	CRISPR 282
SEQ ID NO: 5	nucleótido	CRISPR 4800
SEQ ID NO: 6	nucleótido	CRISPR 5620
SEQ ID NO: 7	nucleótido	CRISPR 5626
SEQ ID NO: 8	nucleótido	CRISPR 5350
SEQ ID NO: 9	nucleótido	eGFP1
SEQ ID NO: 10	nucleótido	eGFP2
SEQ ID NO: 11	nucleótido	fragmento de cebador directo 9538
SEQ ID NO: 12	nucleótido	fragmento de cebador inverso 9538
SEQ ID NO: 13	nucleótido	fragmento de cebador directo 8729
SEQ ID NO: 14	nucleótido	fragmento de cebador directo 8729
SEQ ID NO: 15	nucleótido	CD163 DE TIPO SILVESTRE
SEQ ID NO: 16	nucleótido	Figura 4, panel C TS
SEQ ID NO: 17	nucleótido	Figura 4, panel C N.º 1
SEQ ID NO: 18	nucleótido	Figura 4, panel C N.º 2
SEQ ID NO: 19	nucleótido	Figura 4, panel C N.º 3
SEQ ID NO: 20	nucleótido	Figura 5, panel A TS
SEQ ID NO: 21	nucleótido	Figura 5, panel A N.º 1-1
SEQ ID NO: 22	nucleótido	Figura 5, panel A N.º 1-4
SEQ ID NO: 23	nucleótido	Figura 5, panel A N.º 2-2
SEQ ID NO: 24	nucleótido	Figura 6, panel C CD163 de TS
SEQ ID NO: 25	nucleótido	Figura 6, panel C CD163 N.º 1
SEQ ID NO: 26	nucleótido	Figura 6, panel C CD163 N.º 2
SEQ ID NO: 27	nucleótido	Figura 6, panel C CD163 N.º 3
SEQ ID NO: 28	nucleótido	Figura 6, panel C eGFP de TS
SEQ ID NO: 29	nucleótido	Figura 6, panel C eGFP N.º 1-1
SEQ ID NO: 30	nucleótido	Figura 6, panel C eGFP N.º 1-2
SEQ ID NO: 31	nucleótido	Figura 6, panel C eGFP N.º 2
SEQ ID NO: 32	nucleótido	Fig.6, panel C eGFP N.º 3
SEQ ID NO: 33	nucleótido	Figura 7, panel C TS
SEQ ID NO: 34	nucleótido	Figura 7, panel C N.º 67-1
SEQ ID NO: 35	nucleótido	Figura 7, panel C N.º 67-2 a1
SEQ ID NO: 36	nucleótido	Figura 7, panel C N.º 67-2 a2
SEQ ID NO: 37	nucleótido	Figura 7, panel C N.º 67-3
SEQ ID NO: 38	nucleótido	Figura 7, panel C N.º 67-4 a1
SEQ ID NO: 39	nucleótido	Figura 7, panel C N.º 67-4 a2
SEQ ID NO: 40	nucleótido	Figura 8, panel D TS
SEQ ID NO: 41	nucleótido	Figura 8, panel D N.º 166-1.1
SEQ ID NO: 42	nucleótido	Figura 8, panel D N.º 166-1.2
SEQ ID NO: 43	nucleótido	Figura 8, panel D N.º 166-2
SEQ ID NO: 44	nucleótido	Figura 8, panel D N.º 166-3.1
SEQ ID NO: 45	nucleótido	Figura 8, panel D N.º 166-3.2
SEQ ID NO: 46	nucleótido	Figura 8, panel D N.º 166-4
SEQ ID NO: 47	nucleótido	Fig. 16 CD163 de TS parcial
SEQ ID NO: 48-67	nucleótido	Secuencias de cebadores (Tabla 1)
SEQ ID NO: 68-79	nucleótido	Secuencias de cebadores (Tabla 2)
SEQ ID NO: 80-85	nucleótido	Secuencias de cebadores (Tabla 3)
SEQ ID NO: 86-97	nucleótido	Secuencias de cebadores (Tabla 4)
SEQ ID NO: 98	nucleótido	Alelo con supresión de 1506 pb
SEQ ID NO: 99	nucleótido	Alelo con inserción de 7 pb
SEQ ID NO: 100	nucleótido	Alelo con supresión de 1280 pb
SEQ ID NO: 101	nucleótido	Alelo con supresión de 1373 pb
SEQ ID NO: 102	nucleótido	Alelo con supresión de 11 pb
SEQ ID NO: 103	nucleótido	Alelo con inserción de 2 pb y supresión de 377 pb
SEQ ID NO: 104	nucleótido	Alelo con supresión de 124 pb
SEQ ID NO: 105	nucleótido	Alelo con supresión de 123 pb
SEQ ID NO: 106	nucleótido	Alelo con inserción de 1 pb
SEQ ID NO: 107	nucleótido	Alelo con supresión de 130 pb
SEQ ID NO: 108	nucleótido	Alelo con supresión de 132 pb
SEQ ID NO: 109	nucleótido	Alelo con supresión de 1467 pb
SEQ ID NO: 110	nucleótido	Alelo con supresión de 1930 pb en el exón 6, supresión de 129 pb en el exón

ES 2 981 381 T3

SEQ ID NO: 111	nucleótido	7 e inserción de 12 pb
SEQ ID NO: 112	nucleótido	Alelo con supresión de 28 pb
SEQ ID NO: 113	nucleótido	Alelo con supresión de 1387 pb
SEQ ID NO: 114	nucleótido	Alelo con supresión de 1382 pb e inserción de 11 pb
SEQ ID NO: 115	nucleótido	Alelo con supresión de 1720 pb
SEQ ID NO: 116	nucleótido	Secuencia insertada para la SEQ. 99
SEQ ID NO: 117	nucleótido	Secuencia insertada para la SEQ.110
SEQ ID NO: 118	nucleótido	Secuencia insertada para la SEQ.113
SEQ ID NO: 119	nucleótido	Secuencia de intercambio de dominio
SEQ ID NO: 120	péptido	Alelo con supresión de 452 pb
SEQ ID NO: 121	péptido	SRCR 5 de CD163 porcino
		Homólogo de SRCR 8 de CD163L1 humano

REIVINDICACIONES

1. Un animal porcino o una célula porcina que comprende al menos una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163, en donde la modificación reduce la susceptibilidad del animal, o la célula, a la infección por un virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRSV), en comparación con la susceptibilidad de un animal o una célula que no comprende una secuencia cromosómica modificada en un gen que codifica una proteína CD163 a la infección por PRRSV, y en donde la secuencia cromosómica modificada comprende una modificación seleccionada del grupo que consiste en:
 - una inserción de 2 pares de bases entre los nucleótidos 3.149 y 3.150 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, con una supresión de 377 pares de bases del nucleótido 2.573 al nucleótido 2.949 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el mismo alelo; una supresión de 1506 pares de bases del nucleótido 1.525 al nucleótido 3.030 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47;
 - una inserción de 7 pares de bases entre el nucleótido 3.148 y el nucleótido 3.149 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1280 pares de bases del nucleótido 2.818 al nucleótido 4.097 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1373 pares de bases del nucleótido 2.724 al nucleótido 4.096 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1467 pares de bases del nucleótido 2.431 al nucleótido 3.897 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 28 pares de bases del nucleótido 3.145 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47;
 - una supresión de 1387 pares de bases del nucleótido 3.145 al nucleótido 4.531 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; una supresión de 1382 pares de bases del nucleótido 3.113 al nucleótido 4.494 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 11 pares de bases que comienza en el nucleótido 3.113;
 - una supresión de 1720 pares de bases del nucleótido 2.440 al nucleótido 4.160 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47; y una supresión de 452 pares de bases del nucleótido 3.015 al nucleótido 3.466 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47.
2. El animal o la célula de la reivindicación 1, en donde la modificación reduce la susceptibilidad del animal o de la célula a un virus PRRSV de Tipo 1, un PRRSV de Tipo 2 o a virus PRRSV tanto de Tipo 1 como de Tipo 2.
3. El animal o la célula de la reivindicación 1 o 2, en donde la modificación reduce la susceptibilidad del animal o de la célula a un aislado de PRRSV seleccionado del grupo que consiste en NVSL 97-7895, KS06-72109, P129, VR2332, CO90, AZ25, MLV-ResPRRS, KS62-06274, KS483 (SD23983), CO84, Lelystad, SD01-08 y combinaciones de los mismos.
4. El animal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el animal es un embrión, un animal juvenil o un adulto.
5. El animal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o la célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el animal es un animal editado genéticamente o en donde la célula es una célula editada genéticamente, en donde el animal o la célula se han editado genéticamente usando una endonucleasa de asentamiento (opcionalmente una endonucleasa de asentamiento diseñada).
6. El animal o la célula de la reivindicación 5, en donde la endonucleasa de asentamiento comprende un sistema de Grupos de repeticiones palindrómicas cortas en intervalos regulares (CRISPR) /Cas, una Nucleasa efectora similar a activadores de la transcripción (TALEN), una Nucleasa de dedos de cinc (ZFN), una proteína de fusión de recombinasa, una meganucleasa o una combinación de las mismas.
7. El animal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 o la célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, 5 o 6, en donde la secuencia cromosómica modificada da como resultado la producción sustancialmente nula de proteína CD163 funcional por parte del animal o de la célula.
8. El animal porcino de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o la célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 5-7, en donde la inserción o la supresión se seleccionan del grupo que consiste en:
 - la inserción de 2 pares de bases entre los nucleótidos 3.149 y 3.150 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, con la supresión de 377 pares de bases del nucleótido 2.573 al nucleótido 2.949 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el mismo alelo;
 - la supresión de 28 pares de bases del nucleótido 3.145 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de

referencia SEQ ID NO: 47;

la supresión de 452 pares de bases del nucleótido 3.015 al nucleótido 3.466 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47;

y combinaciones de los mismos.

5

9. El animal de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 o la célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 5-7, en donde:

la secuencia cromosómica modificada comprende la inserción de 2 pares de bases entre los nucleótidos 3.149 y 3.150 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, con una supresión de 377 pares de bases del nucleótido 2.573 al nucleótido 2.949 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el mismo alelo, y la inserción de 2 pares de bases comprende la inserción del dinucleótido AG;

10

la secuencia cromosómica modificada comprende la inserción de 7 pares de bases entre el nucleótido 3.148 y el nucleótido 3.149 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la inserción de 7 pares de bases comprende la secuencia TACTACT (SEQ ID NO: 115); o

15

la secuencia cromosómica modificada comprende la supresión de 1382 pares de bases del nucleótido 3.113 al nucleótido 4.494 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 11 pares de bases que comienza en el nucleótido 3.113, en donde la inserción de 11 pares de bases comprende la secuencia AGCCAGCGTGC (SEQ ID NO: 117).

20

10. El animal porcino de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 o la célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 5-9, en donde el animal o la célula comprenden:

(a) la inserción de 7 pares de bases entre el nucleótido 3.148 y el nucleótido 3.149 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en un alelo del gen que codifica la proteína CD163; y

25

una supresión de 11 pares de bases del nucleótido 3.137 al nucleótido 3.147 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD163;

(b) la inserción de 7 pares de bases entre el nucleótido 3.148 y el nucleótido 3.149 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en un alelo del gen que codifica la proteína CD163; y

30

la supresión de 1382 pares de bases del nucleótido 3.113 al nucleótido 4.494 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 11 pares de bases que comienza en el nucleótido 3.113 en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD163;

(c) la supresión de 1280 pares de bases del nucleótido 2.818 al nucleótido 4.097 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en un alelo del gen que codifica la proteína CD163; y

35

una supresión de 11 pares de bases del nucleótido 3.137 al nucleótido 3.147 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD163;

(d) la supresión de 1280 pares de bases del nucleótido 2.818 al nucleótido 4.097 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en un alelo del gen que codifica la proteína CD163; y

40

la inserción de 2 pares de bases entre los nucleótidos 3.149 y 3.150 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, con la supresión de 377 pares de bases del nucleótido 2.573 al nucleótido 2.949 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD163;

(e) una supresión de 1930 pares de bases del nucleótido 488 al nucleótido 2.417 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, en donde la secuencia suprimida se reemplaza con una inserción de 12 pares de bases que comienza en el nucleótido 488, y en donde hay una supresión adicional de 129 pares de bases en el exón 7 del nucleótido 3.044 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en un alelo del gen que codifica la proteína CD163; y

45

la inserción de 2 pares de bases entre los nucleótidos 3.149 y 3.150 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, con la supresión de 377 pares de bases del nucleótido 2.573 al nucleótido 2.949 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD163;

50

(f) la supresión de 1467 pares de bases del nucleótido 2.431 al nucleótido 3.897 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en un alelo del gen que codifica la proteína CD163; y

la inserción de 2 pares de bases entre los nucleótidos 3.149 y 3.150 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, con la supresión de 377 pares de bases del nucleótido 2.573 al nucleótido 2.949 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD163;

55

(g) la supresión de 1467 pares de bases del nucleótido 2.431 al nucleótido 3.897 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en un alelo del gen que codifica la proteína CD163; y

una supresión de 11 pares de bases del nucleótido 3.137 al nucleótido 3.147 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD163;

60

(h) una supresión de 11 pares de bases del nucleótido 3.137 al nucleótido 3.147 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en un alelo del gen que codifica la proteína CD163;

y la inserción de 2 pares de bases entre los nucleótidos 3.149 y 3.150 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47, con la supresión de 377 pares de bases del nucleótido 2.573 al nucleótido 2.949 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el otro alelo del gen que codifica la proteína

65

CD163; o

(i) la supresión de 28 pares de bases del nucleótido 3.145 al nucleótido 3.172 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en un alelo del gen que codifica la proteína CD163; y

5 la supresión de 1387 pares de bases del nucleótido 3.145 al nucleótido 4.531 en comparación con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 47 en el otro alelo del gen que codifica la proteína CD163.

10 11. El animal porcino de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 o la célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 5-10, en donde el animal o la célula comprenden una secuencia cromosómica que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 47 en las regiones de dicha secuencia cromosómica fuera de la inserción o la supresión.

15 12. El animal porcino de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o la célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 5-11, en donde el animal o la célula comprenden una secuencia cromosómica que comprende la SEQ ID NO: 98, 99, 100, 101, 103, 109, 111, 112, 113, 114 o 119.

13. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 o 5-12, en donde dicha célula se selecciona del grupo que comprende un espermatozoide, un óvulo o una célula somática.

20 14. La célula de la reivindicación 13, en donde la célula comprende el óvulo y el óvulo comprende un óvulo fecundado.

15. La célula de la reivindicación 13, en donde la célula comprende la célula somática y la célula somática comprende un fibroblasto.

Fig. 1

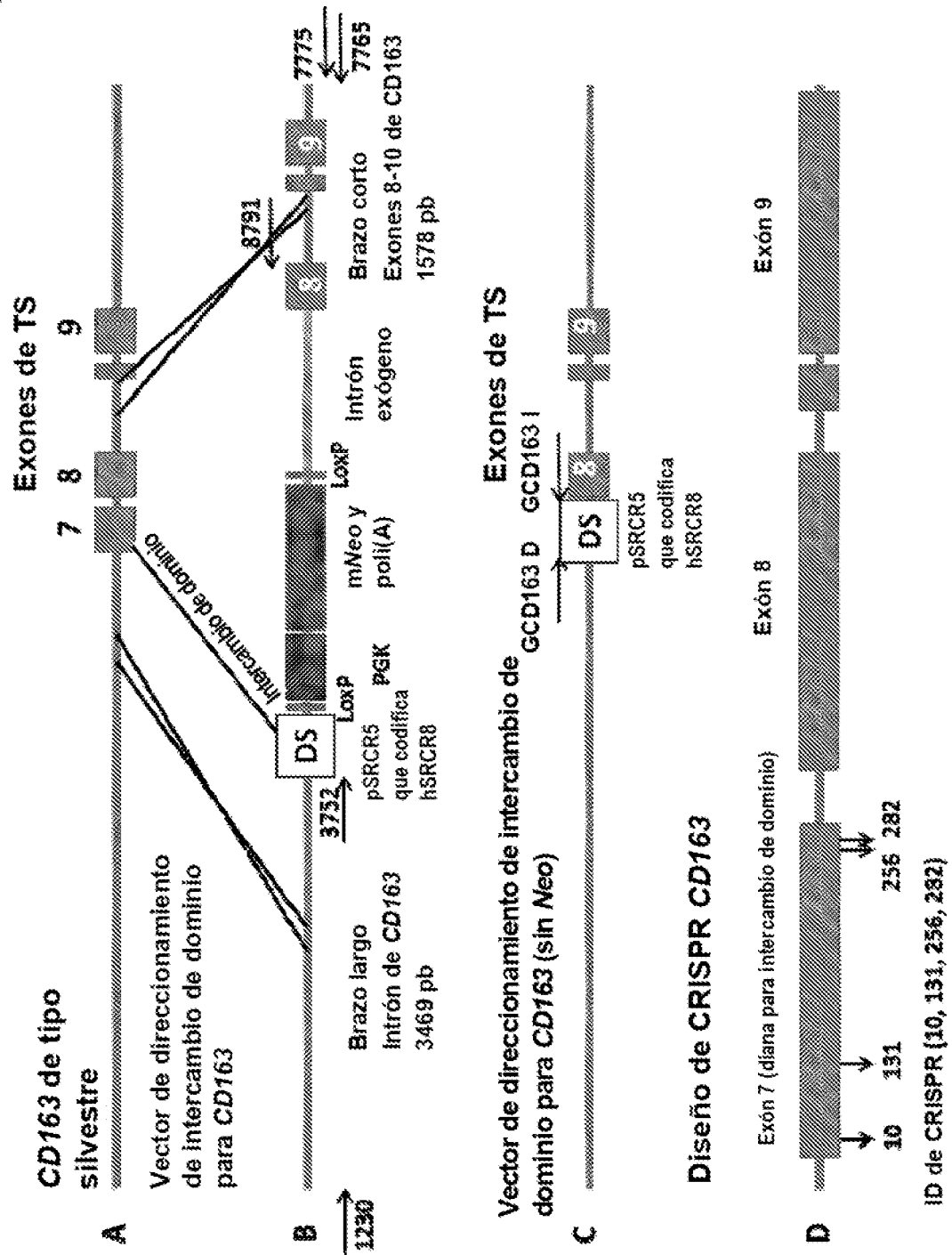


Fig. 2

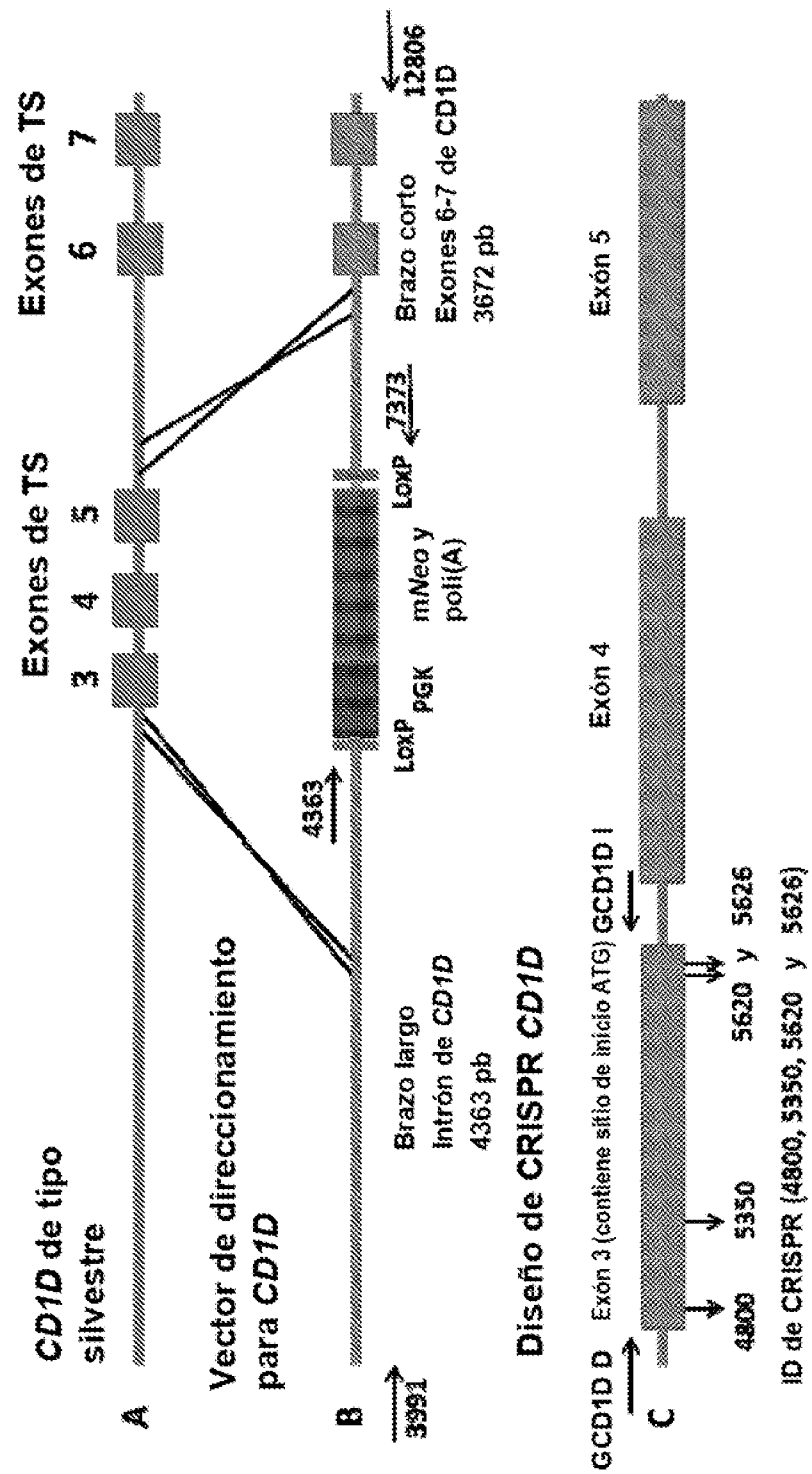


Fig. 3

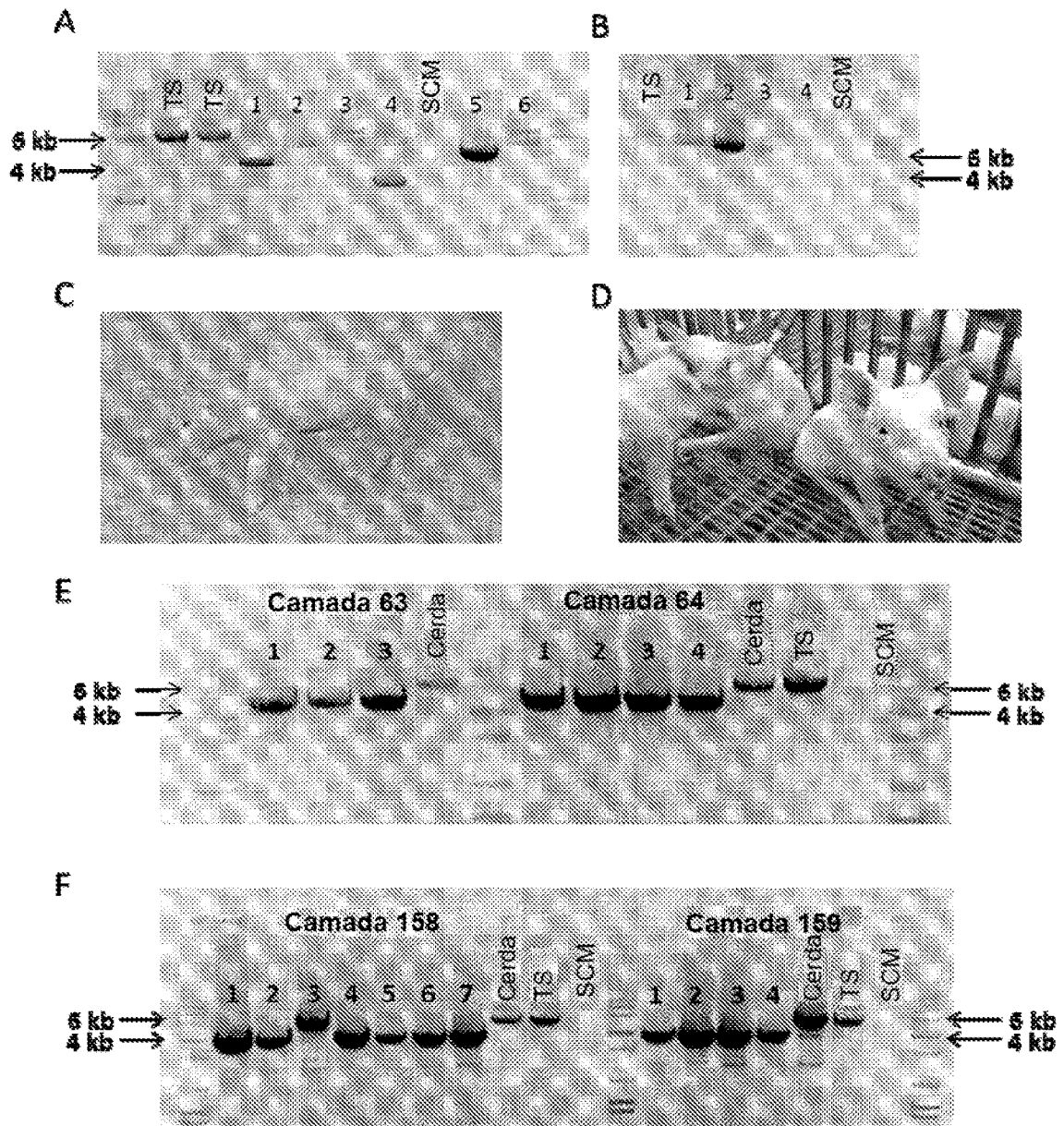


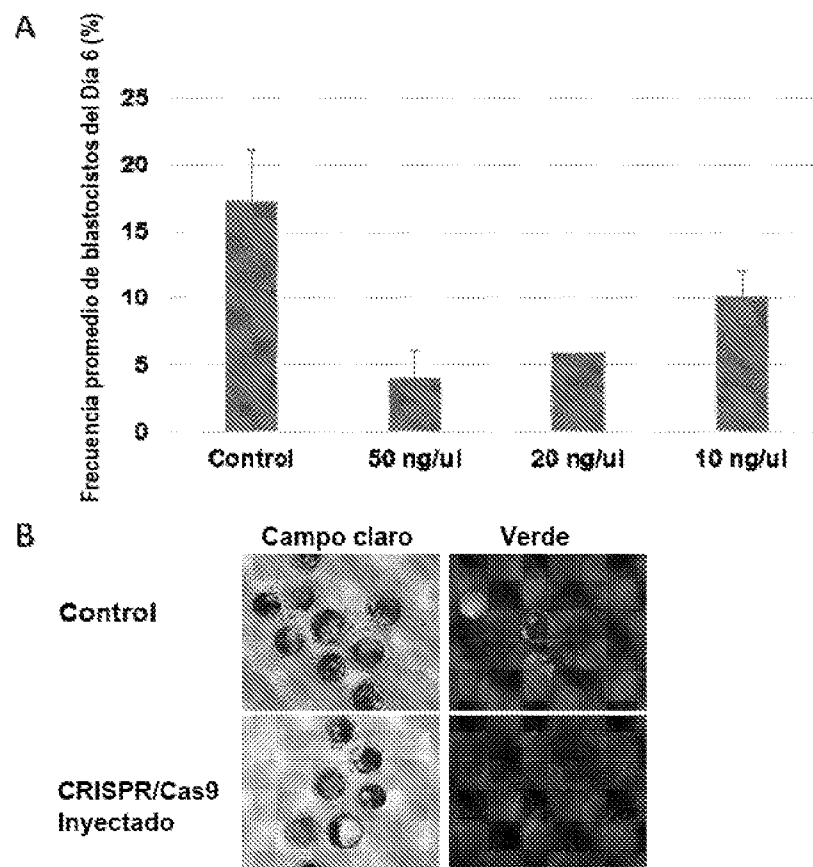
Fig. 4

Fig. 5

A

	SEQ ID NO	
TS	20	TGCAGGGAACTACAGTGGCGCACTGGGTTTCCCTCCGGGGG
#1-1	21	TGCAGGGAACTACAGTGGCGCACTG(+16 bp) TGGTTCCCTCCGGGGG
#1-4	22	TGCAGGGAACTACAGTGGCGC---TGGGTTTCCCTCCGGGGG
#2-2	23	TGCAGGGAACTACAGTGGCGG--AACTACTGTGGTTTCCCTCCGGGGG

B

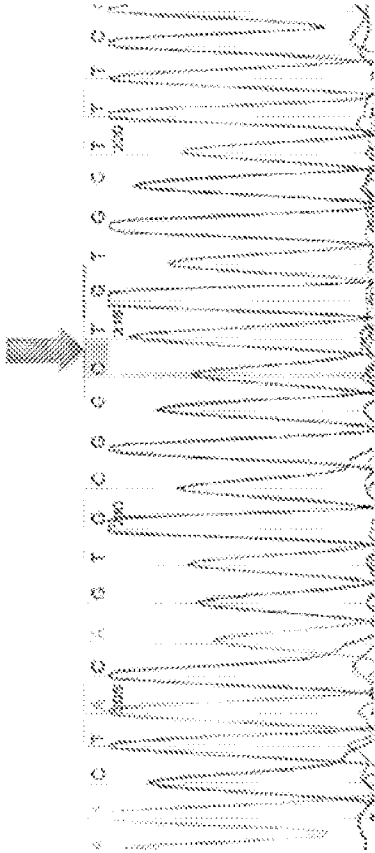
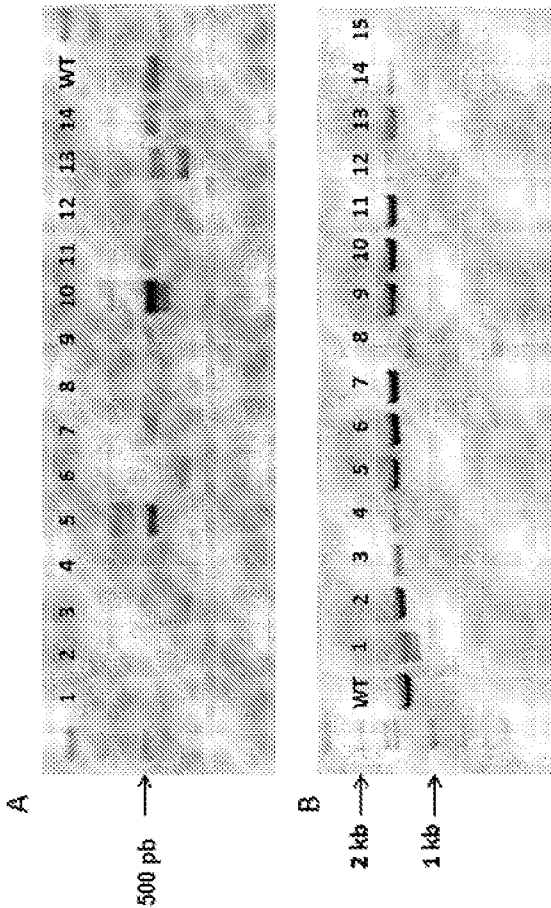


Fig. 6



C

	CD163	SEQ ID NO	eGFP	SEQ ID NO
TS	GAACCCAGGCTGGTGGAGGGACATGCC	24	GGTCGCACACATGGTGGACCAAGGCGAGGAG	28
#1	GAACCCAGGCTGG-----GACATGCC	25	GGTCGCACACATGGCTGGACCAAGGCGAGGAG GGTCGCACACATGGTGGAG---AGGTCGAGGAG	29 30
#2	-(Δ83 pb)-----AGGGACATGCC	26	GGTCGCACACATGGTGGACCAAGGCGAGGAG	31
#3	GAACCCAGGCTGG-----TTCGC	27	GGTCGCACACATGGTGGACCAAGGCGAGGAG+ (17 pb)	32

Fig. 7

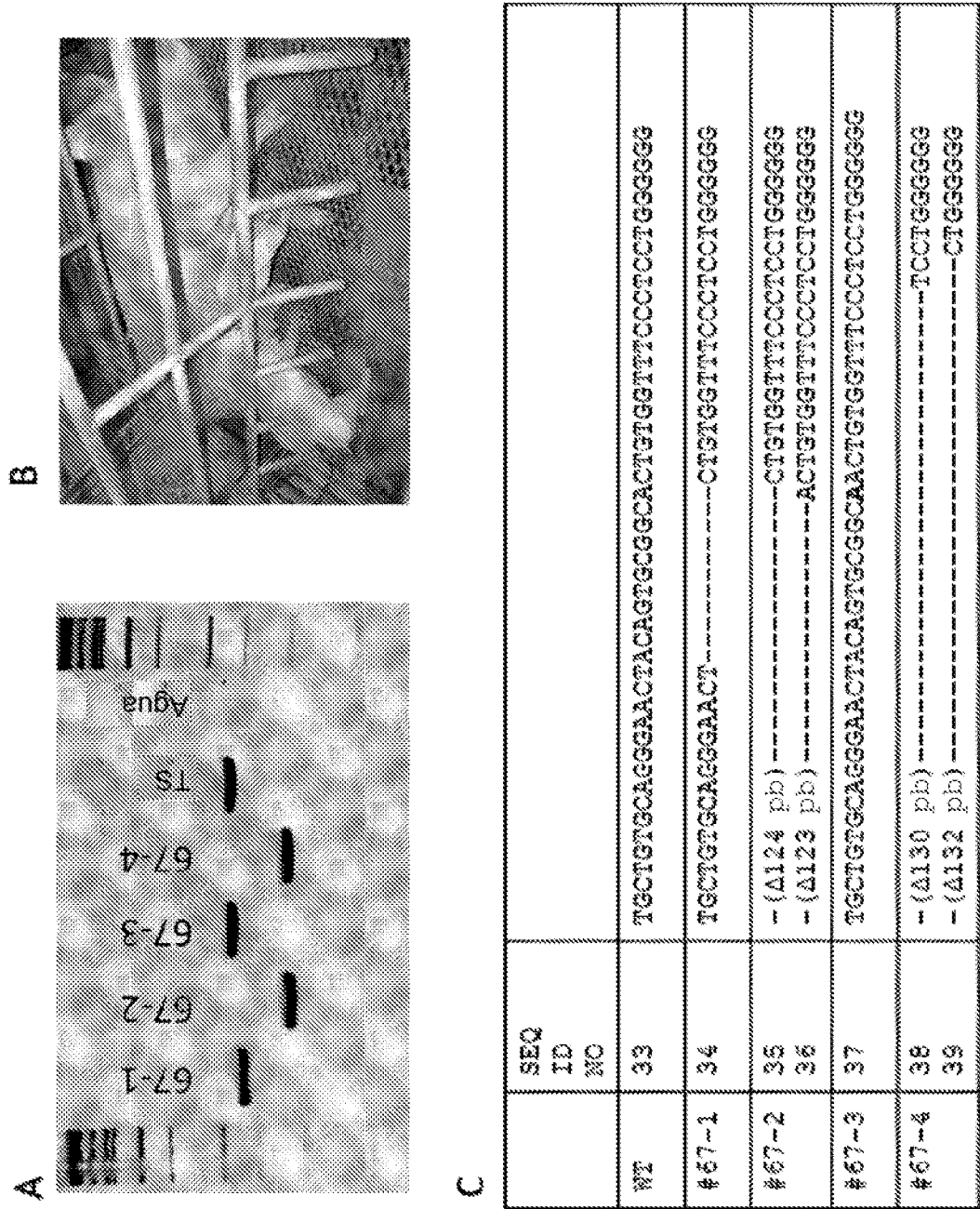


Fig. 8

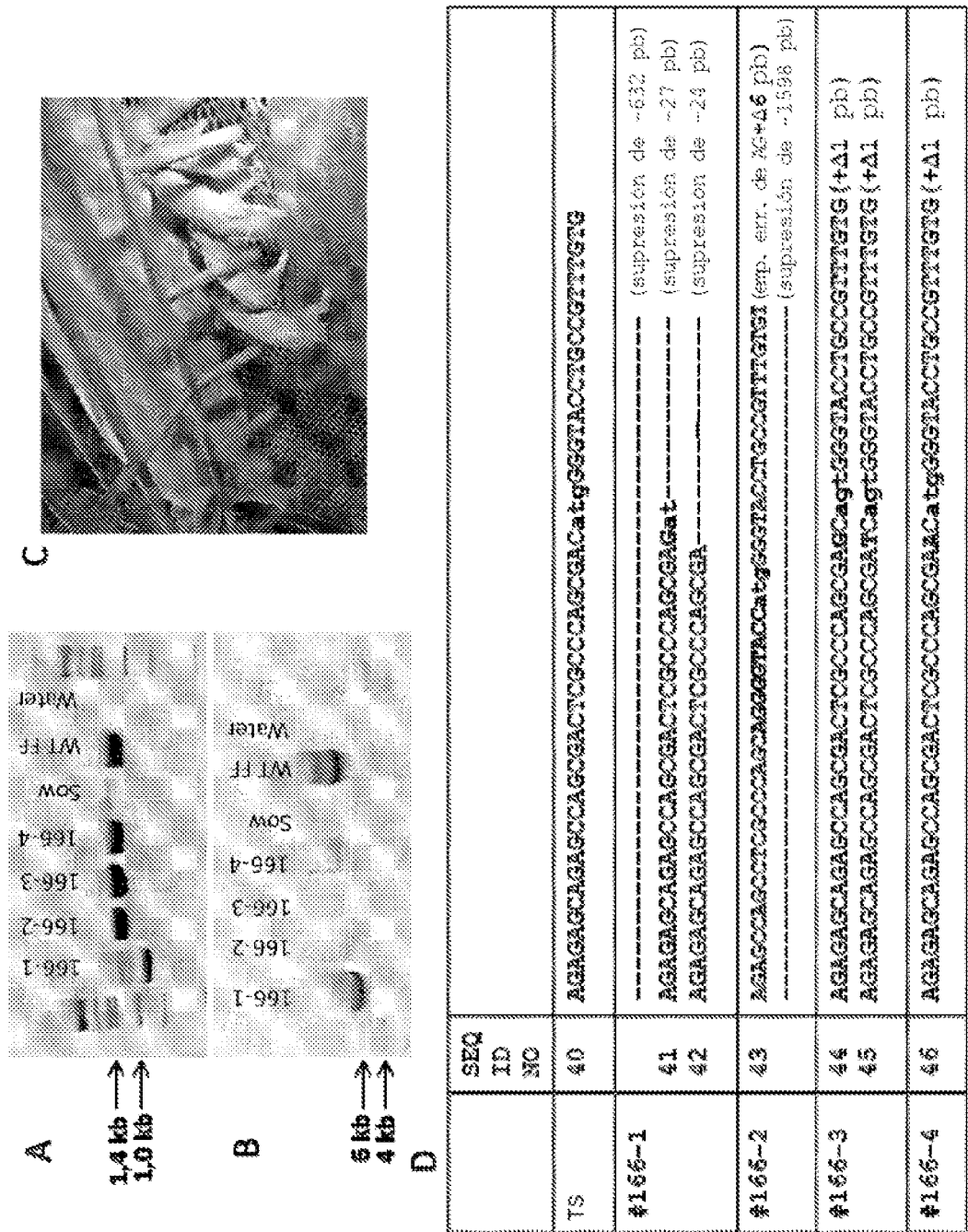


Fig. 9

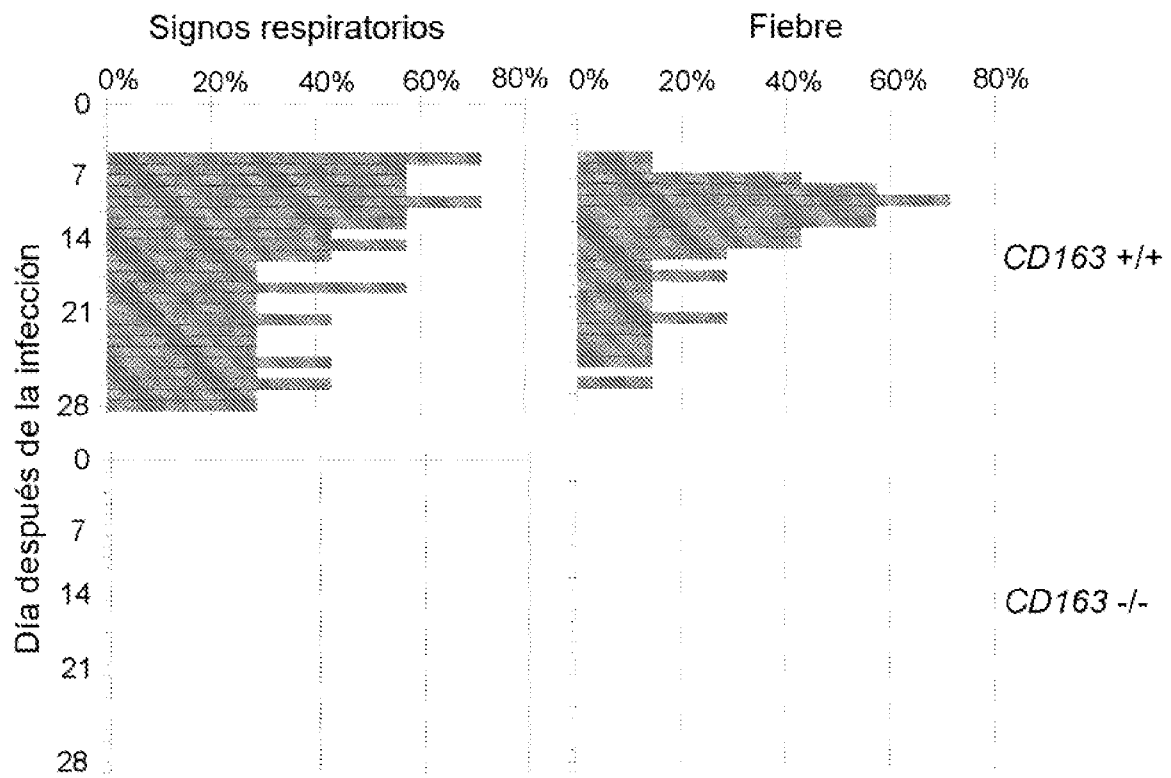


Fig. 10

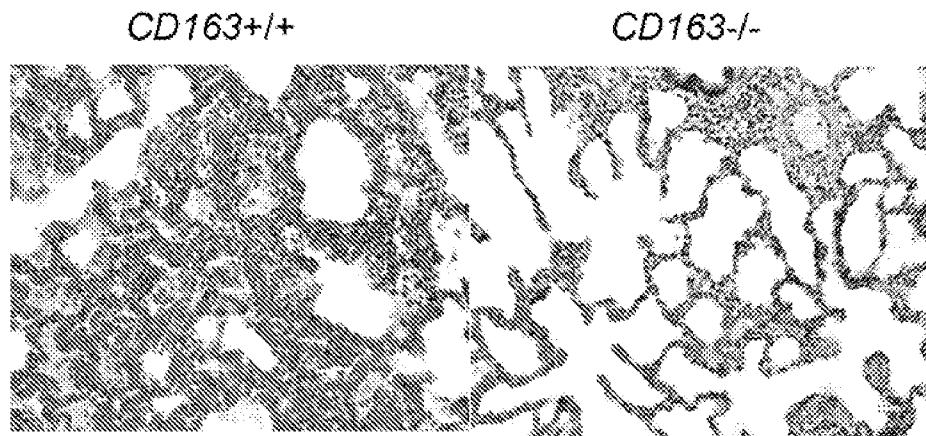


Fig. 11

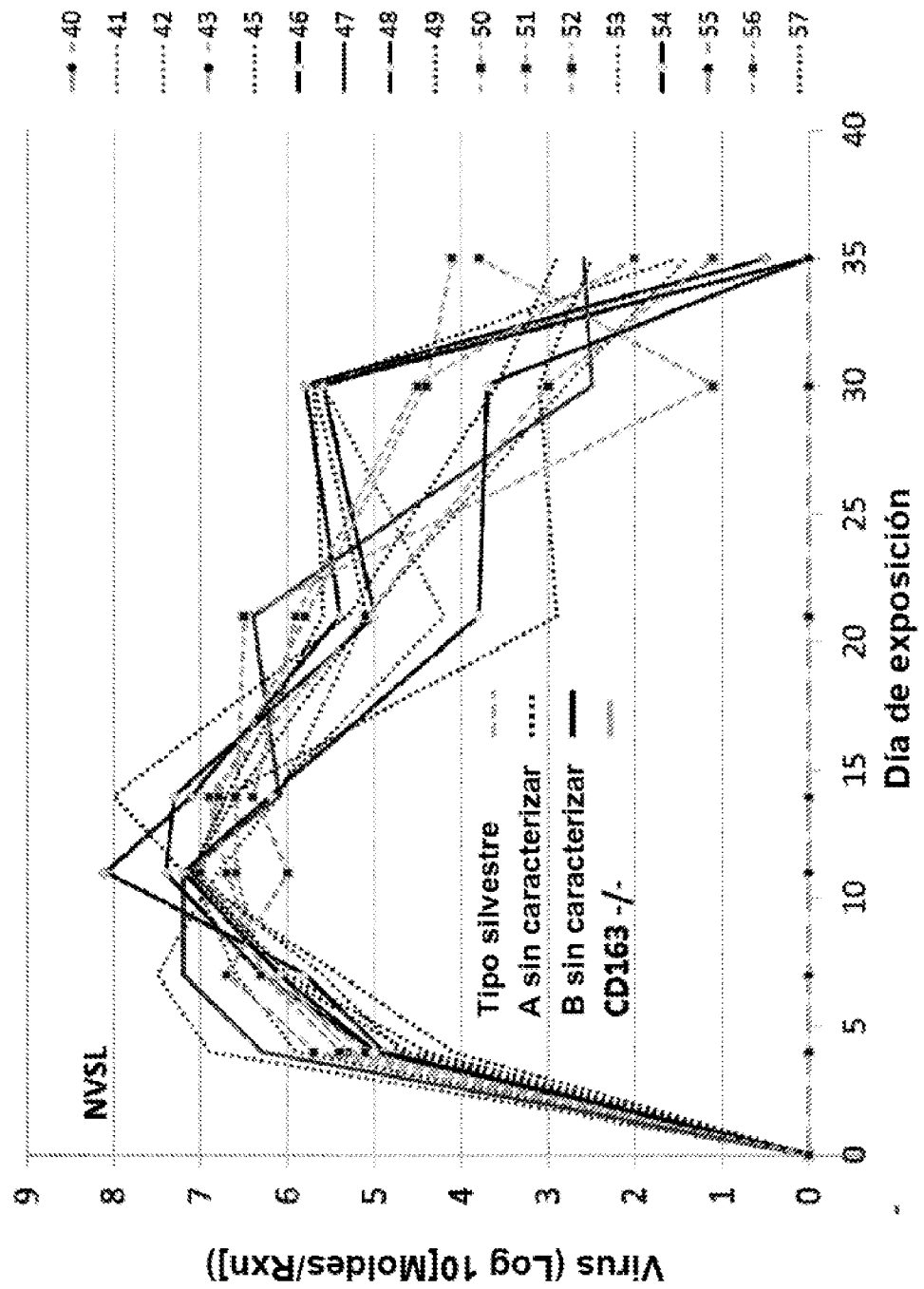


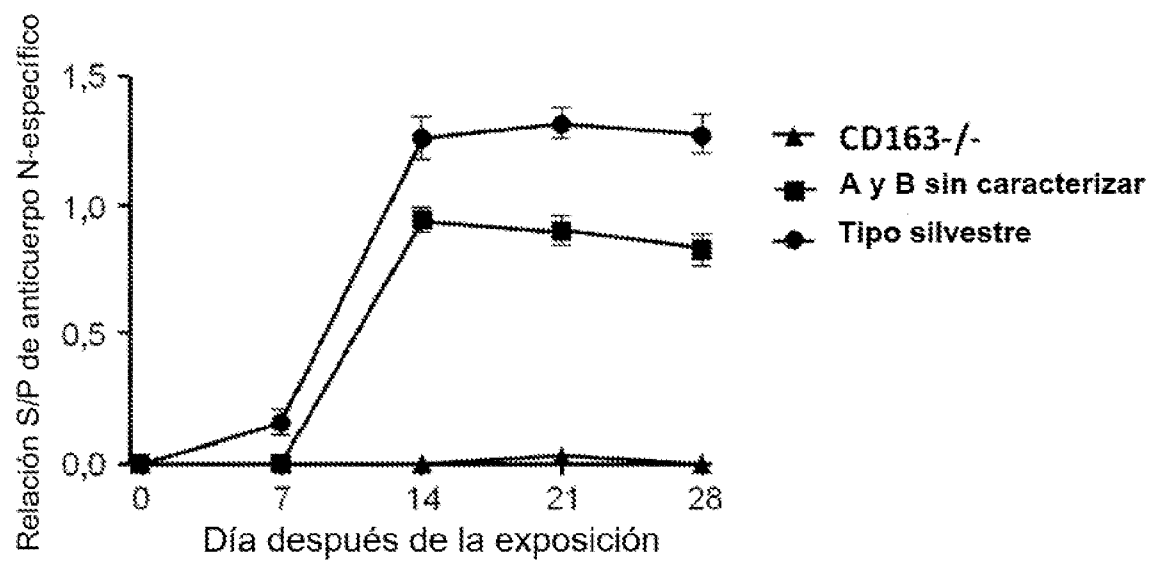
Fig. 12

FIG. 13

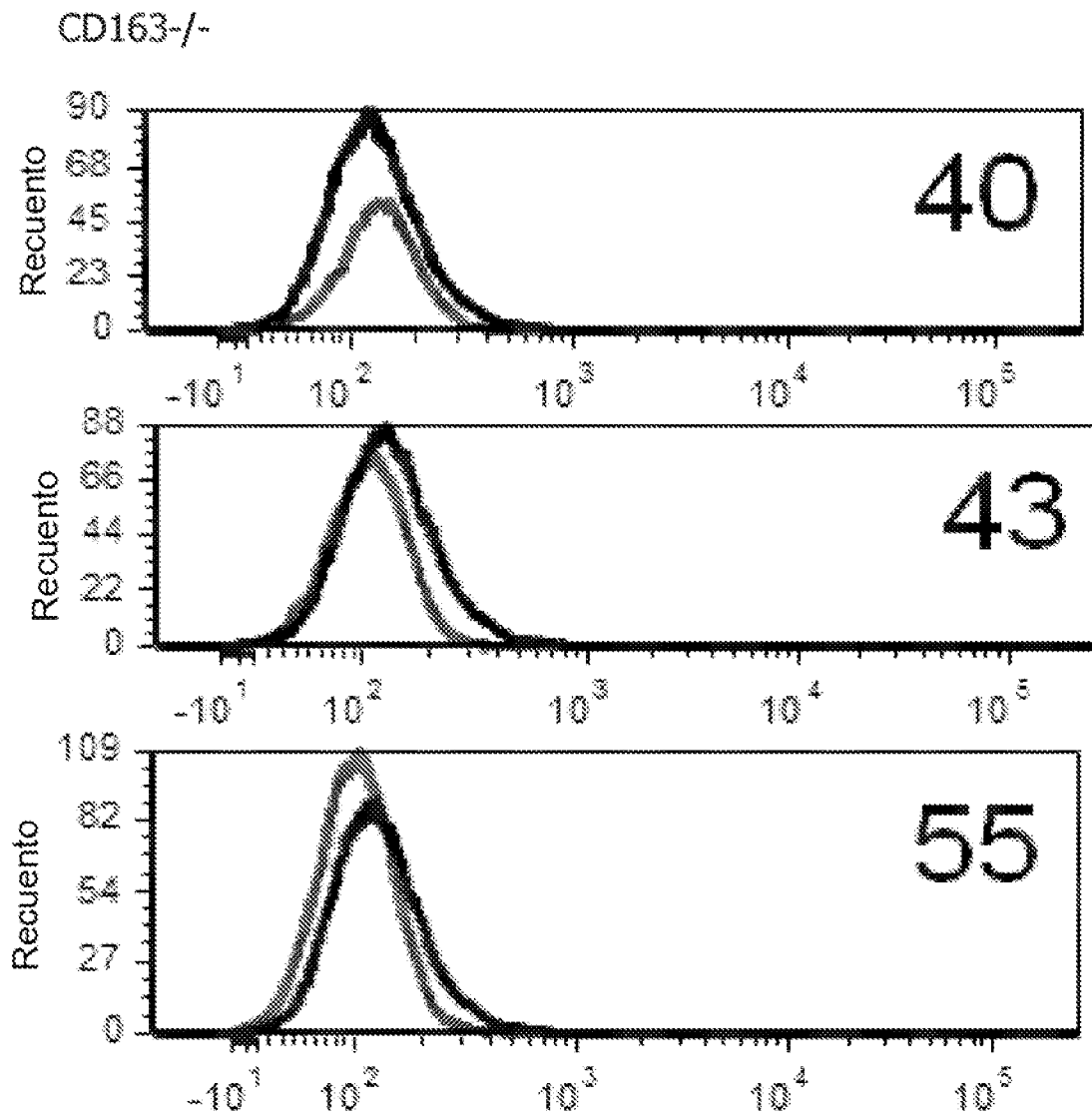


FIG. 13 cont.

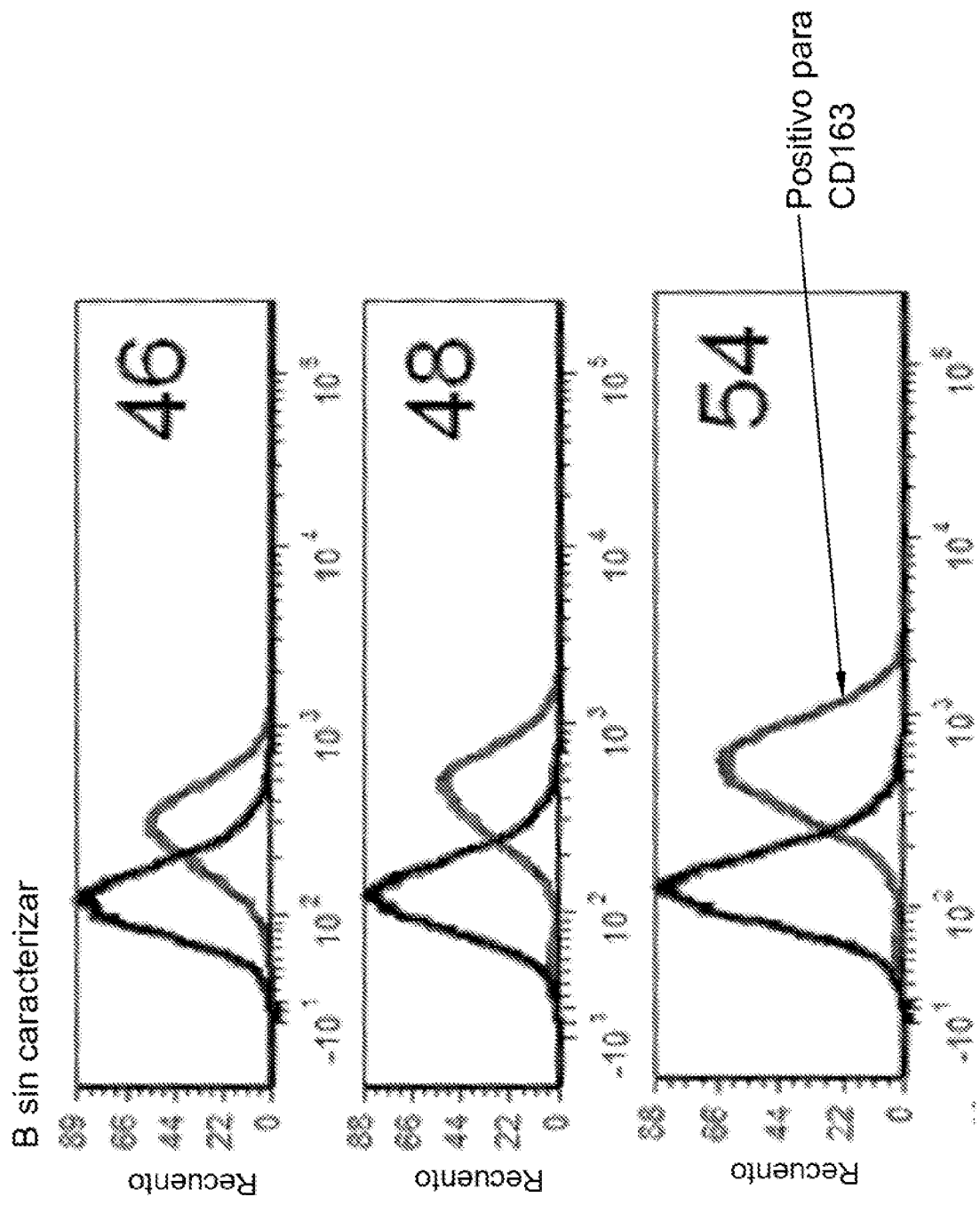


FIG. 13 cont.

A sin caracterizar

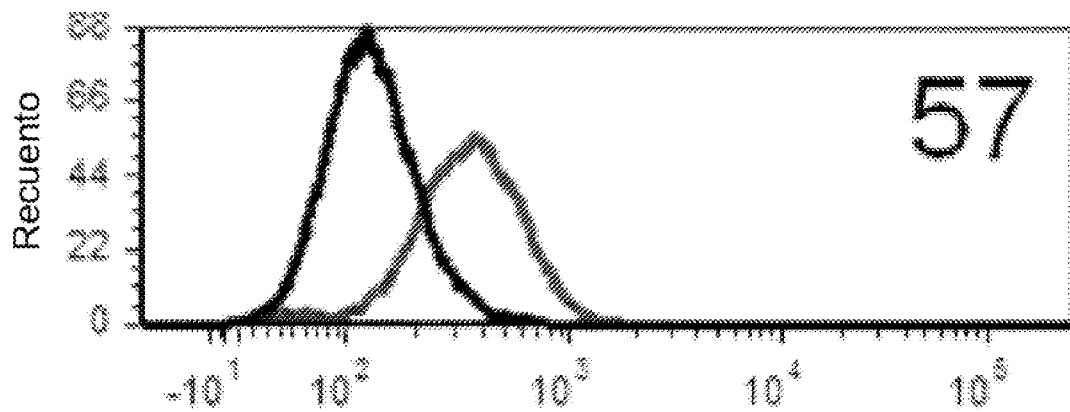
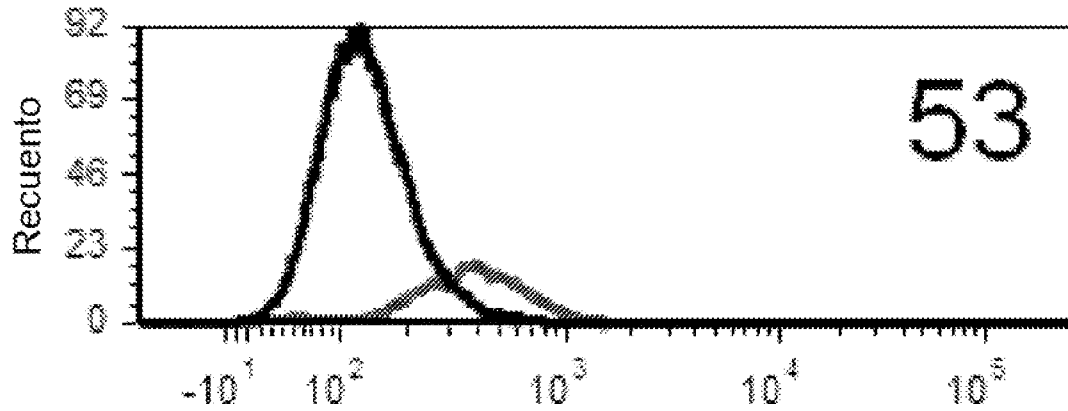
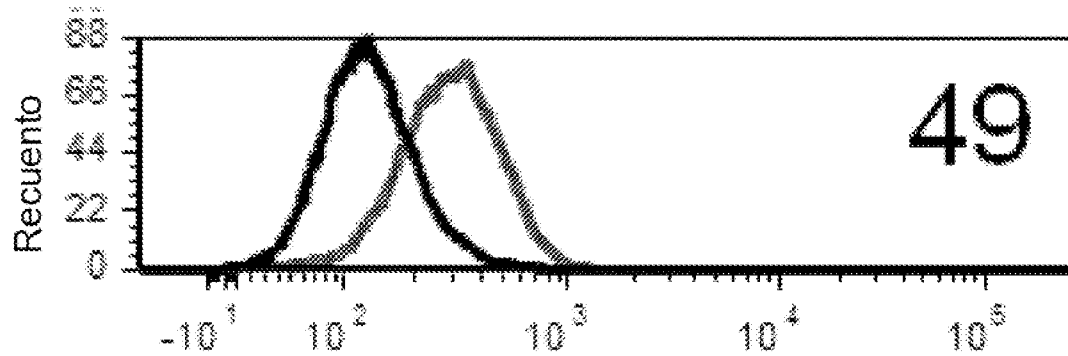
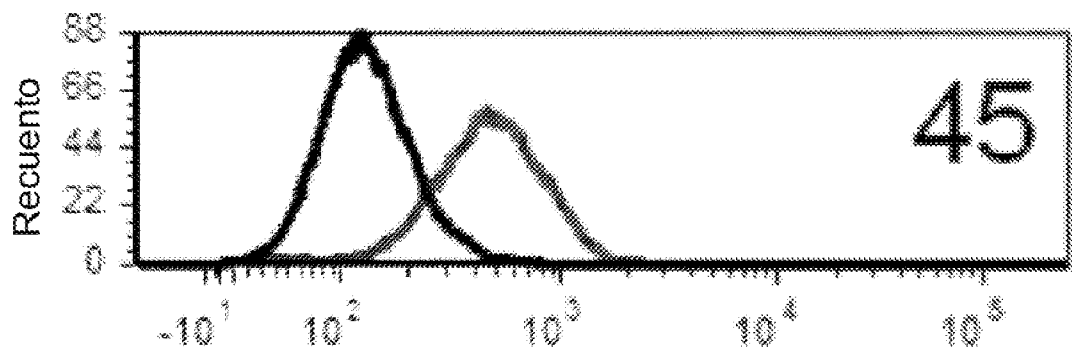


FIG. 13 cont.

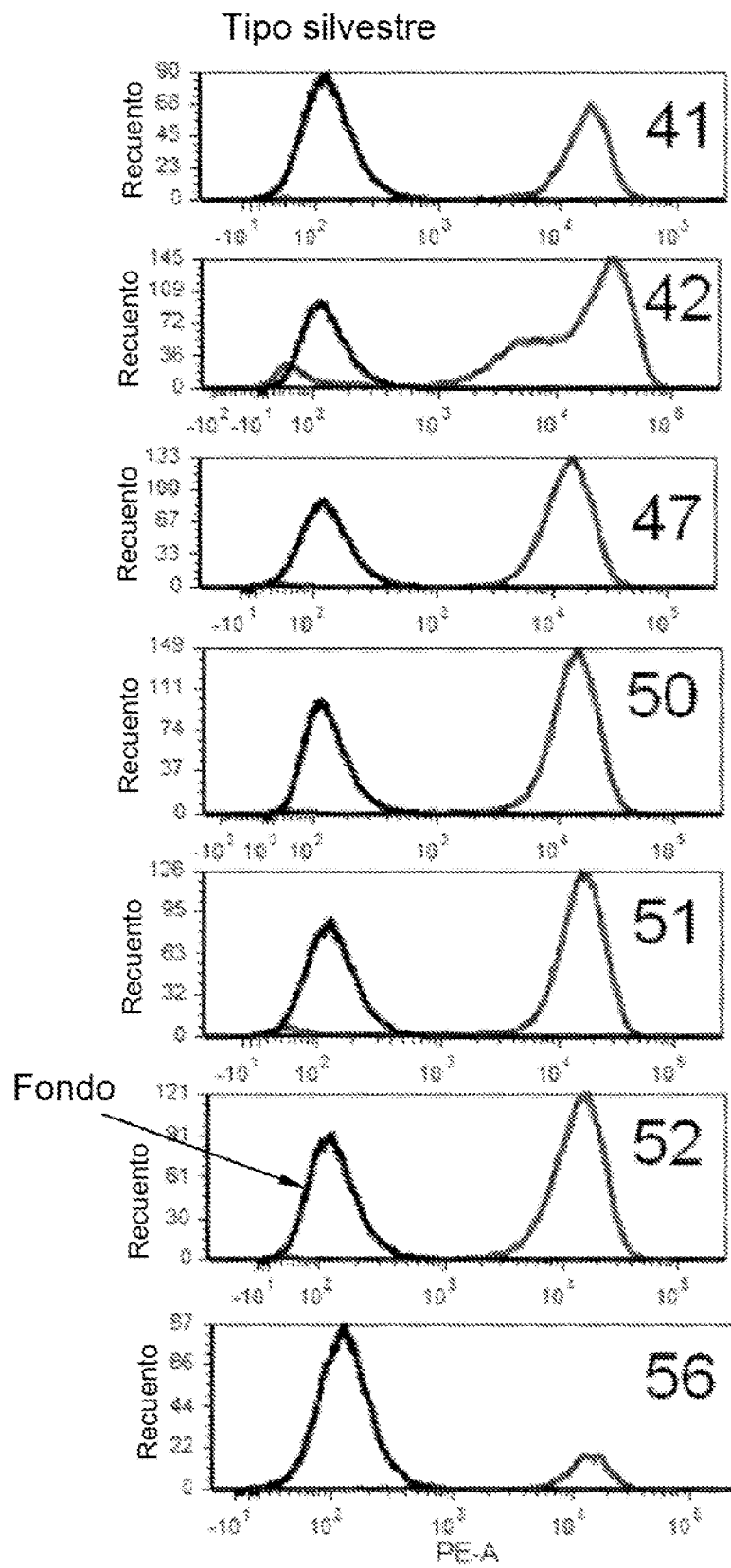


Fig. 14

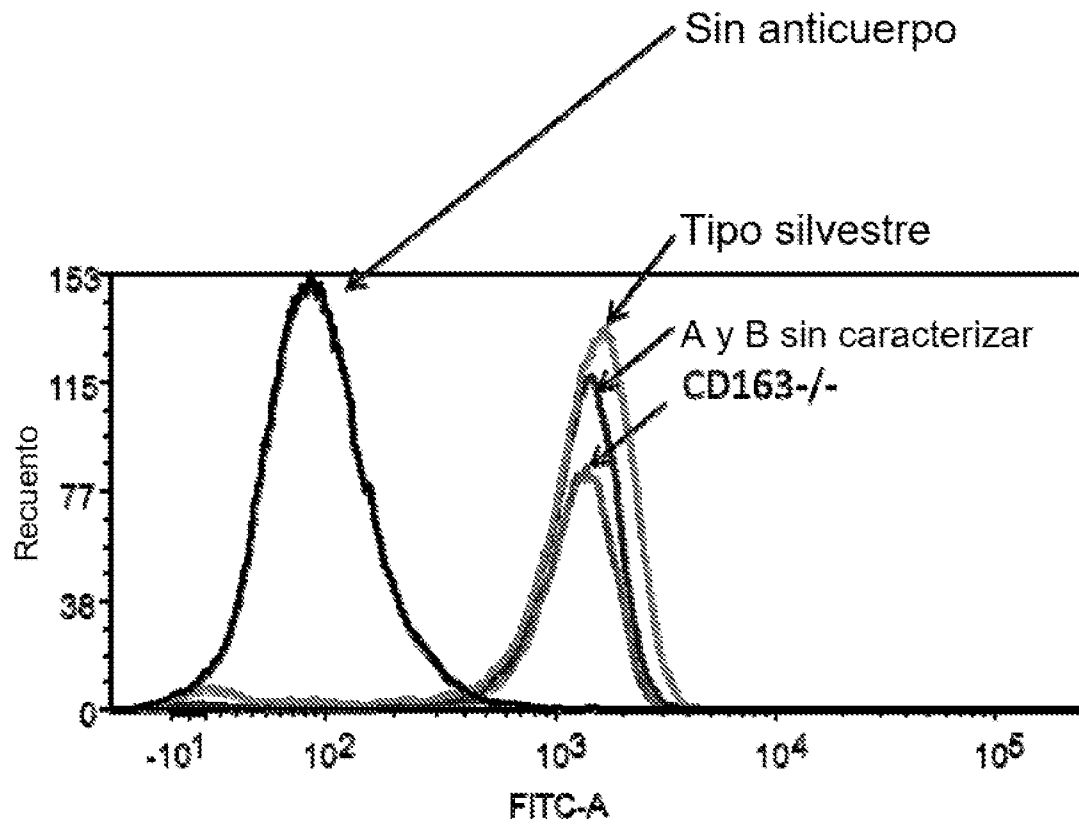


Fig. 15

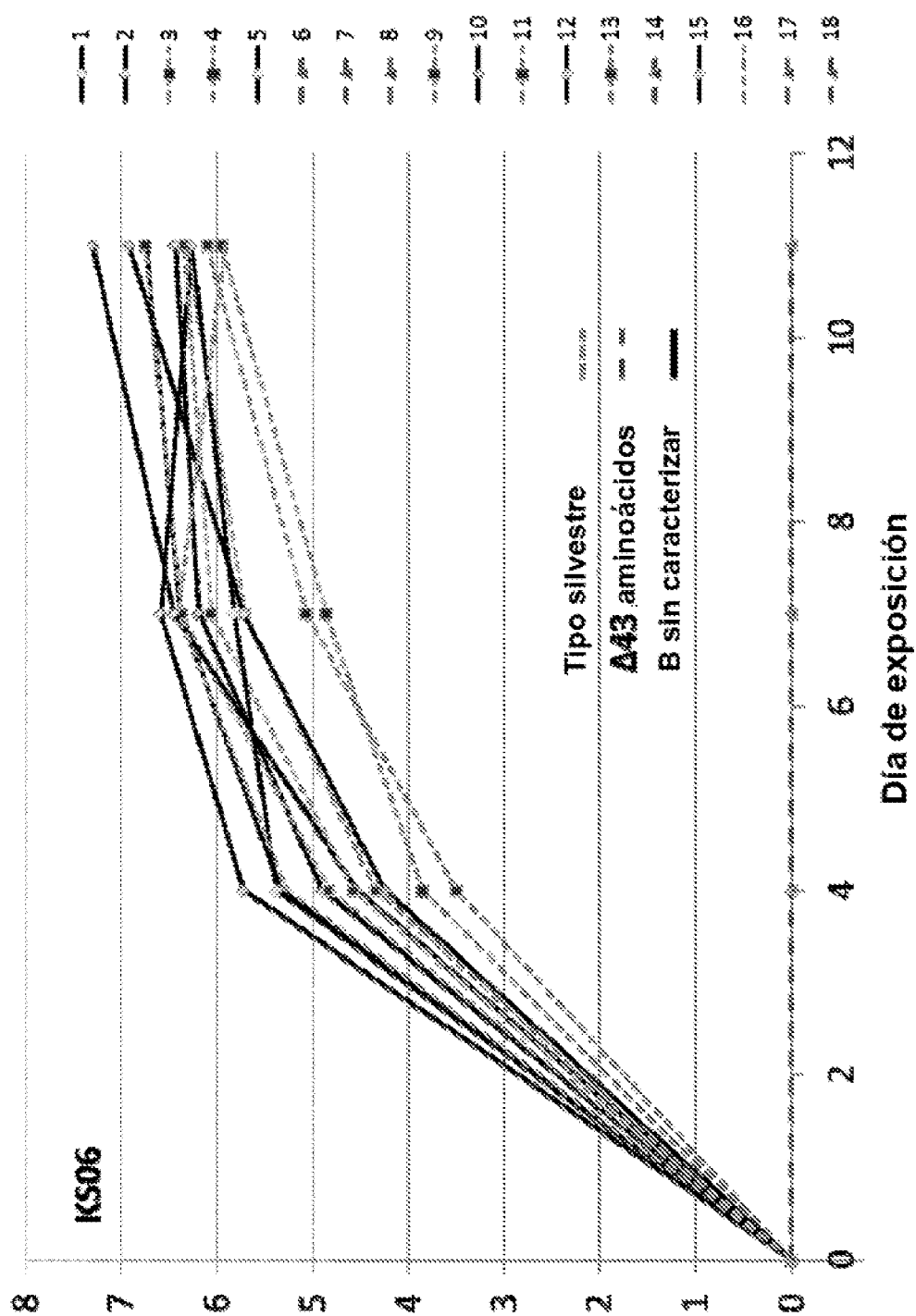


FIG. 16

SEQ ID NO. 47

LOCUS CD163_TS_Referen ADN-bc de 4990 pb lineal
 DEFINICIÓN Gen CD163 de referencia: 3000 pb en dirección 5' del exón 7 con
 exón 10 respecto a la última base del exón 10
 ACCESO
 VERSIÓN
 FUENTE
 ORGANISMO . cerdo
 COMENTARIO
 COMENTARIO info de ApE:metilado:1
 CARACTERÍSTICAS Ubicación/Calificadores
 misc_feature 1..3000
 /marcador=intrón 6
 misc_feature 3001..3315
 /marcador=exón 7
 misc_feature 3316..3412
 /marcador=intrón 7
 misc_feature 3413..3727
 /marcador=exón 8
 misc_feature 3728..4501
 /marcador=intrón 8
 misc_feature 4502..4594
 /marcador=exón 9
 misc_feature 4595..4676
 /marcador=intrón 9
 misc_feature 4676..4989
 /marcador=exón 10

ORIGEN

```

1  tatagatgac aaggctttgt gctgtagagg ggccagcgaa ctcagtaaag aggggaagatg
61  agaaagataa tggcaagaat ttatccctga agtgtagtgt tgacaaacca gtcacaaaga
121 ggtctaagaa attttgggta caaagttgtt tgaatccca ggcattttat ttgcaatgat
181 tgcataatgt ctgggaagga catctgaacc taagaastag ttcattttga ttgtgttata
241 ttttactaag gcttgagaaa taatcttgag atgagaatga actctacttc ttcagagtct
301 cgaaggaata aattatgaaa atgtattaat gcttctttaa accatattgt atatttatct
361 attactaacc aaaaagaagt agctctattt atttatttat ttatttattt atttatgtct
421 ttgtctctt taggggcaca cctgtggcat atggaggttc ccaggctaga ggtccaatgt
481 gagatgtagc agccagccta tgccagagcc accgcaaac ccggaictgag ccacgtctgt
541 gacttaacac acagctcaaca gcaacgcctg atcctcaaac cactgagcga ggccagggat
601 cgaacccatg tctctatgga tgctagtgtg gttcgttcaa tgcctgagca tgatgggaac
661 tccaaattaa ttattcttca catthgttct tcatatatto atttctatag aaagaattaa
721 atcagatttc agttaatgat ggcaggtaaa agcttaactt attaatcaaa ggagttaatc
781 caggcacaaa aattcaatto atggctctct gthaaaattt aggtataggt ttagcaggaa
841 gaasaggtta gtagatgcag actattacat ttgaatgga tggacaatga agtctactca
901 tacagcacag ggaactatat ccaactctct gggatagaa augatggag acaaaatcag
961 aacaagagag tatatatata cgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg
1021 tgggtgaact ggtcaccctg cggcacagca gaatttggca gaactttgta aatcaactat
1081 acattactag gaaaactact cttasgggct aaatttccaa tattctaac argtacacag
1141 agtaaatgtc ataaggatgc cagtctgtgt agagattgat gtgttactag cagattcatg
1201 aaataaaggc tgaggatgta gtccccaagt cactcttgag tggagaatc tctcctttgt
1261 cctggactca aatattttag gataaaggaa aasagaagat atttatagaa gggactrtgt
1321 tccagtaact tgacaaaatt tcaocattaa agagaattt gtgggagttc ccactcgggo
1381 tcagtggaaa caaatccaac taggaaccat gaggttgttg gtttgatccc tggcctcact
1441 cagtggggta aggatccggg gtgcccgtga gctgtgggtg aggttgccga cccggttctg
1501 atcctgggtt gctgtggctg tggctgtgtt gtaggcagc agcaaacagc tctgattaga
1561 cccctagcct ggaacccccc ataugccaca ggtgcagccc taaaaagaca aaaaaagaga

```

FIG. 16 cont.

```

1621 aaagacaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gaacccccag
1681 aggtatttat ttgtttttgc ctttttttsc tgactgttct ttgtttgttt gttttgagact
1741 gatctagaag actagagatt acaagaasta tggatttggc tcaacttaag aaactgcitt
1801 cattocaagg tttgggcta tccaaaagtg gaatagaatc atatgaatc tagtttatga
1861 gtattttagt agaggaattt caagctcaaa taatgattca gcaagattaa attaaggagg
1921 gaattttcct tgtggctgag tgggttsagg aaccaatgtt gtctctgtga ggaatgtagg
1981 tccatcctgg gctttgtcta ttagggttaag gatctggcat tgcctcagct cagaccaggt
2041 gctgcccctg ttgtggctta ggccaaaagt gcagctccaa ttcaactctt ggcctgggaa
2101 cctccatgtg ctacaagggt cggcctttaa agyaaaaaaa aaaaatttaa tcaaggactc
2161 aagagtcctt cattatttgt gttgtgggaag ctatatttgt tttaaagtct tagtttgtgt
2221 tagaaagcaa gatgtttctt aactcaaat ttgggagggaa ctgtttctat acatttttaa
2281 tggataaagt gcaaaatttt catgctgagg tgaatctatg ttgtgtatg cagaatatag
2341 tcaagatctg aacattttag gaagtgtgtg agggccaatt gtgtatctgt gccatgctga
2401 taagaatgtc aagggaatcc aagaattcgt gttattttga agcagtcato tttaaagggc
2461 atttgagaaa gtccaaattt aaatgcattt cttttcttta aaagataaat tgaagaaatt
2521 aagtctttat ttcccaagta aattgaattg cctctcagtc tgttaaaaag aactcttaac
2581 ttgatgattg cgtctttaa ctggcaaaag ttgtctttaa aatctgagct ccattgtctc
2641 tgccttattt ctggtgtgct tttagactca gattacagta aatggaggac tgagtatagg
2701 gctaaaaagt agagagaatg gatgcataat atctgtgttc tccaatgtga tgaatgaagt
2761 aggcasatac tcaaggssaa gagaagagct gctccaagaa ttatgggttc aagaaggcaa
2821 agtcccagaa ttgtctccag ggaaggacag ggaggtctag aatcgggtaa gccactgta
2881 ggcagaaaaa ccaaggagca tgaatggctt ccttttccaa cttttaactc tctgggttac
2941 tctatcctat aaggaasta ttggaaatct attctcctc aocgaatgc tatttttcag
3001 CCCACAGGAA ACCCAGGCTG GTTGGAGGGG ACATTCCCTG CTCTGGTCTT GTTGAAGTAC
3061 AACATGGAGA CACCTGGGCG ACCGTCTGTG ATTCTGACTT CTCTCTGGAG GCGGCCAGCG
3121 TCTGTGTCAG GGAACFACAG TCGGECACAG TGGTTTCCCT CTCTGGGSCA GCTCACTTTC
3181 GAGAAGGAAG TGGACAGATC TGGGTGTGAAG AATTCCAGTG TGAGGGGSCC GAGTCCACCC
3241 TTTCACCTCTG CCCAGTAGCA CCCCSCCCTG ACGGGACATG TAGCCACAGC AGGGACGTCG
3301 GCGTAGCTTG CTCAGTgag acccagggaa ttgtttcact ttgttccact gccatgaaga
3361 ggttaggggt agttagtca agaatcttt tttaaggcct gtctcctcc agGATACACA
3421 CAAATCCGCT TGGTGAATGG CAAGACCCCA TGTGAAGGAA GAGTGGAGCT CAACATCTTT
3481 GCGTCCCTGG GGTCCCTCTG CAACCTCTAC TGGCACATGG AAGATGCCCA TGTTTTATCC
3541 CAGCAGCTTA AATGTGGAGT TGCCCTTTCT ATCCCGGGAG GAGCACCTTT TGGGAAGGGA
3601 AGTCAGCAGG TCTGCAGGCA CATGTTTCAC TGCACGTGGA CTCAGAGGCA CATGGCAAT
3661 TGTTCCTGCA CTGCTCTGGG CGCATCACAT TGTCTCTCAG GGCATCTGGC CTCTGTAAAC
3721 TGCTCAGGta agagastaag ggcagccagt gatgagccac tcatgacggt gcttaagag
3781 ttggtgtacc taggagttcc cattgtggct cagtgttaac aaactcagct ggtatccatg
3841 aggttatggg ttgtatccct ggccttgcct aatgggttaa ggaatccaga ttgctgtgag
3901 ctgtgttata ggttgacagc totgtctcag tcccatgttg ctgtgattgt ggtgtaggct
3961 gactgctgca gcttcaatt gacccctagc ccgggaattt ccattagcca cagtgccagc
4021 actaaggagag gaaaaaaaGa aaaaaaaa aaagagtggt ggtgtccat agtgaagaa
4081 agatgtaaaa ggaagtgaa agggattccc ccattctgag ggaattgtgag agtgrgcca
4141 gaattattac ttcatctgac ttgttacagg gaaagttaac ttgactttca cggacctcct
4201 agttacctgg tcttaactat atgtctcttc agagtaccty attcattccc agcctgggtg
4261 acccatcccc ctatctctat ggctatgitt atccagagca cctctatcta acactccagc
4321 tgatcttccct gacacagctg tggcaacctt ggatccttta cccaactgtg ccaggctgga
4381 gatcaaacct aagcctctgc agcaacccaa gctgctgcag tcaattttt aaacccctgt
4441 gccactgtgg gtatctccga tattttgtat cttctgtgac tgagtgggtt gctgtttgca
4501 gGGAACCAGA GTCAGACACT ATCCCTCTGC AATTTCATCAT CCTCGGACCC ATCAAGCTCT
4561 ATTATTTTCA AAGAAAATGG TGTTCCTTGC ATAGgtgaga atcagtgacc aacolatgaa
4621 aatgatctca atcctcagaa atgcatttta ttcatgttat attcctatct tgcagGGAGT
4681 GGTCAACTTC CCTGCTCCA TCGAGGTGGT CCGTGTCTCT GAGAGTACA GGTCTATCAT
4741 GAGGGCTCTT GGGGCACCAT CTGTGATCAC AGCTGGGACC TGAATGATTC CCAATGTCTG
4801 TGCAAAACAG TgAGCTGTGG ATGGGCCATT AATGCCACTG GTTCTGTCTA TTTTGGGGA
4861 GGAACAGGCG CCATTTGGCT GCATGAGATA AACTGTAATG CAAAAGAAAC TCATATTTGG
4921 CAATGCCACT CACATGGTTC GGGGCGGSCC AATTGCAGGC ATAAGGAGGA TCGAGGAGTC
4981 ATCTGCTCGG

```

Fig. 17

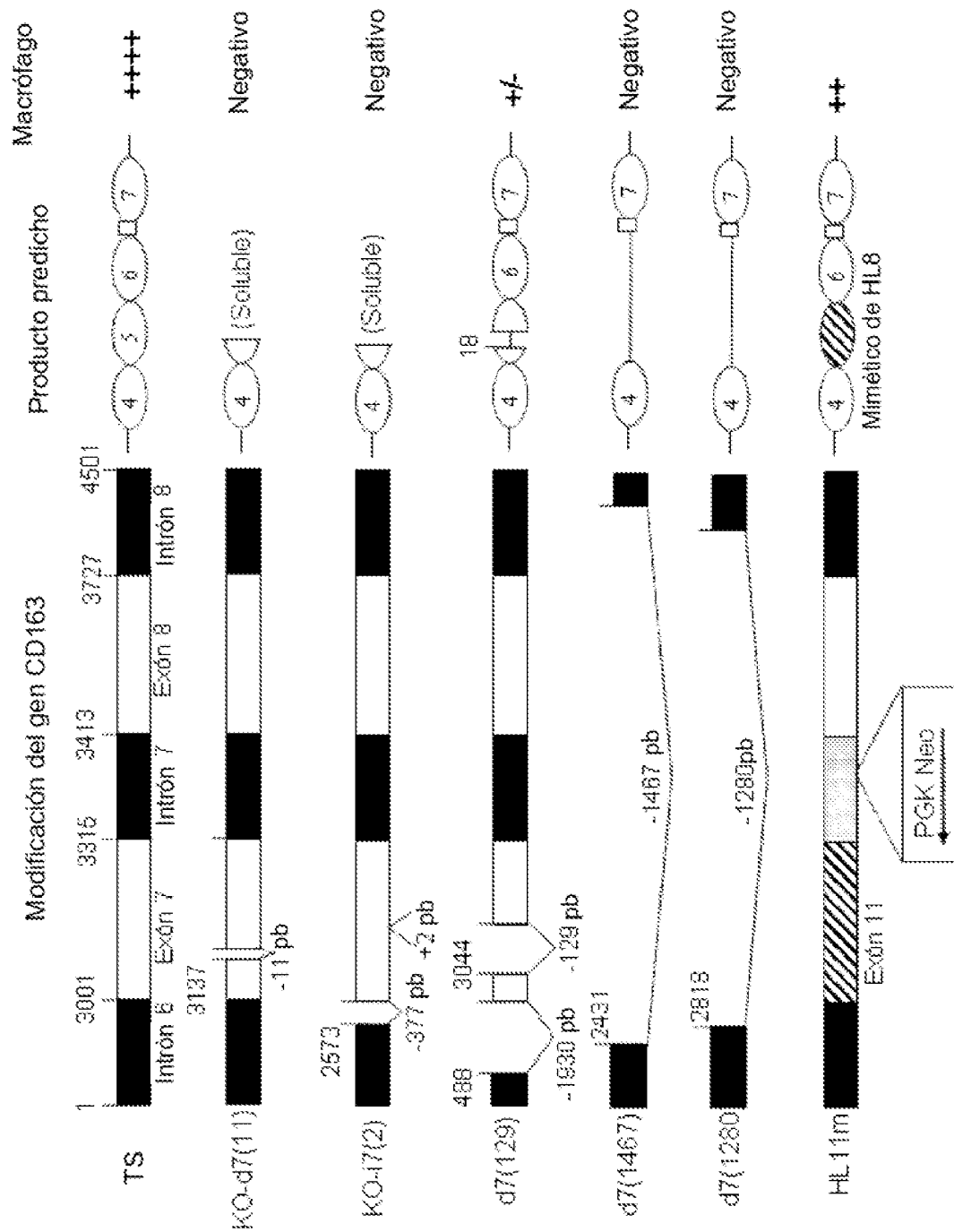


Fig. 18

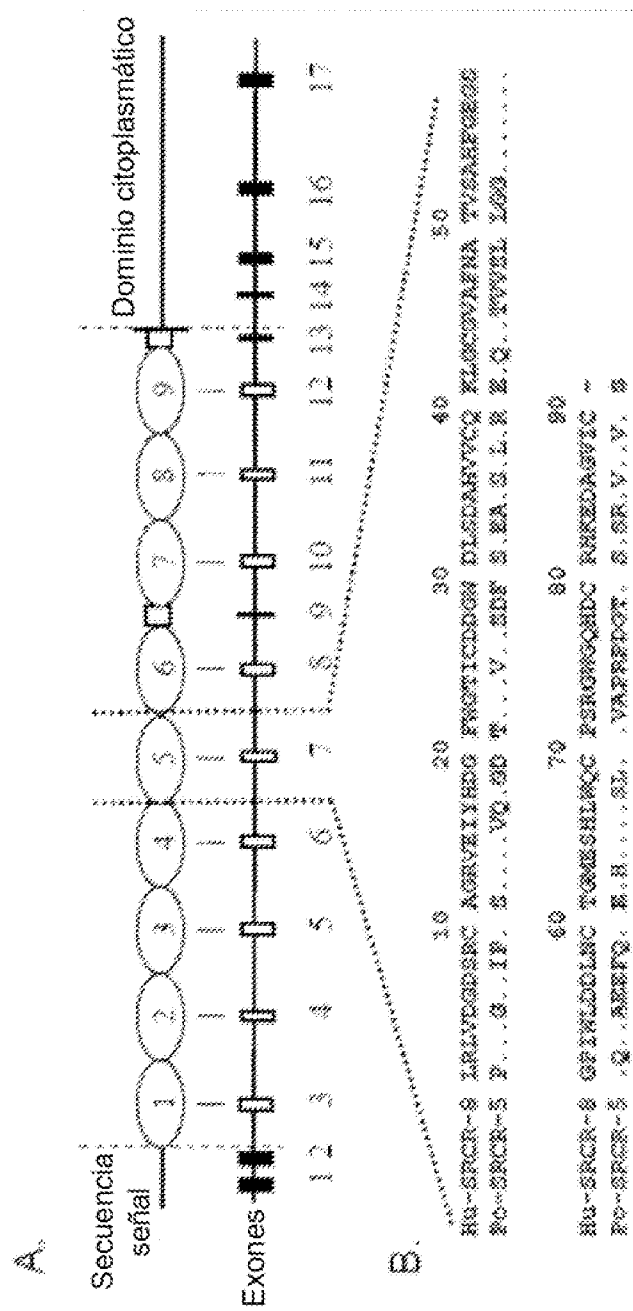


Fig. 19

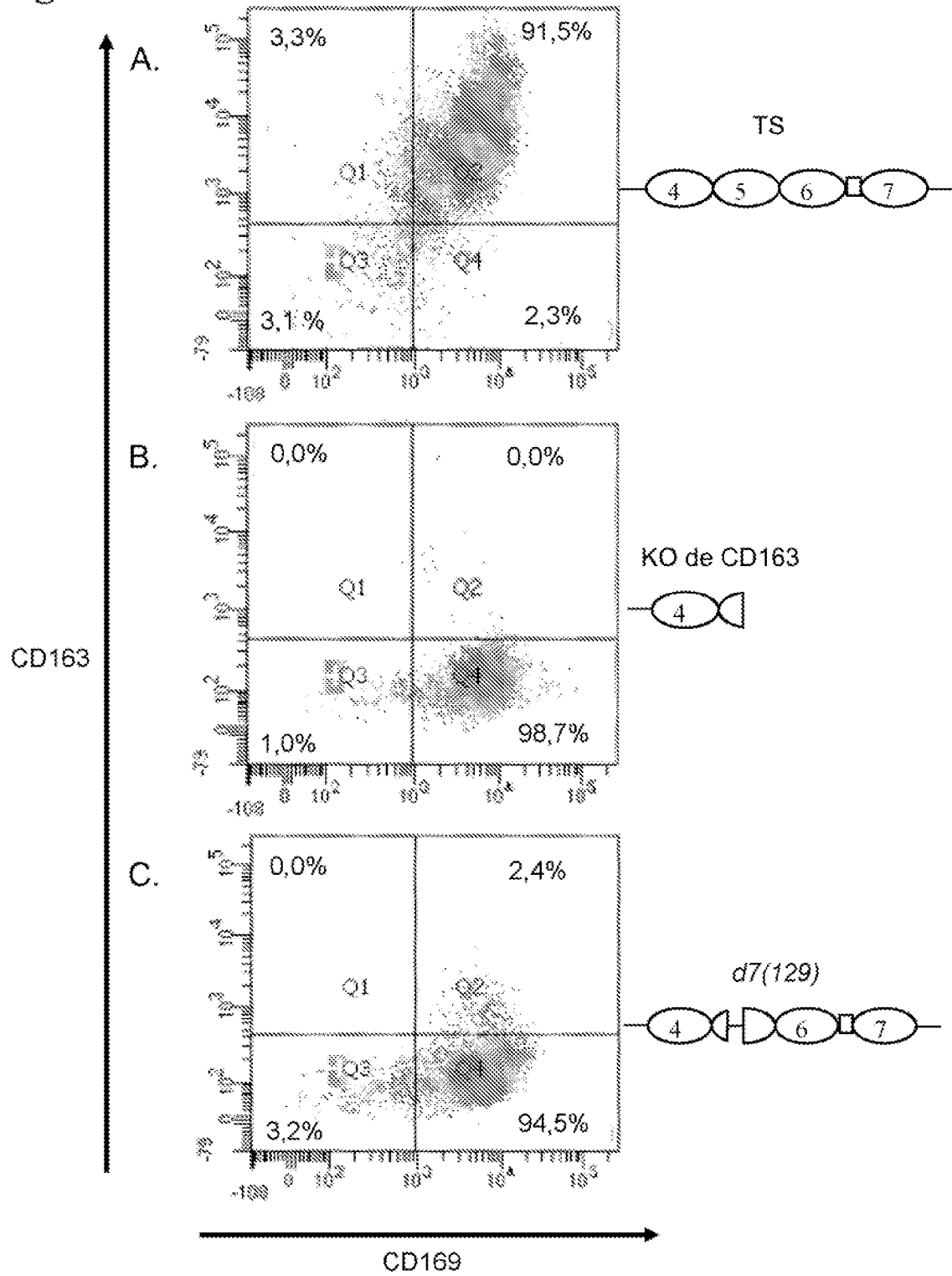


FIG. 19 CONT.

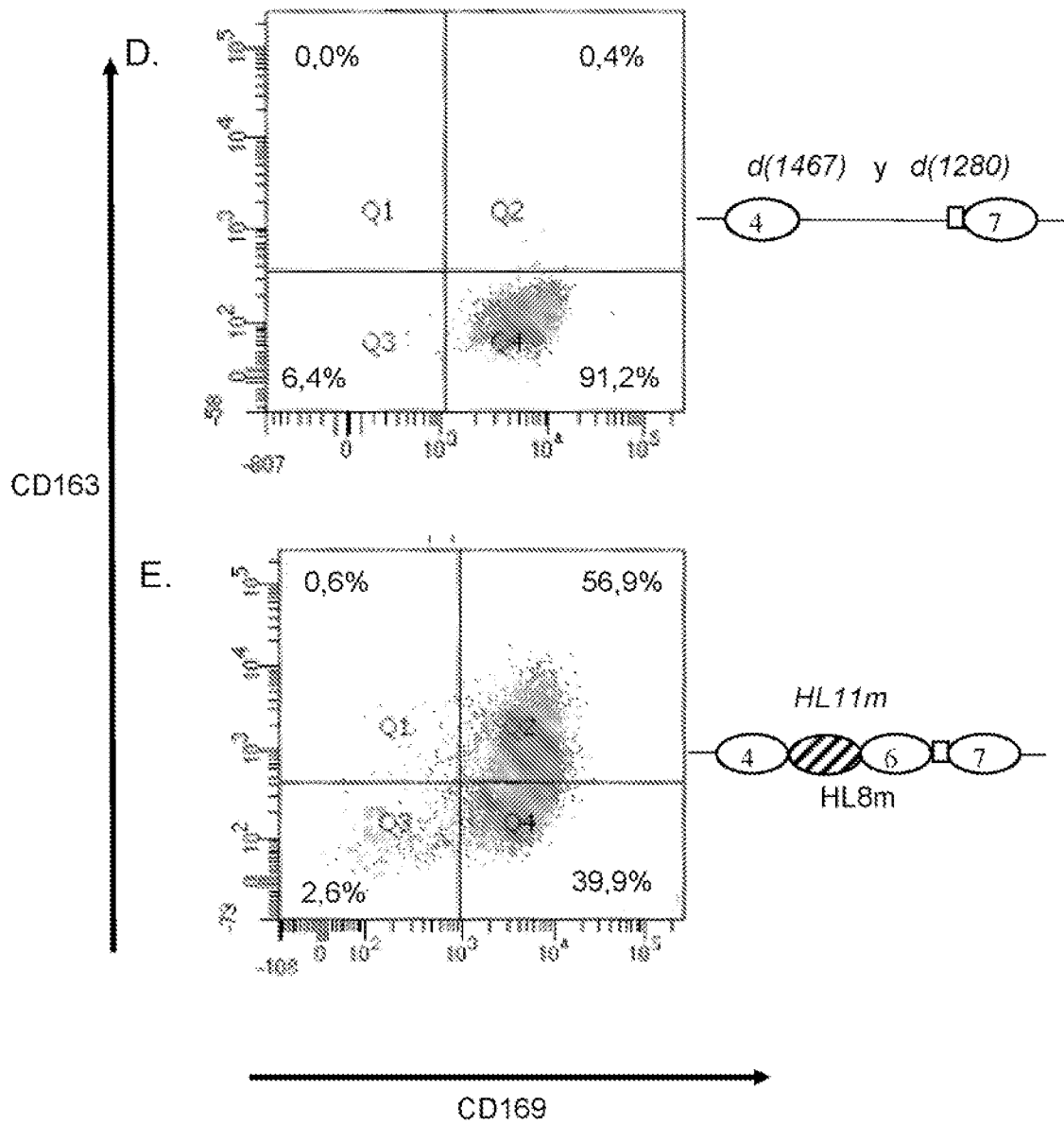


FIG. 20

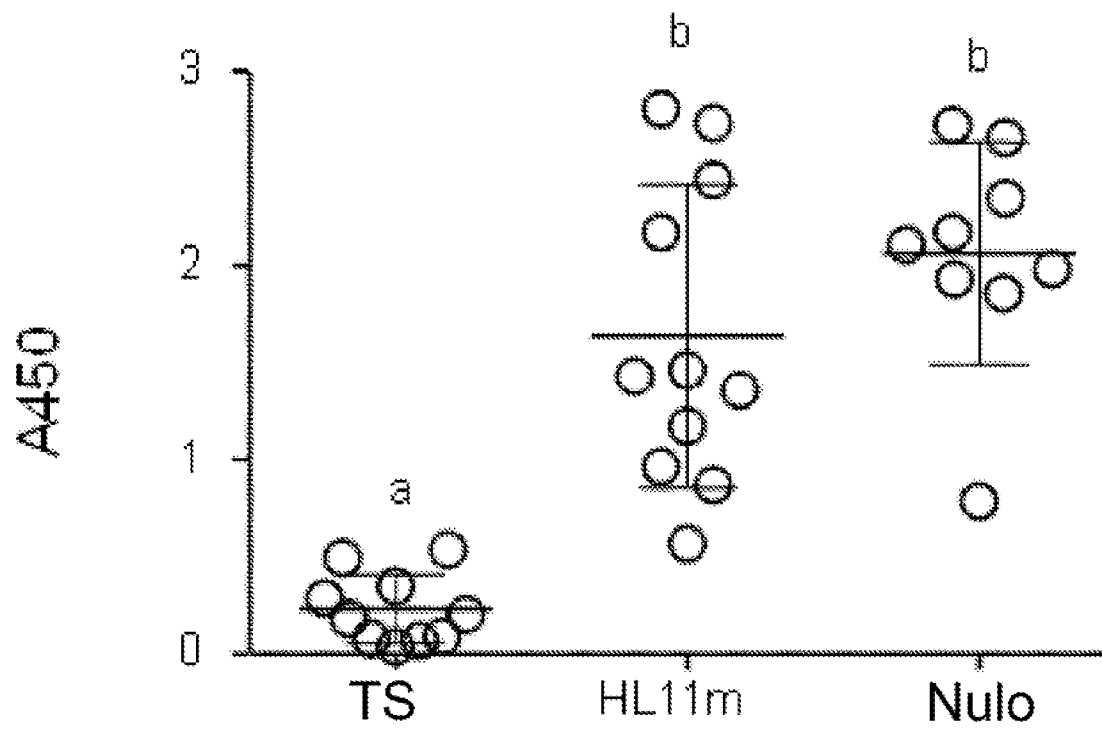


FIG. 21

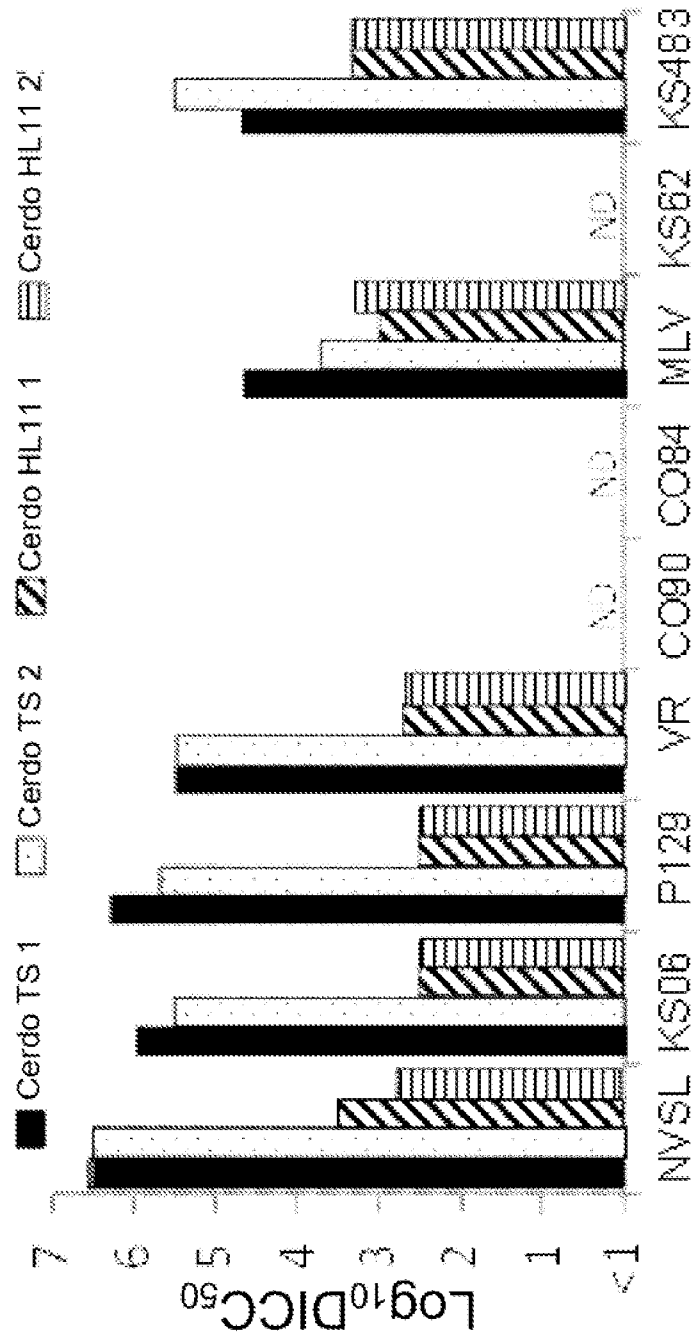


FIG. 22

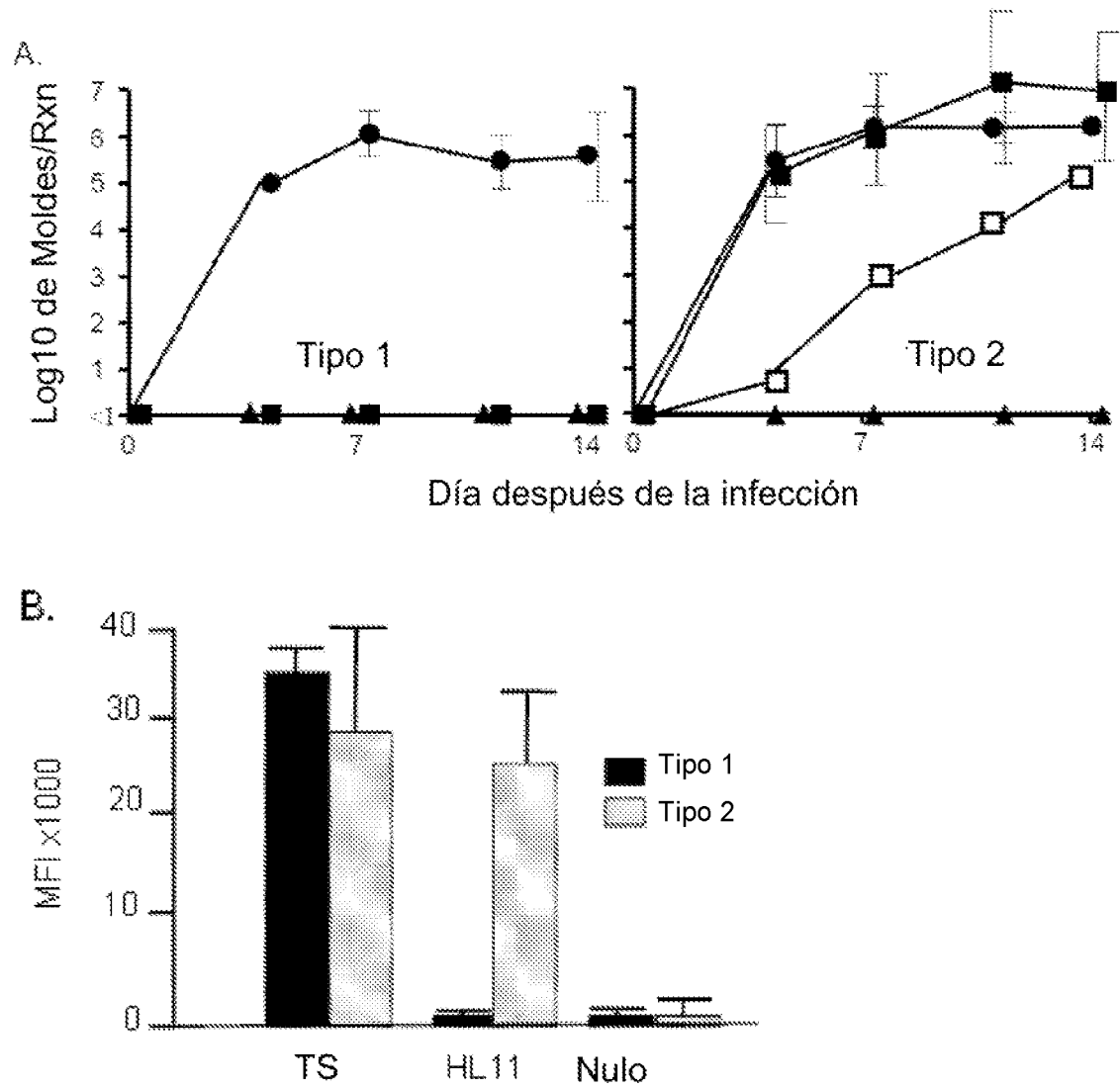


FIG. 23

