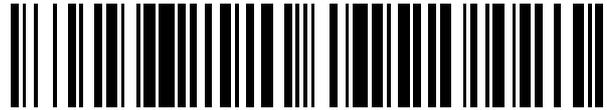


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 640**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2006 E 06785409 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2014 EP 1895835**

54 Título: **Uso de citosina desaminasas para disminuir la transferencia de retroelementos desde cerdos a seres humanos**

30 Prioridad:

24.06.2005 US 694054 P

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

12.05.2014

73 Titular/es:

**RECOMBINETICS, INC. (100.0%)
2751 Hayes Street NE
Minneapolis, MN 55418, US**

72 Inventor/es:

**HARRIS, REUBEN S.;
JONSSON, STEFAN R.;
FAHRENKRUG, SCOTT C. y
LARUE, REBECCA ST. CLAIRE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 459 640 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

Uso de citosina desaminasas para disminuir la transferencia de retroelementos desde cerdos a seres humanos

CAMPO TÉCNICO

5 Esta invención se refiere a cerdos transgénicos y células porcinas que tienen una menor capacidad de transmitir retroelementos, tales como retrovirus endógenos porcinos, a células y tejidos no porcinos, y más particularmente a cerdos transgénicos y células porcinas que contienen citosina desaminasas no porcinas.

ANTECEDENTES

10 El tratamiento de la diabetes sigue siendo una carga importante para pacientes y sus familias, experimentando hasta el 50% de los pacientes complicaciones secundarias devastadoras debido a un tiempo de vida de exposición a niveles elevados de glucosa. Actualmente, la única manera para restaurar y sostener insulina sin el riesgo asociado de hiper- o hipoglucemia es sustituir las células productoras de insulina del paciente, los islotes de Langerhans: ya sea mediante el trasplante de un páncreas vascularizado o mediante la infusión de islotes aislados. Sin embargo, los donantes de páncreas humanos adecuados son muy raros. Los cerdos proporcionan una fuente potencialmente ilimitada de islotes para xenotransplante a pacientes diabéticos, y se puede desarrollar hasta el punto de aplicabilidad clínica, potencialmente bien antes de otras tecnologías en desarrollo, tales como células madre.

15 El potencial de transmisión de virus desde el tejido donante al tejido hospedante sigue siendo un impedimento para el uso de xenotransplante para el tratamiento de diabetes. Aunque la bioseguridad y ensayo rigurosos pueden eliminar la mayoría de los agentes procedentes de cerdos donantes potenciales, un agente en particular es recalcitrante a este enfoque. La mayoría de, quizá todos, los genomas de vertebrados, incluidos cerdos y seres humanos, poseen secuencias de ácido nucleico móviles por infecciones retrovíricas previas. Aunque la mayoría de éstas son funcionalmente inactivas, las células de cerdo contienen varios tipos de retroelementos activos, denominados retrovirus endógenos porcinos (PERVs). Estos agentes son generalmente inocuos al cerdo, pero son un problema importante para el xenotransplante. En condiciones de laboratorio en las que se cocultivan células humanas y de cerdos, se ha demostrado la transmisión de los PERVs desde el tejido de cerdo a tejido humano (Patience et al. (1997) Nat Med 3, 282-286). No está claro cuál, si esta transmisión tendría alguna ramificación para un paciente, pero la posibilidad teorizada de que PERVs solos o en combinación con agentes humanos pudiesen provocar enfermedad ha surgido como un obstáculo principal para la aplicación ampliamente extendida del xenotransplante.

SUMARIO

20 La invención como se define en las reivindicaciones se basa en la expresión de polipéptidos de citosina desaminasas no porcinas en células y tejidos de cerdos. Como se describe aquí, la expresión de citosina desaminasas no porcinas (por ejemplo, citosina desaminasas humanas) en células y tejidos porcinos puede facilitar el control de la transmisión de retroelementos, tales como PERVs, a células humanas. Como resultado, las células y tejidos de cerdos que contienen citosina desaminasas no porcinas tienen capacidad reducida de transmitir PERVs a células humanas y, como tal, pueden reducir los riesgos asociados con el xenotransplante de la transferencia génica entre especies.

25 En un aspecto, la invención como se define en las reivindicaciones presenta un constructo de ácido nucleico que incluye una unidad transcripcional, incluyendo la unidad transcripcional una región reguladora porcina enlazada operablemente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de citosina desaminasas no porcinas. Una repetición invertida de un transposón puede flanquear cada lado de la unidad transcripcional. Un elemento aislante también puede flanquear cada lado de la unidad transcripcional. El constructo de ácido nucleico puede incluir además una secuencia de ácido nucleico que codifica una transposasa.

30 El polipéptido de citosina desaminasas de la descripción se puede seleccionar del grupo que consiste en AID, APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3D, APOBEC3E, APOBEC3F, APOBEC3G, y APOBEC3H. Por ejemplo, en la invención, el polipéptido de citosina desaminasas puede ser un polipéptido de APOBEC3F, tal como un polipéptido de APOBEC3F humano, o puede ser un polipéptido de APOBEC3G, tal como un polipéptido de APOBEC3G humana. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico codifica al menos dos polipéptidos de citosina desaminasas (por ejemplo, un polipéptido de APOBEC3F y un polipéptido de APOBEC3G). La región reguladora porcina puede ser un promotor constitutivo o un promotor específico de tejido.

35 En otro aspecto, la invención como se define en las reivindicaciones presenta una célula porcina aislada que incluye un constructo de ácido nucleico, incluyendo el constructo de ácido nucleico una región reguladora enlazada operablemente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de citosina desaminasas no porcinas. La célula puede ser una célula embrionaria, una célula porcina fetal (por ejemplo, un fibroblasto), una célula porcina

de adulto (por ejemplo, un fibroblasto dérmico), una célula germinal (por ejemplo, un oocito o un óvulo), una célula madre (por ejemplo, una célula madre adulta o una célula madre embrionaria), o una célula progenitora.

La invención como se define en las reivindicaciones también presenta una célula porcina aislada que incluye una citosina desaminasa no porcina. La célula puede incluir además un ácido nucleico que codifica la citosina desaminasa no porcina. El polipéptido de citosina desaminasas de la descripción se puede seleccionar del grupo que consiste en AID, APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3D, APOBEC3E, APOBEC3F, APOBEC3G, y APOBEC3H. Por ejemplo, en la invención, el polipéptido de citosina desaminasas puede ser un polipéptido de APOBEC3F, tal como un polipéptido de APOBEC3F humano, o puede ser un polipéptido de APOBEC3G, tal como un polipéptido de APOBEC3G humana. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico codifica al menos dos polipéptidos de citosina desaminasas (por ejemplo, un polipéptido de APOBEC3F y un polipéptido de APOBEC3G). La región reguladora puede ser un promotor constitutivo o un promotor específico de tejido.

En otro aspecto, la invención como se define en las reivindicaciones presenta un cerdo transgénico, células derivadas del cerdo transgénico, tejido aislado del cerdo transgénico, y progenie del cerdo transgénico. Las células nucleadas del cerdo incluyen un constructo de ácido nucleico, el cual incluye una unidad transcripcional que incluye una región reguladora operablemente enlazada a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de citosina desaminasas no porcinas. La expresión del polipéptido de citosina desaminasas no porcinas en al menos algunas de las células del cerdo da como resultado, al cocultivarlas con células humanas, una menor capacidad de las células para transmitir retrovirus endógenos porcinos a las células humanas. La región reguladora puede ser un promotor constitutivo o un promotor específico de tejido. Un elemento aislante y una repetición invertida de un transposón pueden flanquear cada lado de la unidad transcripcional. El polipéptido de citosina desaminasas de la descripción se puede seleccionar del grupo que consiste en AID, APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3D, APOBEC3E, APOBEC3F, APOBEC3G, y APOBEC3H. Por ejemplo, en la invención, el polipéptido de citosina desaminasas puede ser un polipéptido de APOBEC3F, tal como un polipéptido de APOBEC3F humano, o puede ser un polipéptido de APOBEC3G, tal como un polipéptido de APOBEC3G humano.

En otro aspecto, la descripción presenta un método para obtener un cerdo transgénico. El método incluye introducir una célula de cerdo transgénico en un oocito de cerdo enucleado para establecer una célula combinada, la célula de cerdo transgénico incluye un constructo de ácido nucleico, el cual incluye una unidad transcripcional que incluye una región reguladora enlazada operablemente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de citosina desaminasas no porcinas; producir un embrión porcino a partir de la célula combinada; transferir el embrión porcino a una hembra receptora; y permitir que el embrión porcino se desarrolle en la hembra receptora para producir el cerdo transgénico. Un elemento aislante y una repetición invertida de un transposón pueden flanquear cada lado de la unidad transcripcional.

La descripción también presenta un método para obtener un cerdo transgénico. El método incluye introducir un constructo de ácido nucleico en un óvulo fertilizado para producir un óvulo fertilizado inyectado, en el que el constructo de ácido nucleico incluye una unidad transcripcional que incluye una región reguladora enlazada operablemente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de citosina desaminasas no porcinas; transferir el óvulo fertilizado inyectado a una hembra receptora; y permitir que el óvulo fertilizado inyectado se desarrolle en la hembra porcina receptora para producir el cerdo transgénico.

En todavía otro aspecto, la descripción presenta un método para obtener una célula de cerdo transgénico. El método incluye introducir un constructo de ácido nucleico en una célula de cerdo, incluyendo el constructo de ácido nucleico una región reguladora enlazada operablemente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de citosina desaminasas no porcinas.

La descripción también presenta un método para obtener una célula de cerdo transgénico. El método incluye introducir en una célula de cerdo: a) un constructo de ácido nucleico que incluye una unidad transcripcional, incluyendo la unidad transcripcional una región reguladora enlazada operablemente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de citosina desaminasas no porcinas, en el que un elemento aislante y una repetición invertida de un transposón flanquean cada lado de la unidad transcripcional; y b) una fuente de una transposasa. La fuente de la transposasa puede incluir un ácido nucleico que codifica la transposasa. El transposón y la fuente de la transposasa pueden estar presentes en constructos de ácido nucleico distintos o en el mismo constructo de ácido nucleico.

Excepto que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado como se entiende habitualmente por un experto normal en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí para practicar la invención, más abajo se describen métodos y materiales adecuados. Además, los materiales, métodos, y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán manifiestas a partir de la siguiente descripción detallada, y a partir de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las FIGS. 1A y 1B son histogramas que indican que APOBEC3G estimula la mutación en *S. cerevisiae* mediante la ruta de escisión de uracilo. (A) La expresión de APOBEC3G provoca un incremento en la frecuencia de la mediana de la mutación a Can^R . Cada X representa la frecuencia derivada de cultivo independiente, y se indica la mediana. El eje Y da el número observado de colonias Can^R por millón de células de levadura viables. La levadura que expresa el vector de control mostró una frecuencia de mutación espontánea a Can^R similar a la dada a conocer previamente (Huang et al (2003) Proc Natl Acad Sci USA 100, 11529-34; Rattray et al (2002) Genetics 162, 1063-77). Los datos son representativos de siete experimentos independientes. La FIG. 2 da a conocer la media de los valores de la mediana para estos experimentos). (B) La coexpresión de APOBEC3G y Ugi dispara un incremento sinérgico en la frecuencia de mutación a Can^R . APOBEC3G está etiquetada con el dominio de unión a ADN de LexA excepto que se señale. Los parámetros son idénticos a la FIG. 1A.

La FIG. 2 es un histograma que resume el fenotipo mutador CAN1 dependiente de APOBEC3G de siete experimentos independientes, realizado cada uno con 6-8 cultivos de levadura independientes que expresan APOBEC3G o un vector de control. Se muestra el promedio de las frecuencias de mutación de la mediana y los SEMs correspondientes. La frecuencia promedio de mutación de la mediana de levadura que expresa el vector de control fue $1,3 \times 10^{-6}$; este número se asignó a un valor de uno para normalizar y destacar la magnitud del fenotipo mutador de APOBEC3G (33 veces). Los datos procedentes de las FIGS. 1A y 1B, y FIG. 3, se incluyen con los datos de tres experimentos adicionales. De la aparición estocástica de mutantes Can^R en los cultivos en crecimiento, se espera la variación en valores entre cultivos individuales para cada experimento y entre los valores de la mediana de siete experimentos.

La FIG. 3 es un histograma que indica que APOBEC3G estimula la mutación en *S. cerevisiae* mediante la ruta de escisión uracilo II. La inhibición de uracilo ADN glucosilasa por Ugi, o su eliminación por una supresión, provocó fenotipos virtualmente idénticos. Los parámetros experimentales son idénticos a los descritos para la FIG. 1A.

La FIG. 4A-4D demuestra que APOBEC3G dispara mutaciones de transición C/G \rightarrow T/A en *S. cerevisiae*. (A) Histogramas que resumen los tipos de mutaciones encontrados en el gen CAN1 de *S. cerevisiae* que expresa un vector de control, o datos de APOBEC3G procedente de Lex-APOBEC3G y células que expresan APOBEC3G no etiquetada fueron casi idénticos y se reunieron para estos análisis. Las mutaciones se categorizaron como transiciones (Trs), transversiones (Trv), supresiones (Del) o inserciones (Ins). (B) Sumario de las mutaciones de sustitución de bases encontradas en el gen CAN1 de *S. cerevisiae* que expresa un vector de control o APOBEC3G. (C) Histogramas que resumen los tipos de mutaciones encontrados en el gen CAN1 de *S. cerevisiae* que expresa Ugi y un vector de control o APOBEC3G marcada como en la FIG. 4A. (D) Sumario de las mutaciones de sustituciones de bases encontradas en el gen CAN1 de *S. cerevisiae* que expresa Ugi y un vector de control o APOBEC3G.

La FIG. 5 es una gráfica que ilustra el porcentaje que cada base se encontró en la posición indicada con respecto al sitio de mutación de transición C/G \rightarrow T/A en células que expresan APOBEC3G ($n = 37$). La base encontrada más frecuentemente se indica más abajo. Se muestran los sitios de consenso de APOBEC3G observados en sustratos retrovíricos modelo, HIV-GFP o MLV-GFP (Liddament et al. (2004) Curr. Biol. 14, 1385-91). Múltiples bases tuvieron el mismo porcentaje, y se indican mediante el código de una letra, en el que D = A/G/T, R = A/G, S = G/C e Y = C/T. El contenido de G/C del gen CAN1 se indica mediante la línea discontinua.

La FIG. 6A-6D indica que APOBEC3F y APOBEC3G inhiben la retrotransposición de Ty1. (A) Un esquema que representa la retrotransposición por Ty1 o TyHRT que produce prototrofia para histidina o actividad de luciferasa. GA, PR, IN, RT y LTR representan gag, proteasa, integrasa, transcriptasa inversa y repetición terminal larga, respectivamente. (B, D) La expresión de APOBEC3F o -3G disminuye la retrotransposición de Ty1 o TyHRT según se monitoriza mediante el número de colonias His^+ . Para cada condición, se analizaron al menos ocho cultivos independientes, y las barras de error representan un error estándar de la media. (C, E) La expresión de APOBEC3F o -3G disminuye la retrotransposición de Ty1 o TyHRT según se monitoriza mediante actividad de luciferasa. Las condiciones fueron idénticas a las descritas anteriormente.

La FIG. 7 es una gráfica de un experimento representativo que muestra el efecto de la expresión de APOBEC3F o -3G sobre la retrotransposición de un elemento Ty1-*his3AI* cromosómico. La expresión de APOBEC3F y -3G disminuyó la frecuencia de retrotransposición de His^+ en 94 y 98 veces, respectivamente. Estos efectos fueron probablemente subestimados debido a que varios de los cultivos que expresan APOBEC3F y -3G no produjeron colonias His^+ (aunque los recuentos de células viables indicaron que habían crecido hasta saturación). Obsérvese que el nivel de vector de control de retrotransposición de His^+ en este experimento es mucho menor que el mostrado en la FIG. 6, debido a que aquí el constructo Ty1-*his3AI* es una sola copia y su promotor endógeno está bajo el control celular. Los constructos usados en la FIG. 6 se expresan a partir de plásmidos de múltiples copias mediante un promotor GAL muy eficiente]. Las barras de error indican un SEM, y son apenas visibles para APOBEC3F y -3G.

La FIG. 8A-8B indica que APOBEC3F y APOBEC3G indujeron hipermutaciones de ADNc de Ty1. (A) Un dibujo esquemático que representa la retrotransposición His⁺ de Ty1, dependiente de LTR, que posee un gen pasajero GFP. Se reunieron los sucesos de retrotransposición His⁺, y las variantes negativas para GFP se recuperaron para la secuenciación de ADN como se describe en los Materiales y Métodos. GA, PR, IN, RT y LTR representan gag, proteasa, integrasa, transcriptasa inversa y repetición terminal larga, respectivamente. (B) Un dibujo esquemático que muestra todas las mutaciones de sustituciones de bases de hebra genómica (plus) que se encontraron en el gen pasajero GFP (y regiones circundantes) (SEC ID NO: 1) de retrotransposones His⁺/GFP. Las mutaciones atribuibles a la expresión de APOBEC3G o -3F se indican por encima y por debajo de la secuencia de consenso de 1488 pb, respectivamente. El codón de parada de GFP está subrayado. Todas las mutaciones se recuperaron a partir de experimentos de Ty1, excepto tres sustituciones G → A, que procedieron de experimentos de TyHRT (uno debido a APOBEC3F se muestra en la posición de consenso 681; un segundo debido a APOBEC3F y uno debido a APOBEC3G no se ilustran debido a que se produjeron en la secuencia de RT de HIV). Todos estos datos de secuenciación brutos se resumen en la FIG. 9. Se observaron cuatro controles negativos para GFP. Dos no se recuperaron mediante PCR, y dos produjeron productos de PCR más pequeños y no se secuenciaron (probablemente supresiones).

La FIG. 9 son tablas que indican las preferencias mutacionales de APOBEC3G y APOBEC3F en ADNc de Ty1. (A, C) Sumarios de las mutaciones de sustituciones de bases del gen GFP (y región circundante) observados en conjuntos de retrotransposiciones His⁺, que se habían producido en presencia de APOBEC3G o -3F, respectivamente. (B, D) Preferencia de bases que rodean a los sitios transición C→T de ADNc de Ty1 atribuibles a la expresión de APOBEC3G o -3F, respectivamente. APOBEC3G muestra una clara preferencia por 5'-YCC, mientras que APOBEC3F prefiere 5'-TTC (Y = C o T; la citosina mutada está subrayada).

La FIG. 10 es una gráfica que indica que la expresión de APOBEC3G humana en células de riñón de cerdo (PK-15) provoca una disminución de 3 veces en la transferencia de PERVs a células 293T humanas en un experimento de cocultivo a largo plazo. Los dos paneles superiores son inmunotransferencias que muestran la expresión de APOBEC3G humana (HsA3G) en células PK-15 (línea central), pero no en el vector solamente o células que expresan APOBEC3F (SsA3F) de cerdo (línea izquierda y derecha, respectivamente). Se muestran bandas no específicas como controles de carga.

La FIG. 11A es una foto de productos de PCR procedentes de un ensayo de PCR semicuantitativa representativo que muestra que APOBEC3G humana disminuye potentemente la transferencia de PERVs desde células de cerdo a células humanas. La FIG. 11B es un control específico de cerdo.

La FIG. 12 es una gráfica de un ensayo de PCR en tiempo real cuantitativo representativo, que muestra que APOBEC3G humana disminuye potentemente la transferencia de PERVs desde células de cerdo a células humanas.

La FIG. 13 es un alineamiento de secuencias de las proteínas APOBEC3F de vaca (BtA3F, SEC ID NO: 8), de oveja (OaA3F, SEC ID NO: 9), y de cerdo (SsA3F, SEC ID NO: 10).

La FIG. 14 es un alineamiento de secuencias del sitio activo de las proteínas APOBEC3F humana (HsA3F, SEC ID NO: 11), de vaca (BtA3F, SEC ID NO: 12), de oveja (OaA3F, SEC ID NO: 13), y de cerdo (SsA3F, SEC ID NO: 14). Los motivos conservados están encerrados en cajas.

La FIG. 15A es una gráfica de la infecciosidad relativa de HIV-GFP producida en presencia de un vector de control o la proteína A3 indicada. Para facilitar las comparaciones, todos los datos se normalizaron a la infecciosidad de HIV-GFP producida en presencia de un vector de control, al que se le asignó arbitrariamente un valor de uno. Se muestran la media y el SEM de tres experimentos independientes. En estos experimentos no se representa Vif de HIV.

La FIG. 15B es un gráfico de la infecciosidad relativa de MLV-GFP producida en presencia de los constructos indicados. Los parámetros son idénticos a aquellos en la FIG. 15A.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Como se describe aquí, las citosina desaminasas humanas, tales como APOBEC3G y 3F, son capaces de desaminar el ADN genómico de una célula eucariota. La expresión de APOBEC3G o de su homólogo APOBEC3F puede inhibir la movilidad del retrotransposón Ty1 en *Saccharomyces cerevisiae* mediante un mecanismo que implica la desaminación de citosinas del ADNc. Esto expande el intervalo de dianas de citosina desaminasas para incluir ADN nuclear y retroelementos endógenos, que tienen implicaciones patológicas y fisiológicas, respectivamente. Estos datos indican que el mecanismo de restricción de retroelementos dependiente de APOBEC3 está muy conservado, y que el intervalo de sustratos de APOBEC3 se puede ampliar mucho más que lo que se anticipó originalmente. Debido a que las proteínas APOBEC3 no existen fuera de los mamíferos, los resultados descritos aquí que muestran que APOBEC3F o -3G puede inhibir la retrotransposición de Ty1 de levadura fueron inesperados. Por lo tanto, los datos de Ty1 descritos aquí no sólo demuestran la notable conservación de este

mecanismo, sino que, de forma importante, también muestran que los factores de mamíferos (además de APOBEC3F o -3G) no son necesarios para la restricción de retroelementos.

Además, como se demuestra aquí, la expresión de citosina desaminasas humanas en células porcinas reduce la capacidad de las células porcinas para transmitir retroelementos endógenos (por ejemplo, retrovirus y retrotransposones) a las células humanas. De este modo, la invención como se define en las reivindicaciones proporciona cerdos transgénicos y células de cerdos que expresan un polipéptido de citosina desaminasas no porcinas. Los órganos y tejidos procedentes de tales cerdos transgénicos son útiles para xenotransplante debido al menor riesgo de transmitir los retrovirus porcinos endógenos a células humanas, con respecto a órganos y tejidos procedentes de cerdos que expresan citosina desaminasas endógenas.

10 Citosina desaminasas no porcinas

Como se usa aquí, "polipéptido de citosina desaminasas" se refiere a cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la modificación post-traducciona, que tiene la capacidad de desaminar citosinas a uracilos en el ácido nucleico, y que contiene el siguiente dominio de citosina desaminasa de unión de cinc (aminoácidos proporcionados en terminología estándar de una letra): H/CXE (u otro resto catalítico, por ejemplo, D) $X_{20-30}PCX_{2-4}C$. Véase, Harris y Liddament (2004) Nat. Rev. Immunol. 4:868-877. Se pueden introducir en un dominio de citosina desaminasa de unión a cinc conocidas sustituciones, supresiones e inserciones de aminoácidos, y el polipéptido resultante es una "citosina desaminasa" con la condición de que el polipéptido retenga la capacidad para desaminar citosinas a uracilos.

Los polipéptidos de citosina desaminasas de mamífero no porcinas incluyen citosina desaminasas de ADN de un solo dominio y citosina desaminasas de ADN de dominio doble. Por ejemplo, las citosina desaminasas de ADN de un solo dominio incluyen, por ejemplo, polipéptidos de desaminasa inducida por activación (AID), APOBEC1, APOBEC2, APOBEC3A, APOBEC3C, APOBEC3D, APOBEC3E y APOBEC3H. Las citosina desaminasas de ADN de dominio doble incluyen, por ejemplo, polipéptidos de APOBEC3B, APOBEC3F y APOBEC3G. APOBEC3D y APOBEC3E también se pueden producir como citosina desaminasas de dominio doble. Véanse, por ejemplo, Harris y Liddament (2004), *más arriba*; y Jarmuz et al Genomics (2002) 79(3): 285-96. APOBEC3G y/o APOBEC3F son particularmente útiles. APOBEC3G humana (3G de tipo polipéptido catalítico enzimático que edita ARNm de apolipoproteína B, también conocida como CEM15) usa la desaminación de citosina a uracilo para inhibir la replicación de una variedad de retrovirus, incluyendo HIV-1. APOBEC3G se localiza predominantemente en el citoplasma de células de mamífero. En una célula infectada por un retrovirus, esta localización puede facilitar la incorporación de APOBEC3G en partículas víricas, que son liberadas desde la membrana plasmática. APOBEC3G también se incorpora específicamente en viriones a través de una asociación con la proteína Gag viral y/o ARN genómico viral. Una vez que un retrovirus entra en una célula, su ARN genómico se transcribe de forma inversa, y durante este proceso, APOBEC3G es capaz de desaminar citosinas de ADNc a uracilos (C → U). Estas lesiones se producen a una frecuencia elevada de manera que finalmente inactivan el virus (provocando hipermutación G → A, como lectura en la hebra genómica del virus). APOBEC3F es un homólogo de APOBEC3G, y restringe la infección del HIV-1 mediante un mecanismo similar. APOBEC3F y -3G desaminan citosinas con diferentes contextos locales, prefiriendo 5'-TC y 5'-CC, respectivamente.

La secuencia de ácido nucleico que codifica la citosina desaminasa puede ser un ADNc, o puede incluir intrones o regiones no traducidas de 5' o 3' adyacentes (por ejemplo, un ácido nucleico genómico). Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico puede codificar un polipéptido de APOBEC3F o de APOBEC3G humano. Los Números de Acceso del GenBank NM_145298 y NM_021822 proporcionan las secuencias de los ADNc de APOBEC3F y APOBEC3G humanos, respectivamente. La secuencia de ácido nucleico también puede codificar un polipéptido de APOBEC3F de oveja o de vaca como se describe aquí. Las proteínas de APOBEC3F de oveja o de vaca tienen un dominio de citosina desaminasa de ADN aminoterminal activo, que provoca una preferencia por desaminación dinucleotídica más amplia, y son totalmente resistentes a Vif de HIV-1.

También se pueden usar las secuencias de ácido nucleico que tienen mutaciones silenciosas que no cambian los aminoácidos codificados, o variantes de secuencia que cambian uno o más aminoácidos codificados, pero que no anulan la función enzimática. Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico de la APOBEC3G usada aquí difiere de la secuencia codificante de NM_021822 en una traducción C a T en la posición nucleotídica 588. Esta traducción es silenciosa y no cambia el aminoácido codificado en la posición 119 (F). En algunas realizaciones, dos o más polipéptidos de citosina desaminasas (por ejemplo, los polipéptidos APOBEC3F y APOBEC3G humanos) son codificados en el constructo de ácido nucleico.

Constructos de ácido nucleico

Los constructos de ácido nucleico de la invención como se define en las reivindicaciones incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica una citosina desaminasa no porcina. Como se usa aquí, la expresión "ácido nucleico" incluye ADN, ARN, análogos de ácido nucleico, y ácidos nucleicos que son bicatenarios o monocatenarios (es decir, una única hebra sentido o antisentido). Los análogos de ácido nucleico se pueden modificar en el resto de la base, en el resto del azúcar, o en la cadena principal de fosfato para mejorar, por ejemplo la estabilidad, hibridación, o

solubilidad del ácido nucleico. Las modificaciones en el resto de la base incluyen desoxiuridina para desoxitimidina, y 5-metil-2'-desoxicitidina y 5-bromo-2'-desoxicitidina para desoxicitidina. Las modificaciones del resto del azúcar incluyen modificación del 2' hidroxilo del azúcar de ribosa para formar azúcares 2'-O-metilo o 2'-O-alilo. La cadena principal de fosfato de desoxirribosa se puede modificar para producir ácidos nucleicos morfolínicos, en los cuales cada resto de la base está enlazado a un anillo morfolino de seis miembros, o ácidos nucleicos peptídicos, en los que la cadena principal de desoxifosfato se sustituye por una cadena principal pseudopeptídica y se retienen las cuatro bases. Véanse, Summerton y Weller (1997) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 7(3):187-195; y Hyrup et al. (1996) *Bioorgan. Med. Chem.* 4(1):5-23. Además, la cadena principal de desoxifosfato se puede sustituir, por ejemplo, por una cadena principal de fosforotioato o fosforoditioato, un fosforamidito, o una cadena principal de fosfortriéster alquílico.

La secuencia de ácido nucleico que codifica la citosina desaminasa puede estar enlazada operablemente a una región reguladora tal como un promotor. Las regiones reguladoras pueden ser regiones reguladoras porcinas, o pueden proceder de otras especies. Como se usa aquí, "operablemente enlazada" se refiere al posicionamiento o una región reguladora con respecto a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido, a fin de permitir o facilitar la expresión del polipéptido codificado.

Cualquier tipo de promotor puede estar enlazado operablemente a una secuencia de ácido nucleico que codifica una citosina desaminasa. Los ejemplos de promotores incluyen, sin limitación, promotores específicos de tejidos, promotores constitutivos, y promotores sensibles o no sensibles a un estímulo particular. Los promotores específicos de tejido adecuados pueden dar como resultado la expresión preferente de un transcrito de ácido nucleico en células de los islotes, e incluyen, por ejemplo, el promotor de insulina humano. Otros promotores específicos de tejido pueden dar como resultado la expresión preferente en, por ejemplo, hepatocitos o tejido cardíaco, y pueden incluir los promotores de cadena pesada de albúmina o alfa-miosina, respectivamente.

En otras realizaciones, se puede usar un promotor que facilita la expresión de una molécula de ácido nucleico sin especificidad significativa por tejido o especificidad sustancial (es decir, un promotor constitutivo). Por ejemplo, se puede usar un promotor de β -actina, tal como el promotor del gen de β -actina de pollo, el promotor de ubiquitina, el promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), o el promotor de 3-fosfoglicerato quinasa (PGK), así como promotores víricos tales como el promotor de timidina cinasa (TK) del virus del herpes, el promotor de SV40, o un promotor de citomegalovirus (CMV). En algunas realizaciones, como promotor se usa una fusión del promotor del gen β -actina de pollo y el potenciador de CMV. Véanse, por ejemplo, Xu et al. (2001) *Hum. Genre Ther.* 12(5):563-73; y Kiwaki et al. (1996) *Hum. Genre Ther.* 7(7):821-30.

Un ejemplo de un promotor inducible es el sistema del 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 al dominio de activación de VP 16 (proteína transactivadora) del herpes simple para crear un activador transcripcional controlado por tetraciclina (tTA), que es regulado por tet o doxiciclina (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 la muda de piel de los insectos, cuya producción está controlada por un heterodímero del receptor de ecdisona y el producto del gen de ultraespiráculo (USP). La expresión es inducida por el tratamiento con ecdisona o un análogo de ecdisona, tal como muristerona A.

Las regiones reguladoras adicionales que pueden ser útiles en constructos de ácidos nucleicos, incluyen, pero no se limitan a, secuencias de poliadenilación, secuencias de control de la traducción (por ejemplo, un segmento de entrada al ribosoma interno, IRES), potenciadores, elementos inducibles, o intrones. Tales regiones reguladoras pueden no ser necesarias, aunque pueden incrementar la expresión al afectar la transcripción, la estabilidad del ARNm, a la eficiencia traduccional, o similar. Tales regiones reguladoras se pueden incluir en un constructo de ácido nucleico como se desee para obtener expresión óptima de los ácidos nucleicos en la célula o células. Sin embargo, algunas veces se puede obtener una expresión suficiente sin tales elementos adicionales.

Otros elementos que se pueden incluir en un constructo de ácido nucleico codifican péptidos señal o marcadores seleccionables. Tales péptidos señal se pueden usar de manera que el polipéptido codificado se dirige hacia una localización celular particular (por ejemplo, la superficie celular). Los ejemplos no limitantes de marcadores seleccionables incluyen puromicina, adenosina desaminasa (ADA), aminoglucósido fosfotransferasa (neo, G418, APH), dihidrofolato reductasa (DHFR), higromicina-B-fosfotransferasa, timidina cinasa (TK), y xantina-guanina fosforribosiltransferasa (XGPRT). Tales marcadores son útiles para seleccionar transformantes estables en cultivo.

En algunas realizaciones, una secuencia de ácido nucleico que codifica una citosina desaminasa puede incluir una secuencia de etiqueta que codifica una "etiqueta" diseñada para facilitar la manipulación subsiguiente del polipéptido codificado (por ejemplo, para facilitar la localización o detección). Las secuencias de etiqueta se pueden insertar en la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de citosina desaminasas, de manera que la etiqueta codificada está situada en el término carboxilo o en el término amino del polipéptido de citosina desaminasas. Los ejemplos no limitantes de etiquetas codificadas incluyen proteína fluorescente verde (GFP), glutatona S-transferasa (GST), y la etiqueta Flag™ (Kodak, New Haven, CT).

Los constructos de ácidos nucleicos se pueden introducir en células porcinas embrionarias, fetales o adultas de cualquier tipo, incluyendo, por ejemplo, células germinales tales como un oocito o un óvulo, una célula progenitora, una célula madre adulta o embrionaria, una célula de riñón, tal como una célula PK-15, una célula de islote, una célula β , un hepatocito, o un fibroblasto, tal como un fibroblasto dérmico, usando una variedad de técnicas. Los ejemplos no limitantes de técnicas incluyen el uso de sistemas de transposones, virus recombinantes que pueden infectar a las células, o liposomas u otros métodos no víricos tales como electroporación, microinyección, o precipitación con fosfato de calcio, que son capaces de suministrar ácidos nucleicos a las células.

En los sistemas de transposones, la unidad transcripcional de un constructo de ácido nucleico, es decir, la región reguladora operablemente enlazada a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de citosina desaminasas, está flanqueada por una repetición invertida de un transposón. Se han desarrollado varios sistemas de transposones, incluyendo, por ejemplo, Sleeping Beauty (véase la patente U.S. nº 6.613.752 y la Publicación de Patente U.S. nº 20050003542), Frog Prince (Miskey et al. (2003) *Nucleic Acids Res.* 31(23):6873-81), y Skipper, para introducir ácidos nucleicos en las células, incluyendo células de ratones, de seres humanos, y de cerdos. El transposón Sleeping Beauty es particularmente útil. Una transposasa puede ser codificada en el mismo constructo de ácido nucleico, o se puede introducir en un constructo de ácido nucleico distinto.

También se pueden incluir elementos aislantes en un constructo de ácido nucleico para mantener la expresión del polipéptido de citosina desaminasas e inhibir la transcripción indeseada de genes hospedantes. Véase, por ejemplo, la Publicación de Patente U.S. nº 20040203158. Típicamente, 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 a la matriz (MAR), y elementos aislantes de tipo frontera. Véanse, por ejemplo, las patentes U.S. nºs 6.395.549, 5.731.178, 6.100.448, y 5.610.053, y la Publicación de Patente U.S. nº 20040203158.

Los vectores víricos que se pueden usar incluyen vectores de adenovirus, virus adeno-asociados (AAV), retrovirus, lentivirus, virus de la vacuna, virus del sarampión, virus del herpes, y virus del papiloma bovino. Véase Kay et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 12744-12746 para un repaso de vectores víricos y no víricos. Los vectores víricos se modifican de manera que se ha alterado o eliminado el tropismo nativo y la patogenicidad del virus. El genoma de un virus también se puede modificar para incrementar su infecciosidad y alojar el empaquetamiento del ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés.

Los vectores adenovíricos se pueden manipular fácilmente en el laboratorio, pueden transducir eficientemente células en división y que no se dividen, y raramente se integran en el genoma del hospedante. Smith et al. (1993) *Nat. Genet.* 5, 397-402; y Spector y Samaniego (1995) *Meth. Mol. Genet.*, 7, 31-44. El adenovirus se puede modificar de manera que la región E1 se elimina del genoma del ADN bicatenario para proporcionar espacio para el ácido nucleico que codifica el polipéptido y eliminar la proteína E1a de transactivante, de manera que el virus no se puede replicar. Los adenovirus se han usado para transducir una variedad de tipos celulares, incluyendo, entre otros, queratinocitos, hepatocitos, y células epiteliales.

Los vectores víricos adeno-asociados (AAV) demuestran un amplio intervalo de tropismo e infecciosidad, aunque no muestran patogenicidad humana y no provocan una respuesta inflamatoria. Los vectores AAV muestran integración específica del sitio, y pueden infectar a células que no se dividen. Los vectores AAV se han usado para suministrar ácido nucleico al cerebro, músculo esquelético y al hígado durante un largo período de tiempo (por ejemplo, > 9 meses en ratones) en animales. Véase, por ejemplo, la patente U.S. nº 5.139.941 para una descripción de vectores AAV.

Los retrovirus son el sistema de suministro vírico mejor caracterizado, y se han usado en ensayos clínicos. Los vectores retrovíricos median la eficiencia de la transferencia de ácidos nucleicos elevada y la expresión. Los retrovirus entran en una célula mediante fusión directa a la membrana plasmática, y se integran en el cromosoma del hospedante durante la división celular.

Los lentivirus también se pueden usar para suministrar ácidos nucleicos a las células, y en particular, a células que no se dividen. La replicación de vectores a base de HIV tipo I deficientes se ha usado para transducir una variedad de tipos celulares, incluyendo células madre. Véase, Uchida et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 11939-11944.

Los vectores no víricos se pueden suministrar a las células vía liposomas, que son vesículas de membranas artificiales. La composición del liposoma es habitualmente una combinación de fosfolípidos, particularmente fosfolípidos con temperatura de transición de fase elevada, habitualmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También se pueden usar otros fosfolípidos y otros lípidos. Las características físicas de los liposomas dependen del pH, de la fuerza iónica, y de la presencia de cationes divalentes. La eficiencia de la transducción de los liposomas se puede incrementar usando dioleoilfosfatidiletanolamina durante la transducción. Véase, Felgner et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 2550-2561. Hay comercialmente disponibles liposomas de alta eficiencia. Véase, por ejemplo, SuperFect® de Qiagen (Valencia, CA).

Cerdos transgénicos

Las células nucleadas de los cerdos transgénicos proporcionados aquí contienen un constructo de ácido nucleico descrito anteriormente. Como se usa aquí, "cerdo transgénico" incluye cerdos transgénicos fundadores así como la progenie de los fundadores, progenie de la progenie, etc., con la condición de que la progenie retenga el constructo de ácido nucleico. Por ejemplo, un animal fundador transgénico se puede usar para reproducir animales adicionales que contengan el constructo de ácido nucleico.

También se proporcionan aquí tejidos obtenidos de los cerdos transgénicos, y células derivadas de los cerdos transgénicos. Como se usa aquí, "derivadas de" indica que las células se pueden aislar directamente del cerdo, o pueden ser una progenie de tales células. Por ejemplo, se puede obtener de un cerdo tejido de cerebro, de pulmón, de hígado, de páncreas, de corazón y corazón y válvulas cardíacas, de músculo, de riñón, de tiroides, de la córnea, de piel, de vasos sanguíneos o de otros tejidos conjuntivos. También se pueden derivar de cerdos transgénicos, por ejemplo, células sanguíneas y hematopoyéticas, islotes de Langerhans, células β , células del cerebro, hepatocitos, células renales y células procedentes de otros órganos y fluidos corporales. Los órganos y células procedentes de cerdos transgénicos se pueden trasplantar en un paciente humano. Por ejemplo, los islotes de cerdos transgénicos se pueden trasplantar a pacientes diabéticos humanos.

En la técnica se pueden usar diversas técnicas para introducir constructos de ácidos nucleicos en animales no humanos para producir estirpes fundadoras, en las que el constructo de ácido nucleico se integra en el genoma. Tales técnicas incluyen, sin limitación, microinyección pronuclear (patente U.S. n° 4.873.191), transferencia génica mediada por retrovirus en estirpes germinales (Van der Putten et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6148-1652), dirección génica hacia células madre embrionarias (Thompson et al. (1989) Cell 56, 313-321), electroporación de embriones (Lo (1983) Mol. Cell. Biol. 3, 1803-1814), y transformación *in vitro* de células somáticas, tales como células del cúmulo o mamarias, o células madre adultas, fetales o embrionarias, seguido del trasplante nuclear (Wilmut et al (1997) Nature 385, 810-813, y Wakayama et al. (1998) Nature 394, 369-374). La microinyección pronuclear y la transferencia nuclear de células somáticas son técnicas particularmente útiles.

Típicamente, en la microinyección pronuclear, un constructo de ácido nucleico descrito anteriormente se introduce en un óvulo fertilizado; se usan 1 ó 2 óvulos fertilizados celulares como los pronúcleos que contienen el material genético procedente de la cabeza del esperma y el óvulo son visibles dentro del protoplasma. Los constructos de ácido nucleico linealizados se pueden inyectar en uno de los pronúcleos, después los óvulos inyectados se pueden transferir a una hembra receptora (por ejemplo, en los oviductos de una hembra receptora) y se dejan desarrollar en la hembra receptora para producir los cerdos transgénicos.

En la transferencia nuclear de células somáticas, una célula de cerdo transgénico, tal como un fibroblasto fetal que incluye un constructo de ácido nucleico como se describe anteriormente, se puede introducir en un oocito enucleado para establecer una célula combinada. Los oocitos se pueden enuclea mediante disección de zona parcial cerca del cuerpo polar, y después comprimiendo el citoplasma en el área de disección. Típicamente, se usa una pipeta de inyección con una punta biselada puntiaguda para inyectar la célula transgénica en un oocito enucleado detenido en la meiosis 2. En algunas convenciones, los oocitos detenidos en la meiosis 2 se denominan "óvulos". Tras producir un embrión porcino (por ejemplo, fusionando y activando el oocito), el embrión porcino se transfiere a los oviductos de una hembra receptora, alrededor de 20 a 24 horas tras la activación. Véanse, por ejemplo, Cibelli et al. (1998) Science 280, 1256-1258 y patente U.S. n° 6.548.741. Las hembras receptoras se puede comprobar para determinar si están preñadas, aproximadamente 20-21 días después de la transferencia de los embriones.

Se pueden usar técnicas de reproducción estándar para crear animales que son homocigotos para el polipéptido de citosina desaminasas procedente de los animales fundadores heterocigotos iniciales. La homocigosidad, sin embargo, puede no ser necesaria para observar una capacidad reducida a la hora de transmitir PERV a células humanas.

Una vez que se han generado cerdos transgénicos, la expresión de polipéptidos de citosina desaminasa se puede evaluar usando técnicas estándar. El cribado inicial se puede lograr mediante análisis de transferencia Southern para determinar si ha tenido lugar o no la integración del constructo. Para la 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; NY. También se pueden usar en el cribado inicial técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR se refiere a un procedimiento o técnica en la que se amplifican ácidos nucleicos diana. Generalmente, se emplea información de secuencia procedente de los extremos de la región de interés o más allá para diseñar cebadores oligonucleotídicos que son idénticos o similares en secuencia a hebras opuestas del molde a amplificar. La PCR se puede usar para amplificar secuencias específicas procedentes de ADN así como de ARN, incluyendo secuencias de ADN genómico total o ARN celular total. Los cebadores tienen típicamente una longitud de 14 a 40 nucleótidos, pero pueden oscilar en longitud de 10 nucleótidos a cientos de nucleótidos. La PCR se describe, por ejemplo, en PCR Primer: A Laboratory Manual, ed. Dieffenbach y Dveksler, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. Los ácidos nucleicos también se pueden amplificar mediante reacción en cadena de la ligasa, amplificación por desplazamiento de hebra, replicación de secuencia autosostenida, o se pueden amplificar basándose en la secuencia de ácidos nucleicos. Véanse, por ejemplo, Lewis (1992) Genetic Engineering News 12, 1; Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1874-1878; y Weiss (1991) Science 254, 1292-1293.

La expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de citosina desaminasas (por ejemplo, un polipéptido de APOBEC3F y/o de APOBEC3G) en los tejidos de cerdos transgénicos se puede evaluar usando técnicas que incluyen, sin limitación, análisis de transferencia Northern de muestras de tejido obtenidas del animal, análisis de hibridación *in situ*, análisis Western, inmunoensayos tales como ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas, y PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR). La expresión de un polipéptido de citosina desaminasas no porcinas en al menos algunas de las células del cerdo puede dar como resultado, al cocultivarlas con células humanas, una menor capacidad de las células para transmitir PERV a las células humanas.

La menor capacidad para transmitir PERV se puede evaluar, por ejemplo, mediante ensayo de cocultivo. Las células de cerdo transgénico y las células humanas (por ejemplo, células 293T) se pueden separar físicamente mediante una membrana delgada con poros de un tamaño de 1 micrómetro, y se pueden cocultivar durante aproximadamente 50 generaciones o 25 días. Tal membrana permite la difusión libre de pequeñas moléculas, incluyendo partículas víricas que no permiten la difusión de células. Al final del periodo de cultivo, las células humanas se pueden cosechar y ensayar para determinar la actividad de transcriptasa inversa de los PERV (como una medida de la infecciosidad) usando un ensayo ELISA (por ejemplo, de Cavid Tech, Uppsala, Suecia). Se entiende que un fenotipo particular en un animal transgénico se evalúa típicamente comparando el fenotipo en el animal transgénico con el fenotipo correspondiente mostrado por un animal no humano de control que carece del transgén.

Los cerdos transgénicos de la invención como se definen en las reivindicaciones se pueden reproducir con otros animales de interés (por ejemplo, animales con antecedentes compatibles con trasplante, tales como cerdos con un gen de α -1,3 galactosil transferasa inactivado). Los animales de la progenie resultantes pueden ser particularmente útiles para el xenotrasplante, debido al menor riesgo de transmitir retrovirus endógenos a células humanas, y al menor riesgo de rechazo hiperagudo. Tales animales se pueden producir, por ejemplo, cruzando (a) un cerdo transgénico que expresa un polipéptido de citosina desaminasas no porcinas con (b) un cerdo transgénico con un gen de α -1,3 galactosil transferasa inactivado. Como alternativa, los cerdos transgénicos o de una sola estirpe se pueden producir preparando inicialmente los cerdos usando los transgenes apropiados.

La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Materiales y métodos para los Ejemplos 2-7

Cepas de levadura. Los ensayos de mutaciones de levaduras se realizaron en L40 ($MAT\alpha$ his3 Δ 200 *trp1-901 leu2-3112 ade2 LYS2::(LexAOp)₄-HIS3 URA3::(LexAOp)₈-lacZ GAL4*) (1). Los ensayos de retrotransposición se realizaron en DG1251 ($MAT\alpha$ *ura3-167 trp1-hisG spt3-101 HIS3 Δ 200*) o GRY1990, un derivado de DG1251 en el que β -galactosidasa de *E. coli* es expresada constitutivamente a partir del promotor PGK1 de levadura (Nissley et al., (1996) Nature 380, 30; Nissley et al (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 13905-10). Los ensayos de retrotransposición endógena se llevaron a cabo en DG1141 [$MAT\alpha$ *trp1-hisG ura3-167 HIS3 Δ 200 Tyl-2y2his3A1*; (Curcio y Garfunkel (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 936-40). Se construyó L40 *ung1::kanMX4* amplificando el casete *ung1::kanMX4* a partir de la cepa de supresión de levadura 36067 (R. Wright, Universidad de Minnesota), transformando L40 con el producto de la PCR resultante y seleccionando colonias resistentes a G418 (Wach et al. (1994) Yeast 10, 1793/1808)). La supresión *ung1* se confirmó mediante PCR y cribado para un fenotipo mutante *CAN1* modesto.

Plásmidos. Los constructos se basaron en pHybLex-Zeo o pJG4-5 (Invitrogen, Carlsbad, CA). La proteína de fusión LexAAPOBEC3G se construyó subclonando APOBEC3G a partir de pAPOBEC3G-IRES-Bleo (Harris et al. (2003) Cell 113, 803-809) usando *NotI* y *PstI*. APOBEC3G sin etiquetar en pHybLex-Zeo contiene una inserción de 5 pb entre los marcos de lectura abiertos de LexA y APOBEC3G.

Ugi se subclonó a partir de pEF-Ugi (Di Noia y Neuberger (2002) Nature 419, 43-48) como un fragmento de *EcoRI* y *NotI* en pcDNA3.1 (Invitrogen). Se subclonó en pYES3-CT usando *HindIII* y *NotI* (Invitrogen). La expresión Ugi se confirmó usando el ensayo de mutación de *CAN1*. Las de secuencias de HIV-1 Vif de tipo salvaje se amplificaron mediante PCR a partir de plásmidos províricos YU-2 y IIIB de HIV-1 (M. Malim, Kings College London), se digirieron con *NcoI* y *BamHI*, y se clonaron en primer lugar en pTrc99A cortado de forma similar (AP Biotech). Vif se subclonó subsiguientemente en pHybLex-Zeo usando una digestión con *NcoI* y *PstI*, y finalmente en pJG4-5 usando *EcoRI* y *SphI*. APOBEC3F se subclonó a partir pTrc99A-APOBEC3F (Liddament et al. (2004) Curr. Biol. 14, 1385-1391) tanto en pHybLex-Zeo como en pJG4-5 usando *EcoRI* y *SalI*.

Las versiones marcadas con his3AI inducible por galactosa (GAL) de Ty1 (pGALTy1) y TyHRT (pHART21) se describieron previamente (Nissley et al., 1996, *más arriba*; Nissley et al., 1998, *más arriba*).

Ensayos de mutaciones de levadura. Se transformaron pHybLex-Zeo, pJG4-5, pYES3-TC y sus derivados en L40, y se seleccionaron usando un medio completo sintético que contiene zeocina (300 µg/ml) y que carece de triptófano (SC + ZEO-TRP) (Ausubel et al. (2002) (John Wiley and Sons, Inc.). Se usaron varios miles de células viables procedentes de colonias independientes para inocular 2,5 ml de SC + GAL + RAF + ZEO-TRP (2% de galactosa, 1% de rafinosa, 300 µg/ml de zeocina). Los cultivos se hicieron crecer a 30°C durante 3-4 días, se concentraron 5 veces, y se colocó una fracción en una placa a SC + CAN-ARG (30 µg/ml de CAN) para obtener mutantes resistentes a canavanina (Can^R). Los recuentos de células viables se obtuvieron colocando en placa una dilución hasta medio rico. Las células viables se contaron después de 2 días, y las colonias Can^R se contaron después de 3-4 días de incubación a 30°C. El gen *CAN1* de las colonias Can^R se amplificó mediante PCR y se secuenció como se da a conocer previamente. (Marsischky et al. (1996) Gene Dev. 10, 407-420). Los valores exactos para las frecuencias de mutación se obtuvieron usando múltiples cultivos independientes (6-8) para cada cepa en cada experimento, y repitiendo cada experimento al menos dos veces y tanto como siete veces. Se usó Sequencher (Genes Codes Corp) para los análisis mutacionales.

Inmunotransferencia. Los peletes celulares procedentes de un cultivo de 10 ml en fase logarítmica se lavaron con 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 20%, se resuspendieron en 50 µl de TCA al 20%, y después se lisaron sometiéndolos a vórtice con un volumen igual de perlas de vidrio a 4°C. El sobrenadante se centrifugó para peletizar las proteínas. Las proteínas peletizadas se resuspendieron en 100 µl de tampón de carga de gel de SDS, se separaron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a una membrana de PVDF, y se sondaron con anticuerpos contra APOBEC3G (Newman et al. (2005) Curr. Biol. 15, 166-170), LexA (Invitrogen), o Vif (Fouchier et al. (1996) J. Virol 70, 8263-8269; Simon et al. (1997) J. Virol 69, 4166-4172; Simon et al. (1997) J. Virol. 71, 5259-5267).

Ensayos de retrotransposición de Ty1. Los plásmidos *Ty-his3AI*, *TyHRT-his3AI*, *Ty-lucAI* o *TyHRT-lucAI* se cotransformaron con pJG4-5, pJG4-5-APOBEC3G o pJG4-5-APOBEC3F en DG1251 o GRY1990 (Gietz et al. (1995) Yeast 11, 355-360), y se seleccionaron usando SC-URA-TRP + GLC.

Los transformantes *his3AI* se hicieron crecer en SC-URA-TRP + GLC hasta saturación. Se subcultivaron aproximadamente 10⁶ células en 1 ml de SC-URA-TRP + GAL durante 12 horas, y se una alícuota en placa con SC-HIS. La viabilidad celular se determinó colocando en placa una dilución a medio rico. La retrotransposición se cuantificó determinando la frecuencia de colonias His⁺.

Los transformantes *lucAI* se hicieron crecer 1 día en SC-URA-TRP + GLC. Las células se transfirieron a SC-URA-TRP + GAL y se hicieron crecer durante 2 días adicionales a 30°C para inducir la expresión de retroelementos y la transcripción inversa. La retrotransposición se cuantificó midiendo los niveles activos relativos de luciferasa a β-galactosidasa. Todas las incubaciones para los ensayos de Ty1 a base de plásmidos se realizaron a 30°C.

Para los ensayos de retrotransposición endógena, se transformó DG1141 con pJG4-5, pJG4-5-APOBEC3G, o pJG4-5-APOBEC3F. Las colonias individuales resuspendieron en agua y se transfirieron 10-50.000 células a 2 ml de SC-TRP + GAL y se hicieron crecer a 20°C durante 7-10 días hasta que los cultivos alcanzaron la saturación. Las diluciones de los cultivos de partida y del final se colocaron en placas con medios ricos para determinar el número de células viables, y se colocó en placas el equivalente de 1 ml del cultivo saturado en SC-HIS para puntuar los efectos de retrotransposición.

Secuenciación de ADN de Ty1. Los ADNc de Ty1 y TyHRT retrotranspuestos se aislaron haciendo crecer colonias His⁺ toda la noche en 10 ml de SC-HIS a 30°C y preparando ADN con un método estándar de extracción con perlas de vidrio/fenol. El ADN resultante se usó para amplificar una región de 1.026 (Ty) o 971 (TyHRT) pb que abarca el gen RT y *HIS3* usando 5'-TTC ATG TGG GAC ACT AGA GAT (TyRT, SEC ID NO:1) o 5'-CCT GAG TGG GAG TTG TTA (TyHRT, SEC ID NO:2) y 5'-TAT GAT ACA TGC TCT GGC CAA (HIS3, SEC ID NO:3). Los productos de la PCR se purificaron (Qiagen) y se secuenciaron con 5'-GT CTG CGA GGC AAG AAT GAT (SEC ID NO: 4). Los sucesos de retrotransposición negativos para GFP se obtuvieron de conjuntos de ADN genómico de colonias His⁺ mediante transformación en *E. coli*. Las colonias negativas para GFP se identificaron usando luz fluorescente, y el ADN plasmídico residente se amplificó (como antes, excepto que el producto tenía 2,1 kb para Ty RT) y se secuenció usando 5'-C GTT ATC CGG ATC ATA TGA (SEC ID NO: 5) y 5'-G TAG TTC CCG TCA TCT TGA (SEC ID NO: 6).

EJEMPLO 2

APOBEC3G estimula la mutación en *Saccharomyces cerevisiae* vía la ruta de escisión de uracilo

Para ensayar si APOBEC3G humana podría provocar su actividad mutante distintiva en levadura, se expresó una proteína de fusión LexA-APOBEC3G en una cepa haploide L40, y se monitorizó la acumulación de mutaciones que confieren resistencia al aminoácido tóxico canavanina. Se hicieron crecer cultivos líquidos a partir de colonias individuales que expresan APOBEC3G o un vector de control, y después se colocaron sobre medio sólido que contiene canavanina. Los números de colonias resistentes a canavanina (Can^R) se determinaron después de 3-4 días de crecimiento. En contraste con las células que expresan un vector de control, aquellas que expresan

LexAAPOBEC3G mostraron un incremento de 20 veces en la frecuencia de la mediana de la mutación Can^R , sugiriendo que APOBEC3G fue capaz de desaminar citosinas en ADN genómico de levadura (FIG. 1A; la FIG. 2).

Para comenzar a determinar si el fenotipo mutante inducido por LexA-APOBEC3G se produjo mediante un mecanismo de desaminación $\text{C} \rightarrow \text{U}$, nos preguntamos si la deficiencia de uracilo ADN glucosilasa exacerbaría este fenotipo. Puesto que la mayoría de los organismos a base de ADN usan uracilo ADN glucosilasa para deshacerse en sus genomas de uracilo (Barnes y Lindahl (2004) *Annu. Rev. Genet.* 38, 445-476), es probable que, si este fuese el mecanismo, entonces muchas de las lesiones de uracilo inducidas por APOBEC3G se habrían reparado, y que la frecuencia de mutación observada sería una subestimación de la actividad de APOBEC3G. De hecho, la levadura que expresa tanto APOBEC3G como una proteína inhibidora de uracilo ADN glucosilasa (Ugi) mostró un incremento de 320 veces la frecuencia de la mediana de la mutación para Can^R (FIG. 1B). Esta estimulación fue aproximadamente 6 veces y 26 veces mayor que la observada en células de levadura que expresan LexA-APOBEC3G y que expresan Ugi, respectivamente, indicando que muchos de los uracilos dependientes de APOBEC3G se repararon mediante un mecanismo de escisión de uracilo.

En levadura, la principal uracilo ADN glucosilasa es Unglp (proteína uracilo ADN N-glucosilasa 1). Unglp y la mayoría de otras proteínas Ung procedentes de bacterias para seres humanos están fuertemente inhibidas por Ugi (Mol et al., (1995) *Cell* 82, 701-708). Sin embargo, las actividades de escisión de uracilo resistentes a Ugi se producen en células de mamíferos, tales como aquellas provocadas por las proteínas SMUG1 y TDG1 (Barnes y Lindahl (2004) *más arriba*). Para eliminar la posibilidad de que algunos de los uracilos inducidos por APOBEC3G puedan ser reparados por sistemas auxiliares en levadura, se usó recombinación homóloga para construir una cepa de supresión Unglp, L40 *Ung1::kanMX4*. Esta cepa mostró niveles de mutación Can^R virtualmente indistinguibles de células que expresan Ugi en presencia o ausencia de APOBEC3G (Figura 3). De este modo, la mayoría de las lesiones inducidas por APOBEC3G en levadura se repararon mediante un mecanismo dependiente de Unglp. Junto con la especificidad exquisita que tiene Ung1p por uracilo, estos datos indicaron que el fenotipo mutante dependiente de APOBEC3G fue atribuible a un mecanismo de desaminación de citosina de ADN.

APOBEC3G está localizada principalmente en el citoplasma de células de mamífero. Por lo tanto, fue sorprendente que su expresión en levadura provocase frecuencias elevadas de mutación. Para asegurarse de que las frecuencias elevadas de mutación no eran atribuibles a las propiedades de unión a ADN de la etiqueta LexA, se monitorizó la frecuencia de mutación *CAN1* de células que expresan LexA-APOBEC3G o APOBEC3G sin etiquetar. Se observó poca diferencia en las frecuencias globales de la mediana de la mutación Can^R , demostrando que el dominio de unión a ADN de LexA no fue responsable del fenotipo mutante dependiente de APOBEC3G (FIG. 1B).

EJEMPLO 3

APOBEC3G dispara predominantemente mutaciones de transición $\text{C/G} \rightarrow \text{T/A}$ en levadura

CAN1 codifica un transportador de arginina que abarca la membrana que se debe inactivar para que se produzca el crecimiento en presencia del análogo de arginina tóxico canavanina. Una amplia variedad de sustituciones, inserciones, supresiones o mutaciones más complejas de bases pueden conferir Can^R [por ejemplo, (Huang et al., (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 11529-11534; Rattray et al (2002) *Genetics* 162, 1063-1077]. Para investigar adicionalmente el mecanismo del fenotipo mutante inducido por APOBEC3G, se secuenció el gen *CAN1* de un gran número de colonias Can^R . De acuerdo con los estudios previos, las células que contienen un vector de control presentaron un amplio intervalo de mutaciones *CAN1*, incluyendo transiciones (26%), transversiones (43%), inserciones (3%) y supresiones (28%) (FIG. 4A-4B). Por el contrario, la inmensa mayoría (90%) de las mutaciones *CAN1* en células que expresan APOBEC3G fueron transiciones $\text{C/G} \rightarrow \text{T/A}$. Las transiciones inducidas por APOBEC3G ocurrieron a expensas de otros tipos de mutaciones, dando cuenta de la frecuencia elevada de la mutación Can^R (FIG. 4A-4B).

La levadura que carece de Ung1p debido a la expresión de Ugi también presentó un nivel mayor de mutaciones de transición $\text{C/G} \rightarrow \text{T/A}$ (64%), como sería de esperar de células que carecen de reparación de escisión de uracilo (FIG. 4C-4D). Sin embargo, 5/7 de estas transiciones se produjeron en posiciones que no estaban mutadas en células que expresan APOBEC3G. La coexpresión de Ugi y de APOBEC3G dio como resultado un desplazamiento de la transición $\text{C/G} \rightarrow \text{T/A}$ todavía más fuerte (95%), y 19/21 de estas mutaciones se produjeron en sitios que también estaban mutadas en células de levadura que expresan APOBEC3G (negativas a Ugi) (FIG. 4C-4D). Estos datos demuestran además que APOBEC3G es capaz de disparar la hipermutación genómica en levadura mediante un mecanismo de desaminación $\text{C} \rightarrow \text{U}$.

EJEMPLO 4

La preferencia de la mutación de APOBEC3G local en levadura es casi idéntica a la observada en sustratos retrovíricos modelo

Un examen más detallado de las transiciones C/G → T/A disparadas por la expresión de APOBEC3G reveló que 37/37 se producían dentro del dinucleótido 5'-CC, que se podía encontrar en la hebra del dúplex de ADN (FIGS. 4 y 5). La expresión de APOBEC3G sola disparó mutaciones de transición C/G → T/A en 14 sitios distintos en el gen *CAN1*. La coexpresión de APOBEC3G y Ugi provocó mutaciones de transición C/G → T/A en 6 sitios idénticos y 2 sitios adicionales. Los tres sitios dinucleotídicos 5'-CC más frecuentemente mutados por APOBEC3G, C₃₅₆, C₆₅₆ y C₁₁₉₅, dan cuenta del 48% de las mutaciones de sustitución de bases dependientes de APOBEC3G y de APOBEC3G-más-Ugi combinadas totales. La preferencia de secuencia extendida de APOBEC3G en el sistema de levadura se comparó con la definida previamente en sistemas retrovirales de HIV y MLV modelos como 5'-YCC_A [Y = C o T]. De forma interesante, APOBEC3G mostró una preferencia por 5'-CCCA sorprendentemente similar en levadura (FIG. 5), indicando que su preferencia estaba intacta, como se observa en otros sistemas.

Es notable además que, además de un gran número de mutaciones de transición C/G → T/A, se detectaron cuatro supresiones y una única inserción en el gen *CAN1* de células de levadura que expresan APOBEC3G (FIG. 4; datos combinados que incluyen los experimentos de Ugi). Tres de cinco de estas alteraciones se produjeron en o inmediatamente adyacentes a un punto caliente de APOBEC3G preferido o potencial, 5'-CCC. Por el contrario, sólo 1/12 de las supresiones e inserciones encontradas en células que contienen el vector de control se produjeron en sitios similares. El resto (11/12) se distribuyeron por todo el gen *CAN1*, y estaban causadas presumiblemente por una variedad de mecanismos. La presencia de supresiones e inserciones asociadas con puntos calientes de APOBEC3G sugirió que los sucesos de desaminación C → U son capaces de precipitar una gran inestabilidad genómica. Esto es apoyado además por la observación de que una pequeña proporción (aproximadamente 5%) de los mutantes *Can^R* no produjeron un producto de PCR específico del gen *CAN1*, representando potencialmente lesiones a mayor escala.

EJEMPLO 5

Efecto de HIV-1 Vif sobre hipermutación de levadura inducida por APOBEC3G

En primates tales como seres humanos y chimpancés, Vif contrarresta la actividad antirretroviral de APOBEC3G al dirigirse contra ella en busca de la degradación proteosómica. Vif logra esto uniéndose a APOBEC3G. Algunos datos sugieren que esta asociación sola puede alterar directamente la función APOBEC3G (Stopak et al. (2003). *Mol. Cell.* 12, 591-601). Por lo tanto, se evaluó si la interacción entre Vif y APOBEC3G se podría detectar usando este sistema de ensayo de levadura.

HIV-1 Vif, derivado de YU2 o del provirus IIIB, se expresó junto con APOBEC3G usando vectores de cebo o presa de dos híbridos de levadura. Se ensayaron todas las posibles combinaciones por parejas en busca de la capacidad para conducir los genes informadores de dos híbridos de levadura *lacZ* o *HIS3*. No se observó actividad de β-galactosidasa o de prototrofia para histidina significativa, a pesar de los intentos repetidos (datos no mostrados). Este resultado no fue atribuible a un fallo de expresión, ya que ambas proteínas se pudieron detectar en los lisados celulares mediante inmunotransferencia.

Sin embargo, debido a que algunas interacciones débiles o transitorias pueden escapar a la detección por el ensayo de dos híbridos de levadura, se razonó que el ensayo de mutación *CAN1* sensible puede proporcionar un método más robusto para monitorizar esta interacción. Para examinar si el HIV-1 Vif podría afectar a la hipermutación mediada por APOBEC3G en levadura, se compararon las frecuencias de la mutación *Can^R* de las células que co-expresan Vif y APOBEC3G con aquellas de células que expresan cualquiera de las proteínas sola. La hipermutabilidad robusta de APOBEC3G no se vio afectada significativamente por la co-expresión de HIV-1 Vif. Por lo tanto, no se detectó una interacción Vif-APOBEC3G en levadura.

EJEMPLO 6

APOBEC3F y APOBEC3G inhiben la retrotransposición de Ty1

Para explorar la posibilidad de que las proteínas APOBEC3 funcionan para impedir la movilidad de retroelementos endógenos que se replican usando secuencias de LTR, se evaluó la capacidad del retrotransposón de levadura Ty1 para replicarse, en presencia de APOBEC3G o su homólogo APOBEC3F. La actividad de Ty1 se monitorizó usando un gen indicador de retrotransposición interrumpido por intrón (FIG. 6A). La expresión del ARN de Ty1, el ajuste, la transcripción inversa y la integración produjeron copias de ADNc del gen informador funcional, que codifican prototrofia para histidina o actividad de luciferasa.

La capacidad de Ty1-*his3AI* para retrotransponerse se monitorizó en presencia de APOBEC3F o -3G humana (FIG. 6B). En comparación con las células que contienen un vector de control, se detectó un promedio de 51% o 70% menos de colonias *His⁺* en presencia de APOBEC3F o -3G, respectivamente. Se observaron disminuciones ligeramente mayores dependientes de APOBEC3 en la retrotransposición de Ty1-*lucAI*, según se monitorizó mediante los niveles relativos de luciferasa presente en cultivos líquidos (FIG. 6C). Sin embargo, se observó una inhibición casi total (94-98%) cuando se evaluó la retrotransposición de un elemento Ty1-*his3AI* genómico en

presencia de APOBEC3F o -3G, sugiriendo que la relación de proteína APOBEC3 a intermedio de retrotransposición (y/o factores hospedantes Ty) es un determinante clave de este mecanismo inhibitorio (FIG. 7). Juntos, estos datos demuestran claramente que APOBEC3F o -3G pueden inhibir la retrotransposición de Ty1.

5 Para evaluar si la inhibición dependiente de APOBEC3 de la retrotransposición en la levadura se podía ver influida por la transcriptasa inversa o la ruta de la integración, se realizaron ensayos similares con constructos de Ty1 en los que la transcriptasa inversa normal se sustituyó por aquella de HIV-1 [TyHRT]. La integración de TyHRT se produce predominantemente mediante recombinación homóloga, mientras que la integración de Ty1 usa mayoritariamente su propia integrasa. La retrotransposición tanto de TyHRT-*HisAI* como de TyHRT-*LucAI* (es decir, la acumulación de productos de transcriptasa inversa de HIV-1) también se vio inhibida por la expresión de APOBEC3F o de APOBEC3G (FIG. 6D, E). Los niveles de inhibición fueron casi similares a los observados con transcriptasa inversa de Ty1, indicando que ni la transcriptasa inversa ni la ruta de integración fueron efectores claves del bloqueo de la retrotransposición impuesta por APOBEC3. Estos datos destacan además la utilidad del sistema de Ty1 de levadura para estudiar aspectos tanto de APOBEC3 y como de la biología del HIV-1.

EJEMPLO 7

15 La restricción de Ty1 por APOBEC3F y APOBEC3G implica un mecanismo de desaminación de citosina de ADNc

Puesto que la desaminación C → U de ADNc es una actividad anti-retroviral distintiva de APOBEC3F y -3G, nos preguntamos si esto podría dar cuenta del bloqueo de la retrotransposición de Ty1 observado. Si es así, se esperó que se encontraría un número exorbitante de mutaciones de transición C → T de hebra menos retrotransposónicas entre los integrantes His⁺ (equivalentes a transiciones G → A de hebra más). Se secuenció alrededor de 26 y 47 kpb del molde TyRT-*HIS3* generado en presencia de APOBEC3F y -3G, respectivamente, y sólo se encontraron dos transiciones C → T entre los moldes expuestos a APOBEC3G. Una se produjo en el consenso dinucleotídico 5'-GC, que es raramente preferido por esta proteína, y por lo tanto probablemente representa una transcripción inversa o error de PCR. La segunda ocurrió en el trinucleótido 5'-CCC, que es el sitio preferido de APOBEC3G más habitual. Sin embargo, este número escaso de sustituciones de bases puede haber sido debido en parte al hecho de que se analizaron integrantes His⁺ (y no His⁻) funcionales. Es posible además que restos de uracilo en el ADNc retrotransposónico disparasen su degradación, como se teorizó originalmente para retrovirus (Harris et al. (2003) Cell 113, 803-809).

Por lo tanto, para abordar la posibilidad primera y enriquecer las mutaciones, se usó una versión modificada del sistema *Ty-his3AI* en la que se colocó un casete de GFP en dirección 5' de *his3AI* (FIG. 8A). Esto permitió la selección de integrantes His⁺ y un cribado subsiguiente para variantes no seleccionados negativos para GFP. Se recuperaron veinte mutantes de GFP independientes a partir de los experimentos de retrotransposición en los que se expresó APOBEC3G. Cada secuencia contenía al menos una mutación y tantas como 15 mutaciones. En total, se identificaron 57 mutaciones de sustituciones de bases, y 47 de éstas fueron transiciones C → T de hebra menos (FIG. 8B, la FIG. 9A). Casi todas las transiciones dependientes de APOBEC3G ocurrieron en el consenso 5'-YCC, idéntico al sitio de consenso de desaminación de citosina preferido en el gen *CAN1* y en una variedad de otros sistemas (por ejemplo, compárense FIG. 9B y FIG. 5). Además, muchas de las transiciones C → T se produjeron en posiciones que fueron idénticas a las observadas previamente en HIV o MLV que codifica GFP. Se encontró un desplazamiento de transición específico de la hebra similar y secuencias con múltiples transiciones en moldes negativos para GFP producidos en presencia de APOBEC3F (FIG. 9C; FIG. 8B). Sin embargo, en contraste con APOBEC3G, las mutaciones dependientes de APOBEC3F ocurrieron en un consenso 5'-TTC distinto [FIG. 9D; observado previamente con un sustrato de HIV]. De este modo, la retrotransposición de Ty1 se puede inhibir por APOBEC3F y -3G, y gran parte (y posiblemente todo) de este efecto se puede atribuir a un mecanismo de desaminación de citosina del ADNc.

EJEMPLO 8

45 La expresión de APOBEC3G humana en células de cerdo reduce la transferencia de retrovirus endógeno porcino (PERV) a células 293T humanas.

Un constructo para la expresión de APOBEC3G humana se produjo usando el promotor de citomegalovirus (CMV) para llevar a cabo la expresión, y el gen de neomicina como marcador seleccionable. Para evaluar si la proteína APOBEC3G puede inhibir la transmisión de PERV a células humanas, el constructo se introdujo de forma estable en células PK-15 de riñón de cerdo (ATCC # CCL-33) usando el reactivo Fugene®6 (Roche Applied Science, Indianápolis, IN), y las células se seleccionaron para resistencia a neomicina. Las células PK-15 se escogieron para estos experimentos debido a que los PERVs que residen en estas células fueron capaces de infectar células 293T humanas en experimentos de mezclamiento de sobrenadantes simples (Patience et al., (1997) Nat. Med. 3, 282-286). (Obsérvese que los PERVs se pueden transmitir como partículas libres de células solubles en disolución y/o a través de contacto célula-célula). La expresión de APOBEC3G en células PK-15 se confirmó usando anticuerpos específicos (Newman et al. (2004) Curr Biol. 15(2):166-70).

Células PK-15 que expresan un control de vector, APOBEC3G humana (hA3G), o APOBEC3F de cerdo (SsA3F) se cocultivaron con células 293T humanas durante 25 días (aproximadamente 50 generaciones de células); los dos tipos celulares se separaron físicamente mediante una membrana delgada con poros de tamaño de 1 micrómetro, que permitieron la difusión libre de pequeñas moléculas, incluyendo partículas víricas, pero no permitieron la difusión de células. Después de 25 días, se prepararon extractos proteicos de células completas a partir de las células 293T usando procedimientos estándar. Los lisados celulares (10 µg) se ensayaron para determinar la actividad de transcriptasa inversa (RT) de PERV (como una medida de la transferencia de PERVs a las células humanas) usando el ensayo de ELISA de actividad C-type retrovirus RT™, llevado a cabo como se recomienda por el fabricante, Cavid Tech, Uppsala, Suecia. Se detectó poca actividad en células 293T que se hicieron crecer en presencia de células PK-15 que expresan APOBEC3G humana, en contraste con los controles, en los que se detectaron niveles significativos de infección (FIG. 10). Los resultados en la FIG. 10 se muestran como inhibición en veces relativa de la actividad de RT normalizada a la actividad de RT en células 293T cultivadas con células PK-15 que expresan un vector vacío. Este experimento indica que la expresión de A3G humana (pero no la expresión de APOBEC3F de cerdo adicional) en células PK-15 inhibe la transferencia de PERVs desde células PK-15 hacia 293T células.

Se llevaron a cabo ensayos de PCR en tiempo real, semicuantitativa y cuantitativa, para monitorizar la presencia de ADN de PERVs integrado en células 293T humanas. Se llevó a cabo una PCR semicuantitativa usando 75 ng de ADN genómico molde para células 293T humanas y los cebadores (directo 5'-AA CCC TTT ACC CTT TAT GTG GAT-3', SEC ID NO: 2; inverso 5'-AA AGT CAA TTT GTC AGC GTC CTT-3', SEC ID NO: 3) obtenidos para el gen *pol* de PERV (tamaño del producto: 196 pb). Como se indica en la FIG. 11A, se detectó muy poco ADN de PERV en células 293T que crecen en presencia de células PK-15 que expresan APOBEC3G humana, en contraste con otras muestras en las que se detectaron niveles significativos. Para asegurar que el compartimiento de cocultivo de células humanas no estaba contaminada por células de cerdo (es decir, micro-quimerismo), también se llevó a cabo la PCR usando cebadores específicos para ADN de cerdo (directo 5'-GG AAC CTG CAA CCT ATG GAA-3', SEC ID NO: 4; inverso 5'-GG TGT GGC CCT AAA AAG ACA-3', SEC ID NO: 5) (producto de 351 pb). El panel izquierdo de la FIG. 11B muestra que no se detectaron productos de PCR de cerdo en muestras de 293T procedentes del experimento de cocultivo. El panel derecho contiene controles positivos y negativos. No se detectó micro-quimerismo.

Se realizaron ensayos de PCR en tiempo real cuantitativa en reacciones de 25 µl que contienen 10 ng de ADN genómico de 293T, 100 nM de cebadores, y 2x iQ SYBR Green super mix (BioRad, Hercules, CA), y se realizaron en un sistema de detección de PCR en tiempo real multicolor iCycler iQ (BioRad, Hercules, CA). Las condiciones del termociclador fueron 95 °C durante 5 min., seguido de 50 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 30 segundos. A la ciclación le siguió directamente un análisis de curva de fusión para verificar la amplificación del producto de PCR del genes *pol* de PERV (amplificado como se explica anteriormente). El gen de beta-actina humana (gen de mantenimiento) se amplificó como un control interno usando los siguientes cebadores: directo, 5'-AT CAT GTT TGA GAC CTT CAA-3' (SEC ID NO: 6) e inverso, 5'-A GAT GGG CAC AGT GTG GGT-3' (SEC ID NO: 7) (tamaño del producto: aprox. 100 pb). Todos los datos se normalizaron, y las copias de gen de PERV se presentan por 100.000 copias de beta-actina (FIG. 12). La transferencia de PERV fue manifiesta después de 20 días de cocultivo continuo en células de control de vector, mientras que se produjo poca transferencia en presencia de APOBEC3G humana. De este modo, la expresión de APOBEC3G humana en células PK-15 de cerdo inhibió la transferencia de PERVs desde células PK-15 de cerdo hacia células 293T humanas.

EJEMPLO 9

Proteínas APOBEC3F de dominio de desaminasa doble de artiodáctilos

Se llevaron a cabo búsquedas NCBI BLAST usando los dominios de A3 desaminasa humano y de ratón como polipéptidos de búsqueda. Se identificaron varios ESTs de artiodáctilos (ungulados de pezuña hendida), lo que sugiere la presencia de al menos una proteína A3 en ganado vacuno (*Bos taurus* (Bt), Número de Acceso GenBank BE684372, Smith et al., Gen. Res. 11(4): 626-630, 2001) y en cerdos (*Sus scrofa* (SS), Número de Acceso GenBank BI346898, Fahrenkrug et al., 2002, Mamm Genome, 13, 475-478). Se obtuvieron los clones de ADNc correspondientes, se secuenciaron, y se demostró que codifican proteínas A3 con dos dominios de citosina desaminasa de unión a cinc putativos. La secuencia de ADNc de A3 del dominio doble de ovejas (*Ovis aries*, Oa) ortóloga se obtuvo usando una combinación de PCR degenerado y RACE de cebador 3' anidado. Todas estas tres proteínas A3 fueron similares en tamaño a la proteína HsA3F de 373 aminoácidos, excepto la proteína A3 de cerdo, que fue ligeramente más larga debido a una única extensión rica en serina, C-terminal. Las proteínas A3 de vaca, de oveja y de cerdo se denominan aquí como BtA3F (SEC ID NO: 8), OaA3F (SEC ID NO: 9) y SsA3F (SEC ID NO: 10), respectivamente. En la FIG. 13 se muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de BtA3F, OaA3F, y SsA3F.

Los alineamientos de aminoácidos de los dominios de desaminasas activos (más cinco restos en cada lado) se realizaron usando el software Clustal W (Higgins et al. 1994, Methods Mol Biol. 25:307-18). Los sitios activos de A3 de vaca y de oveja fueron 78% idénticos. Tanto las proteínas de vaca como las de oveja compartieron un menor nivel de identidad con la proteína de cerdo (56%). Los sitios activos de estas proteínas A3 de artiodáctilos fueron 56-62% idénticos a HsA3F (FIG. 14).

Para ensayar si las proteínas A3F de artiodáctilos tienen la capacidad para desaminar citosinas con ADN monocatenario, se monitorizó la actividad del mutante intrínseco de estas proteínas usando un ensayo de mutación a base de *E. coli*. La resistencia a rifampicina (Rif^R) es atribuible a mutaciones de sustituciones de bases en el gen de ARN polimerasa B (*rpoB*) de *E. coli*, y se produce en aproximadamente una de cada cinco millones de células bacterianas. Por lo tanto, este ensayo proporciona una medida robusta de la actividad intrínseca de la ADN citosina desaminasa. Véanse, por ejemplo, Haché et al. (2005) *J Biol Chem*, 280, 10920-10924; Harris et al. (2002) *Molecular Cell*, 10, 1247-1253. La expresión de cada una de las proteínas A3 de artiodáctilos aumentó la frecuencia de mutación Rif^R en *E. coli* de 3 a 7 veces, niveles que fueron mayores que aquellos atribuibles a HsA3F, pero ligeramente menores que aquellos causados por HsA3G. La expresión de BtA3F y SsA3F disparó un incremento semejante a HsAID en la frecuencia de mutación de Rif^R.

Se examinaron las preferencias de desaminación de citosina de ADN de A3F de artiodáctilos secuenciando el gen *rpoB* de al menos 100 mutantes Rif^R independientes. En contraste con HsA3F y HsA3G, que desaminan preferentemente citosinas en las posiciones nucleotídicas de *rpoB* 1721 y 1691, 5'-TC y 5'-CC, respectivamente, las proteínas A3F de artiodáctilos mostraron espectros de mutación de *rpoB* menos sesgados. OaA3F desaminó preferentemente citosina 1576, que es parte de un dinucleótido 5'-GC. SsA3F también prefirió citosina 1576. Sin embargo, SsA3F también desaminó claramente citosina 1586, que es parte de un dinucleótido 5'-AC. La principal conclusión de los ensayos de mutación de Rif^R fue que las tres proteínas A3F de artiodáctilos fueron capaces de desaminar citosinas de ADN y disparar un desplazamiento correspondiente en el patrón de las mutaciones de transición C/G → T/A en el sustrato de mutación *rpoB*. Puesto que las preferencias de desaminación de citosina de ADN intrínsecas de HsA3F y HsA3G son manifiestas en los retrovirus como HIV-1, estos datos sugieren que los sustratos dinucleotídicos fisiológicos de OaA3F y SsA3F serán 5'-GC, y 5'-RC, respectivamente (R = A o G).

Como etapa inicial hacia la comprensión de las dianas de retroelementos potenciales de las proteínas A3F de artiodáctilos, se determinó la distribución subcelular de estas proteínas mediante microscopía de fluorescencia de hepatocitos. Se sembraron aproximadamente 7.500 células HeLa en cubrevidrios en cámara LabTek (Nunc). Después de 24 h de incubación, las células se transfectoron con 200 ng de los constructos de ADN a base de pEGFP-A3. Después de 24 h adicionales de incubación, se recogieron imágenes de los hepatocitos usando un microscopio Zeiss Axiovert 200 a un aumento total de 400x. En contraste con HsA3B y un control de eGFP, que se localizaron en el núcleo y en toda la célula, respectivamente, las proteínas A3F de artiodáctilos y MmA3 (ratón) fueron predominantemente citoplásmicas, con cuerpos puntuados manifiestos en algunas células. Este patrón de localización es idéntico al observado para HsA3F y HsA3G, indicando que las proteínas A3F de artiodáctilos pueden funcionar de forma similar para inhibir la replicación de retrovirus dependientes de LTR, tales como HIV o MLV.

EJEMPLO 10

Restricción de retrovirus por proteínas A3F de artiodáctilos

Se ensayó si las proteínas A3F de artiodáctilos podrían inhibir la infecciosidad de retrovirus a base de HIV y de MLV. En estos sistemas, un gen de GFP embebido en ADN proviral proporciona una medida tanto de la eficiencia de la transfección (que se correlaciona directamente con los niveles de producción de virus) como de la infecciosidad vírica. Se hicieron crecer células 293T en medio de Eagle modificado de Dulbecco (Invitrogen) que contiene 10% de suero fetal bovino (Gemini Bioproducts), penicilina, y estreptomina (Invitrogen). HIV-GFP [también denominado CS-CG] se produjo mediante transfección mediada por FuGENE® 6 (Roche Applied Sciences) de células 293T con una confluencia de 50-70% con una mezcla plasmídica que contiene 0,22 µg de CS-CG, 0,14 µg de pRK5/Pack1 (Gag-Pol), 0,07 µg de pRK5/Rev, 0,07 µg de pMDG (VSV-G Env), y 0,5 µg de plásmido de expresión de APOBEC o plásmido de control de vector vacío como se describe previamente (Liddament et al. (2004) *Curr Biol* 14:1385-1391). Después de un período de incubación de 48 h, los sobrenadantes que contienen el virus se aclararon mediante centrifugación a baja velocidad, se filtraron (0,45 µm), y se cuantificaron usando un ELISA basado en actividad de transcriptasa inversa (Cavidi Tech). Los sobrenadantes normalizados a la transcriptasa inversa se aplicaron a células 293T recientes, y se permitió que transcurriera la infección durante 96 h. Entonces se midió la infecciosidad (fluorescencia de GFP) mediante citometría de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences). Para experimentos que requieren la recuperación de ADN retroviral para análisis de hipermutación, los sobrenadantes víricos se trataron con 50 unidades/ml de ADNasa (Sigma) antes de la infección de las células 293T.

La expresión de HsA3F y HsA3G provocó reducciones de 4 y 24 veces en la infecciosidad de HIV-GFP. MmA3 también fue capaz de inhibir fuertemente HIV-GFP. En comparación, la expresión de BtA3F, OaA3F o SsA3F provocó reducciones de 30, 8 y 29 veces en la infecciosidad de HIV-GFP, respectivamente (FIG. 15A). Estas actividades anti-HIV potentes demostraron que las proteínas A3F de artiodáctilos tienen al menos una actividad de restricción de retrovirus. Estos resultados implican además, que las proteínas A3F de artiodáctilos son capaces de asociarse específicamente con el complejo HIV Gag/ARN genómico y ganar de ese modo acceso al ensamblamiento de partículas víricas.

La infecciosidad de HIV-GFP también se monitorizó en presencia o ausencia de HIV-1 Vif y de proteínas A3 humanas, de artiodáctilos o de ratón. La expresión de HIV-1 Vif neutralizó HsA3G y HsA3F (aunque esta última en menor grado) y provocó una recuperación proporcional de infecciosidad de HIV-GFP. La expresión de HIV-1 Vif hizo

poco por potenciar la infecciosidad de HIV-GFP producido en presencia de MmA3 o de cualquiera de las proteínas A3F de artiodáctilos. De este modo, las proteínas A3F de artiodáctilos fueron completamente resistentes a HIV-1 Vif.

La expresión de MmA3 tiene poco efecto sobre la infecciosidad de MLV, presumiblemente debido a que MLV excluye (o simplemente evita) esta proteína A3 (FIG. 15B). Por el contrario, HsA3F y HsA3G inhiben la infecciosidad de retrovirus basados en MLV, pero en menor grado que los virus basados en HIV (FIG. 15B). Por lo tanto, para comenzar a preguntarse si las proteínas A3F de artiodáctilos poseen potenciales de restricción de retrovirus amplio de tipo HsA3F o HsA3G, o estrecho de tipo MmA3, se monitorizó la infecciosidad de MLV-GFP producido en presencia de estas proteínas A3. De forma interesante, muy semejante a las proteínas HsA3F y HsA3G, la expresión de las proteínas A3F de artiodáctilos redujo la infecciosidad de MLV-GFP en 2 a 4 veces (FIG. 15B). De este modo, los datos de infecciosidad de HIV-GFP y de GFP-MLV combinados sugieren que las proteínas A3F de artiodáctilos tienen un potencial de restricción de retrovirus relativamente amplio.

EJEMPLO 11

El dominio de desaminasa de unión a cinc N-terminal de las proteínas A3F de artiodáctilos cataliza la desaminación $C \rightarrow U$

Para resolver el mecanismo de restricción de retrovirus por proteínas A3F de artiodáctilos y para ensayar si el dominio de unión a cinc N- o C-terminal (o ambos) de estas proteínas cataliza la desaminación de citosina del ADN, se cambió el glutamato (E) conservado de cada sitio activo por glutamina (Q) usando mutagénesis dirigida al sitio, y los mutantes resultantes se ensayaron en busca de la actividad de restricción de HIV-GFP.

Como se dio a conocer previamente, el glutamato del dominio de unión a cinc tanto N- como C-terminal de HsA3G contribuye a inhibir la infecciosidad del HIV, pero el glutamato catalítico C-terminal parece más importante. Los mutantes $E \rightarrow Q$ del dominio de unión a cinc de BtA3F tanto N- como C-terminal parecen retener niveles completos de actividad anti-HIV. Por el contrario, los mutantes $E \rightarrow Q$ del dominio de unión a cinc de OaA3F y SsA3F N-terminal fueron menos capaces que los mutantes del dominio C-terminal correspondientes a la hora de inhibir la infecciosidad de HIV-GFP. Este resultado fue particularmente claro para SsA3F. Estos datos fueron esencialmente el inverso de los estudios del mutante $E \rightarrow Q$ de HsA3F y HsA3G, y por lo tanto sugieren que el dominio de unión a cinc N-terminal de estas proteínas cataliza la desaminación $C \rightarrow U$ de ADNc retrovívico. MmA3 fue claramente distinto, ya que tanto el glutamato del dominio de unión a cinc N-terminal como el C-terminal fueron necesarios para la restricción de HIV-GFP.

Aunque ambos mutantes $E \rightarrow Q$ del dominio N- y C-terminal de las proteínas A3 humanas y de artiodáctilos todavía mostraron niveles significativos de actividad antirretroviral, se supuso que los mutantes del sitio catalíticos fiables deberían ser incapaces de catalizar la desaminación $C \rightarrow U$ de ADNc retrovívico [aunque todavía pueden inhibir la infecciosidad retrovívica]. Los uracilos de la hebra menos moldean la incorporación de adeninas de hebra más, manifestándose finalmente como hipermutaciones $G \rightarrow A$ de hebra más retrovívicas. Por lo tanto, para ensayar directamente qué dominio o dominios de unión a cinc catalizan la desaminación de citosina del ADN, y para ganar una comprensión adicional en el mecanismo de restricción de retrovirus por A3F de artiodáctilos, se amplificó mediante PCR de alta fidelidad el gen *GFP* procedente de experimentos de infecciosidad de HIV-GFP mencionados anteriormente, se clonó y se sometió a análisis de secuencia de ADN. HIV-GFP producido en presencia de un vector de control mostró una frecuencia baja de mutación de sustitución de bases, 0,00014 mutaciones por base, lo que es atribuible a errores en la transcripción inversa y en la PCR. Por el contrario, los virus producidos en presencia de HsA3F, HsA3G, las tres proteínas A3F de artiodáctilos o MmA3, mostraron entre 30 y 80 veces más mutaciones de sustituciones de bases, que fueron casi exclusivamente mutaciones de la transición $G \rightarrow A$ retrovívicas. HsA3G con una mutación $E \rightarrow Q$ del dominio C-terminal fracasó a la hora de provocar hipermutación retrovívica, aunque esta variante todavía inhibió significativamente la infecciosidad de HIV-GFP. El mutante del dominio de unión a cinc C-terminal de HsA3F todavía fue capaz de inhibir de forma modesta la infecciosidad de HIV-GFP, sin signos obvios de hipermutación retrovívica.

Las sustituciones $E \rightarrow Q$ en el dominio N-terminal (pero no en el C-terminal) de las tres proteínas A3F de artiodáctilos abolió la acumulación de hipermutaciones retrovívicas. De este modo, estos datos combinados demuestran que el dominio de desaminasa de unión a cinc N-terminal de las proteínas A3F de artiodáctilos es catalítico, y que se necesitan ambas actividades, dependientes e independientes de desaminasa, para los niveles completos de restricción de retrovirus.

EJEMPLO 12

Propiedades de hipermutación retrovívica de proteínas A3F de artiodáctilos

Como se describe anteriormente, los espectros de mutación de *rpoB* de BtA3F, OaA3F y SsA3F sugirieron que estas proteínas dispararían patrones de hipermutación retrovívica desplazadas hacia 5'-YC, 5'-GC, y 5'-RC, respectivamente (R = A o G). Para ensayar esta predicción, se examinaron los tipos de mutaciones de sustituciones

de bases y las preferencias de desaminación de ADNc retrovívico locales atribuibles a la expresión de las proteínas A3F de artiodáctilos. En términos de las preferencias de mutaciones dinucleotídicas, la base inmediatamente en 5' de la citosina seleccionada es un determinante del sitio diana crucial. HsA3F y HsA3G prefieren abrumadoramente 5'-CC (84%) y 5'-TC (84%), respectivamente, mientras que MmA3 prefirió 5'-TC (61%) y 5'-CC (29%). Al igual que A3 de ratón, las proteínas A3F de vaca y de oveja parecen preferir una pirimidina (Y) 5' de la citosina desaminada (93% y 79%, respectivamente). Sin embargo, casi en paralelo con los datos de mutación de *rpoB* de *E. coli*, la proteína A3F de cerdo prefirió 5'-GC (47%). Esto es notable debido a que constituye el único ejemplo de una proteína A3 que prefiere 5'-purina-C (la desaminasa del gen de inmunoglobulina AID también tiene esta preferencia). Además, todas las proteínas A3 caracterizadas en estos análisis prefirieron una pirimidina en la posición -2 (que fue invariablemente una T, excepto para HsA3G, que prefirió C > T).

EJEMPLO 13

Cerdos manipulados que expresan APOBEC3F y/o APOBEC3G

Se transfectaron fibroblastos de piel de cerdo de 9 años con constructos de expresión que codifican APOBEC3F humana, APOBEC3G humana, o ambas, y se colocaron bajo selección de G418. Se recogieron colonias resistentes y se expandieron. Las colonias que expresan APOBEC3F, APOBEC3G, o ambas, se identificaron mediante RT-PCR.

Enucleación y transferencia de células donantes. Se recuperaron quirúrgicamente óvulos maduros *in vivo* a partir de animales donantes entre 46 y 50 horas tras la administración de HCG. Inmediatamente antes de la enucleación, las células expandidas del cúmulo y de la corona se retiraron de ambos tipos de óvulos mediante disección roma y se repitió pipeteando los óvulos en medio North Carolina State University 23 (NCSU-23, Petters y Wells (1993) J Reprod Fertil Supl. 48:61-73) tamponado con HEPES suplementado con 0,1% de hialuronidasa. Los grupos de óvulos se transfirieron a gotitas de 5 μ l de NCSU-23 tamponado con HEPES que contiene 10% de suero fetal de ternera, 2,5 μ g/ml de citocalasina B (CB) y 5 μ g/ml de Hoechst 33343, que se dispusieron en una columna en la tapa de una cápsula de Petri de 9 mm x 50 mm. La enucleación se logró eliminando físicamente el cuerpo polar y el citoplasma adyacente, que contiene la placa de metafase II, usando una pipeta de transferencia celular ES. La transferencia de células completas se logró usando una pipeta de transferencia de células ES (Eppendorf, Westbury, Nueva York) con una punta biselada puntiaguda (diámetro interno 10-25 μ m dependiendo del tipo celular).

Se sincronizaron células donantes (es decir, fibroblastos de piel transfectados) en G0/G1 probable mediante falta de suero (0,5%) durante 24 h. Se rociaron microgotas que contienen oocitos con un volumen igual de células donantes que se habían tripsinizado no más de 3 h antes de la enucleación. Los apareados se fusionaron en 2 h después de la enucleación. Se alinearon manualmente grupos de 5 a 10 apareados entre los electrodos de una cámara de fusión de 1 mm de salto (BTX, San Diego, CA, USA) a los que se les colocó encima medio de fusión de manitol (0,28 M de manitol, 0,2 mM de $MgSO_4 \times 7H_2O$, 0,01% de PVA). Los apareados se fusionaron mediante exposición a un único pulso de 150 V/mm para 60 μ s. Tras la fusión, los apareados se cultivaron en NCSU tamponado con HEPES + 10% de suero fetal de ternera, de 0,5 a 1,5 h antes de la activación. Los apareados se activaron colocándolos en una cámara de fusión de 1 mm de salto a los que se les colocó encima medio de manitol suplementado con 0,1 mM de $CaCl_2 \times 2H_2O$ y se expusieron a dos pulsos de 60 microsegundos de 150 V/mm.

Cultivo *in vitro* de embriones clonados. Tras los tratamientos de activación, los embriones clonados reconstruidos se lavaron a conciencia y se cultivaron en gotas de 50 μ l de NCSU23 suplementado con 1% de aminoácido no esencial MEM, 2% de aminoácidos BME y 0,4 mg/ml de BSA durante 5 días a 38,5°C en 5% de CO_2 en aire sin cambio de medio. Tras 120 h en cultivo, se añadió suero fetal de ternera (10%) a todas las microgotas que contienen embriones reconstruidos. Las velocidades de desarrollo se examinaron diariamente en busca de la escisión *in vitro* tras la activación, y los embriones escindidos en las etapas celulares 2-4 se seleccionaron para la transferencia.

Superovulación y transferencia de embriones. Se sincronizaron lechonas cruzadas púberes de 8 a 10 meses con Regumate (que contiene 0,4% de altrenogest; 10 mg/día; Intervet, Boxmeer, Países Bajos) mezclado en pienso comercial y dado cada mañana durante 17-19 días. A todas las lechonas donantes se les inyectó 2.000 UI de PMSG (Folligon y Chorulon) y, 80 h más tarde, 1.000 UI de hCG (Folligon y Chorulon). A las lechonas receptoras se les inyectó con la mitad de la dosis de PMSG y hCG administradas a las donantes. Los oocitos se recogieron quirúrgicamente 46-50 h tras la inyección de hCG, inundando el oviducto con NCSU-23 tamponado con HEPES.

Para producir cerdos clonados, los embriones reconstruidos se transfirieron quirúrgicamente al oviducto de cada madre adoptiva sincronizada 20-24 h después de la activación. Los embriones de transferencia nuclear (N = 385) se transfirieron a tres receptoras 2302, 5570 y 2175 en el día 1. Una semana más tarde, un grupo adicional de embriones reconstruidos (N = 360) se transfirió a tres receptoras adicionales, 2306, 5638 y 2211. Se usó un escáner de ultrasonidos (Aloka SSD-500, JAPÓN) con una sonda transabdominal de 3,5 MHz adjunta para comprobar los embarazos a 25 y 35 días después de la transferencia de los embriones; cinco de 6 receptoras poseían al menos 1 feto en ese momento (83%). Se obtuvieron cinco cerdas preñadas. Las receptoras preñadas se volvieron a examinar nuevamente mediante ultrasonidos a aproximadamente 30 días antes de la fecha esperada de parto. La receptora

2211 no estaba preñada y mostró celo aproximadamente 1 mes después del trasplante, dando una tasa de embarazo global de 67%.

Una semana antes de la fecha del parto proyectado, todas las lechonas se movieron a cajones de parto. A las lechonas 2302, 5570 y 2175 se les dio 2 ml de PGF_{2α} en el día 113, 112 y 111 de gestación, y 2 ml de oxitocina 24 h más tarde. En el día 118 tras la transferencia de los embriones, se retiró manualmente un clon masculino de 700 g de la receptora 5570. En el mismo día, la receptora 2175 expulsó una momia degenerada. La receptora que queda, 2302, que había mostrado una bajada sustancial de leche tras su inyección de oxitocina, se retiró del cajón y se le administró una inyección de 15 ml de lidocaína en un disco vertebral entre un conjunto de vértebras lumbares inferiores. Después de esperar 20 minutos para que la anestesia tuviera efecto, se realizó una incisión en el flanco elevado y se expusieron ambas trompas del útero. Ninguna trompa contenía ningún feto o ninguna momia. Sin embargo, el endometrio en ambas trompas mostró hiperplasia cística extensa, que dio al útero el aspecto de estar preñado. A la receptora 2302 se le administró entonces una anestesia general (acepromazina + ketamina) y se eutanasió. La receptora 2175 también se anestesió y se eutanasió, y su útero se examinó para buscar la presencia de momias o fetos adicionales; no se encontró ninguno.

En el día 112 de gestación, la receptora 5638 recibió 2 ml de PGF_{2α}. Se administró oxitocina (2 ml) a 6 AM al día siguiente. A 7:20 AM, se retiró manualmente el primero de los cinco clones masculinos de la receptora. Hacia las 11:00 AM, se habían parido un total de 5 clones masculinos. De este modo, se generaron 6 clones transgénicos vivos de un total de 6 receptoras.

Todos los clones mostraron artrogriposis moderada a grave en las patas posteriores, lo que redujo enormemente su movilidad. El clon 1 (700 g) se retiró manualmente de la receptora 5570, pero fue incapaz de mamar, de manera que se fotografió y se eutanasió al día siguiente. Los clones 2 (1000 g) y 3 (700 g) murieron a las pocas horas de nacer. El clon 4 (700 g) que tuvo un caso bastante grave de artrogriposis, murió más tarde en el mismo día. Los clones 5 (1200 g) y 6 (1200 g) se alimentaron manualmente cada hora, vía una jeringuilla y una aguja de alimentación de ratón, con Esbilac (fórmula de sustitución de leche). La salud del clon 6 mejoró visiblemente durante este período de lactancia, mientras que la salud del clon 5 disminuyó. El clon 5 estaba extremadamente débil y ya no tragaba Esbilac y se eutanasió al día siguiente. El clon 6 fue devuelto a su madre y fue viable durante 2 semanas, pero tuvo abscesos importantes en las partes superiores de sus patas posteriores y tenía hinchadas sus cuartillas frontales. Las inyecciones diarias de Tylan 200 y de penicilina no resolvieron este problema, de manera que se eutanasió al cerdito y se recogieron las células.

La reprogramación epigenética puede ser deficiente en embriones clonados. Los núcleos se pueden programar más eficazmente haciéndolos pasar a través de múltiples rondas de clonación y aislamiento de fibroblastos fetales antes de llevar a los lechones hasta su término. Las células transgénicas ya producidas se pueden usar para generar embriones reconstruidos, que entonces se implantarían y se dejarían desarrollar durante alrededor de 40 días antes de la terminación del parto. Los fibroblastos se aislarían entonces a partir de estos fetos y se cultivarían brevemente antes del uso en otra ronda de transferencia nuclear de células somáticas para generar nuevos lechones. Otra alternativa descansaría en el uso de fibroblastos fetales para comenzar, es decir, usar fibroblastos fetales para generar nuevas células transgénicas que expresan las proteínas APOBEC, y después generar cerdos mediante transferencia nuclear de células somáticas como se describe anteriormente. Los experimentos de clonación de cerdos más exitosos han utilizado células derivadas de fibroblastos fetales, en oposición al berraco de más edad usado en este ejemplo. También se pueden usar otras fuentes de células, incluyendo células madre embrionarias o adultas.

OTRAS REALIZACIONES

Aunque la invención se ha descrito conjuntamente con la descripción detallada anterior y los ejemplos, la descripción anterior y los ejemplos están destinados a ilustrar y no a limitar el alcance de la invención, que se define mediante el alcance de las reivindicaciones anejas.

Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Harris, Reuben S. Jonsson, Stefan R. Fahrenkrug, Scott C. St. Claire LaRue, Rebecca

<120> USANDO CITOSINA DESAMINASAS PARA DISMINUIR LA TRANSFERENCIA DE RETROELEMENTOS DESDE CERDOS A SERES HUMANOS

<130> 09531/237001

<140> 11/472,743

<141> 2006-06-22

<150> 60/694,054

ES 2 459 640 T3

<151> 2005-06-24

<160> 20

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

5 <211> 1488

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintético

10 <400> 1

```

aagaaaccaa ttattaaagg cttacttact gatagtagat caacgatcag tataattaag 60
tctacaaatg aagagaaatt tagaaacaga ttttttggca caaaggcaat gagacttaga 120
gatgaagtat caggtaataa tttatacgtg tactacatcg agaccaagaa gaacattgct 180
gatgtgatga caaaacctct tccgataaaa acatttaaac tattaactaa caaatggatt 240
cattagatcg cgcgcggatc cgccgattca ttaatgcagc tggcacgaca ggtttcccgga 300
ctggaaagcg ggcagtgagc gcaacgcaat taatgtgagt tagctcactc attaggcacc 360
ccaggcttta cactttatgc ttccggctcg tatgttggtg ggaattgtga gcggataaca 420
atttcacaca ggaaacagct atgaccatga ttacgccaaag cttgcatgcc tgcaggtcga 480
ctctagagga tccccgggta ccggtagaaa aatgagtaa aggagaagaa cttttcactg 540
gagttgtccc aattcttggt gaattagatg gtgatgttaa tgggcacaaa ttttctgtca 600
gtggagaggg tgaaggtgat gcaacatacg gaaaacttac ccttaaattt atttgcacta 660
ctggaaaact acctgttcca tggccaacac ttgtcactac tttctcttat ggtgttcaat 720
gcttttcccg ttatccggat catatgaaac ggcatgactt tttcaagagt gccatgcccg 780
aaggttatgt acaggaacgc actatatctt tcaaagatga cgggaactac aagacgcgtg 840
ctgaagtcaa gtttgaaggt gatacccttg ttaatcgtat cgagttaaaa ggtattgatt 900
ttaaagaaga tggaaacatt ctccgacaca aactcgagta caactataac tcacacaatg 960
tatacatcac ggcagacaaa caaagaatg gaatcaaagc taacttcaaa attcgccaca 1020
acattgaaga tggatccggt caactagcag accattatca acaaaatact ccaattggcg 1080
atggccctgt ccttttacca gacaaccatt acctgtcgac acaatctgcc ctttcgaaag 1140
atcccaacga aaagcgtgac cacatggtcc ttcttgagtt tgtaactgct gctgggatta 1200
cacatggcat ggatgagctc tacaataat gaattccaac tgagcgcggy tgcctaccat 1260
taccaacttg tctggtgtca aaaataatag gcctactagt cggcgcgcyg atccatctgc 1320
agctttaaat aatcgggtgc actacataag aacaccttg gtggaggaa catcgttggt 1380
accattgggc gaggtggctt ctcttatggc aaccgcaaga gccttgaacg cactctcact 1440

```

```

acggtgatga tcattcttgc ctccgacaga atcaacgtgg aggtaat 1488

```

<210>2

<211> 18

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 2

cctgagtggy agttgta 18

20 <210>3

<211>21

<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
5 <400> 3
tatgatacat gctctggcca a 21
<210>4
<211> 18
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 4
ctgcgaggca agaatgat 18
15 <210>5
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
20 <223> Cebador
<400> 5
cgttatccgg atcatatga 19
<210>6
<211> 19
25 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 6
30 gtagttcccg tcacttga 19
<210>7
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
35 <220>
<223> Cebador
<400> 7

ES 2 459 640 T3

agatgggcac agtgtgggt 19

<210>8

<211> 385

<212> PRT

5 <213> *Bos taurus*

<400> 8

Met	Gln	Pro	Ala	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Ser	Gln	Met	Pro	Trp	Thr	Arg	Asp
1				5					10					15	
Ser	Ser	Glu	His	Met	Ala	Arg	Leu	Asp	Pro	Glu	Thr	Phe	Tyr	Phe	Gln
			20					25					30		
Phe	Cys	Asn	Leu	Leu	Tyr	Ala	Asn	Arg	Arg	Asn	Cys	Ser	Tyr	Ile	Cys
		35					40					45			
Tyr	Lys	Val	Glu	Arg	Arg	Lys	Tyr	His	Ser	Arg	Ala	Ser	Phe	Asp	Trp
	50					55					60				
Gly	Val	Phe	His	Asn	Gln	Val	Tyr	Gly	Gly	Thr	Arg	Cys	His	Thr	Glu
65				70						75					80
Leu	Arg	Phe	Leu	Ser	Trp	Phe	His	Ala	Glu	Lys	Leu	Arg	Pro	Asn	Glu
				85					90					95	
Arg	Tyr	His	Ile	Thr	Trp	Phe	Met	Ser	Trp	Ser	Pro	Cys	Met	Lys	Cys
			100					105						110	
Ala	Lys	Glu	Val	Ala	Asp	Phe	Leu	Gly	Arg	His	Gln	Asn	Val	Thr	Leu
		115					120					125			
Ser	Ile	Phe	Thr	Ser	Arg	Leu	Tyr	Lys	Phe	Gln	Glu	Glu	Gly	Ser	Arg
	130					135					140				
Gln	Gly	Leu	Leu	Arg	Leu	Ser	Asp	Gln	Gly	Ala	His	Val	Asp	Ile	Met
145					150					155					160
Ser	Tyr	Gln	Glu	Phe	Lys	Tyr	Cys	Trp	Lys	Lys	Phe	Val	Tyr	Ser	Gln
				165					170					175	
Arg	Arg	Pro	Phe	Arg	Pro	Trp	Lys	Lys	Leu	Asp	Arg	Asn	Tyr	Gln	Arg
			180					185						190	
Leu	Val	Glu	Glu	Leu	Glu	Asp	Ile	Leu	Gly	Asn	Thr	Met	Asn	Leu	Leu
		195					200					205			
Arg	Glu	Val	Leu	Phe	Lys	Gln	Gln	Phe	Gly	Asn	Gln	Pro	Arg	Val	Pro
	210					215						220			
Ala	Pro	Tyr	Tyr	Arg	Arg	Lys	Thr	Tyr	Leu	Cys	Tyr	Gln	Leu	Lys	Gln
225					230					235					240
Arg	Asn	Asp	Leu	Thr	Leu	Asp	Arg	Gly	Cys	Phe	Arg	Asn	Lys	Lys	Gln
				245					250					255	
Arg	His	Ala	Glu	Ile	Arg	Phe	Ile	Asp	Lys	Ile	Asn	Ser	Leu	Asp	Leu
			260					265						270	
Asn	Pro	Ser	Gln	Ser	Tyr	Lys	Ile	Ile	Cys	Tyr	Ile	Thr	Trp	Ser	Pro
		275					280						285		
Cys	Pro	Asn	Cys	Ala	Asn	Glu	Leu	Val	Asn	Phe	Ile	Thr	Arg	Asn	Asn
	290					295					300				
His	Leu	Lys	Leu	Glu	Ile	Phe	Ala	Ser	Arg	Leu	Tyr	Phe	His	Trp	Ile
305					310						315				320

ES 2 459 640 T3

Lys Ser Phe Lys Met Gly Leu Gln Asp Leu Gln Asn Ala Gly Ile Ser
 325 330 335
 Val Ala Val Met Thr His Thr Glu Phe Glu Asp Cys Trp Glu Gln Phe
 340 345 350
 Val Asp Asn Gln Ser Arg Pro Phe Gln Pro Trp Asp Lys Leu Glu Gln
 355 360 365
 Tyr Ser Ala Ser Ile Arg Arg Arg Leu Gln Arg Ile Leu Thr Ala Pro
 370 375 380
 Ile
 385

<210>9

<211> 373

<212> PRT

5 <213> *Ovis aries*

<400> 9

Met Pro Trp Ile Ser Asp His Val Ala Arg Leu Asp Pro Glu Thr Phe
 1 5 10 15
 Tyr Phe Gln Phe His Asn Leu Leu Tyr Ala Tyr Gly Arg Asn Cys Ser
 20 25 30
 Tyr Ile Cys Tyr Arg Val Lys Thr Trp Lys His Arg Ser Pro Val Ser
 35 40 45
 Phe Asp Trp Gly Val Phe His Asn Gln Val Tyr Ala Gly Thr His Cys
 50 55 60
 His Ser Glu Arg Arg Phe Leu Ser Trp Phe Cys Ala Lys Lys Leu Arg
 65 70 75 80
 Pro Asp Glu Cys Tyr His Ile Thr Trp Phe Met Ser Trp Ser Pro Cys
 85 90 95
 Met Lys Cys Ala Glu Leu Val Ala Gly Phe Leu Gly Met Tyr Gln Asn
 100 105 110
 Val Thr Leu Ser Ile Phe Thr Ala Arg Leu Tyr Tyr Phe Gln Lys Pro
 115 120 125
 Gln Tyr Arg Lys Gly Leu Leu Arg Leu Ser Asp Gln Gly Ala Cys Val
 130 135 140
 Asp Ile Met Ser Tyr Gln Glu Phe Lys Tyr Cys Trp Lys Lys Phe Val
 145 150 155 160
 Tyr Ser Gln Arg Arg Pro Phe Arg Pro Trp Lys Lys Leu Lys Arg Asn
 165 170 175
 Tyr Gln Leu Leu Ala Ala Glu Leu Glu Asp Ile Leu Gly Asn Thr Met
 180 185 190
 Asn Leu Leu Arg Glu Thr Leu Phe Lys Gln Gln Phe Gly Asn Gln Pro
 195 200 205
 Arg Val Pro Pro Pro Pro Tyr Tyr Arg Arg Lys Thr Tyr Leu Cys Tyr
 210 215 220
 Gln Leu Lys Glu Leu Asp Asp Leu Met Leu Asp Lys Gly Cys Phe Arg
 225 230 235 240
 Asn Lys Lys Gln Arg His Ala Glu Ile Arg Phe Ile Asp Lys Ile Asn
 245 250 255
 Ser Leu Asn Leu Asn Pro Ser Gln Ser Tyr Lys Ile Ile Cys Tyr Ile
 260 265 270
 Thr Trp Ser Pro Cys Pro Asn Cys Ala Ser Glu Leu Val Asp Phe Ile
 275 280 285
 Thr Arg Asn Asp His Leu Asn Leu Gln Ile Phe Ala Ser Arg Leu Tyr
 290 295 300
 Phe His Trp Ile Lys Pro Phe Cys Arg Gly Leu His Gln Leu Gln Lys

ES 2 459 640 T3

305 Ala Gly Ile Ser Val Ala Val Met Thr His Thr Glu Phe Glu Asp Cys
 325 330 335
 Trp Glu Gln Phe Val Asp Asn Gln Leu Arg Pro Phe Gln Pro Trp Asp
 340 345 350
 Lys Leu Glu Gln Tyr Ser Ala Ser Ile Arg Arg Arg Leu Gln Arg Ile
 355 360 365
 Leu Thr Ala Pro Thr
 370

<210> 10

<211> 416

<212> PRT

5 <213> *Sus scrofa*

<400> 10

Met Asp Pro Trp Arg Leu Arg Gln Trp Pro Gly Pro Gly Pro Ala Ser
 1 5 10 15
 Arg Gly Gly Tyr Gly Gln Arg Pro Arg Ile Arg Asn Pro Glu Glu Trp
 20 25 30
 Phe His Glu Leu Ser Pro Arg Thr Phe Ser Phe His Asn Leu Leu Tyr
 35 40 45
 Ala Tyr Gly Arg Asn Cys Ser Tyr Ile Cys Cys Gln Val Glu Gly Lys
 50 55 60
 Asn Cys Phe Phe Gln Gly Ile Phe Gln Asn Gln Val Pro Pro Asp Pro
 65 70 75 80
 Pro Cys His Ala Glu Leu Cys Phe Leu Ser Trp Phe Gln Ser Trp Gly
 85 90 95
 Leu Ser Pro Asp Glu His Tyr Tyr Val Thr Trp Phe Ile Ser Trp Ser
 100 105 110
 Pro Cys Cys Glu Cys Ala Ala Lys Val Ala Gln Phe Leu Glu Glu Asn
 115 120 125
 Arg Asn Val Ser Leu Ser Leu Ser Ala Ala Arg Leu Tyr Tyr Phe Trp
 130 135 140
 Lys Ser Glu Ser Arg Glu Gly Leu Arg Arg Leu Ser Asp Leu Gly Ala
 145 150 155 160
 Gln Val Gly Ile Met Ser Phe Gln Asp Phe Gln His Cys Trp Asn Asn
 165 170 175
 Phe Val His Asn Leu Gly Met Pro Phe Gln Pro Trp Lys Lys Leu His
 180 185 190
 Lys Asn Tyr Gln Arg Leu Val Thr Glu Leu Lys Gln Ile Leu Arg Asn
 195 200 205
 Thr Met Asn Leu Leu Lys Glu Asn Ile Phe Ile Gln Gln Phe Gly Asn
 210 215 220
 Gln Pro Arg Val Leu Ala Pro Tyr Tyr Leu Arg Lys Thr Tyr Leu Cys
 225 230 235 240
 Tyr Gln Val Lys Gly Pro Asp Asp Ser Ile Leu Asp Lys Gly Cys Phe
 245 250 255
 Gln Asn Lys Lys Lys Arg His Ala Glu Ile Arg Phe Ile Asp Lys Ile
 260 265 270
 Asn Ser Leu Asn Leu Asp Gln Asn Gln Cys Tyr Arg Ile Ile Cys Tyr
 275 280 285
 Val Thr Trp Ser Pro Cys His Asn Cys Ala Lys Glu Leu Val Asp Phe
 290 295 300
 Ile Ser Asn Arg His His Leu Ser Leu Gln Leu Phe Ala Ser Arg Leu
 305 310 315 320

ES 2 459 640 T3

Tyr Phe His Trp Val Arg Cys Tyr Gln Arg Gly Leu Gln Arg Leu Gln
 325 330 335
 Ala Lys Arg Val Ser Val Ala Val Met Lys Gly Pro Glu Phe Lys Asp
 340 345 350
 Cys Trp Glu Lys Phe Val Asp His Gln Gly Arg Ser Phe Pro Ser Trp
 355 360 365
 Glu Lys Leu Glu Gln Tyr Ser Glu Ser Ile Ser Arg Arg Leu Ser Arg
 370 375 380
 Ile Leu Arg Phe Ala Asn Gln Asn Asn Leu Glu Asp Ser Phe Arg Asp
 385 390 395 400
 Leu Arg Leu Gly Ser Pro Ser Pro Ser Ser Ser Arg Ser Asp Ser Arg
 405 410 415

<210> 11

<211> 45

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 11

Pro Glu Thr His Cys His Ala Glu Arg Cys Phe Leu Ser Trp Phe Cys
 1 5 10 15
 Asp Asp Ile Leu Ser Pro Asn Thr Asn Tyr Glu Val Thr Trp Tyr Thr
 20 25 30
 Ser Trp Ser Pro Cys Pro Glu Cys Ala Gly Glu Val Ala
 35 40 45

<210> 12

<211> 45

10 <212> PRT

<213> *Bos taurus*

<400> 12

Gly Gly Thr Arg Cys His Thr Glu Leu Arg Phe Leu Ser Trp Phe His
 1 5 10 15
 Ala Glu Lys Leu Arg Pro Asn Glu Arg Tyr His Ile Thr Trp Phe Met
 20 25 30
 Ser Trp Ser Pro Cys Met Lys Cys Ala Lys Glu Val Ala
 35 40 45

<210> 13

15 <211> 45

<212> PRT

<213> *Ovis aries*

<400> 13

Ala Gly Thr His Cys His Ser Glu Arg Arg Phe Lys Ser Trp Phe Cys
 1 5 10 15
 Ala Lys Lys Leu Arg Pro Asp Glu Cys Tyr His Ile Thr Trp Phe Met
 20 25 30
 Ser Trp Ser Pro Cys Met Lys Cys Ala Glu Leu Val Ala
 35 40 45

ES 2 459 640 T3

<210> 14

<211> 45

<212> PRT

<213> *Sus scrofa*

5 <400> 14

```
Pro Asp Pro Pro Cys His Ala Glu Leu Cys Phe Leu Ser Trp Phe Gln
 1      5      10      15
Ser Trp Gly Leu Ser Pro Asp Glu His Tyr Tyr Val Thr Trp Phe Ile
      20      25      30
Ser Trp Ser Pro Cys Cys Glu Cys Ala Ala Lys Val Ala
      35      40      45
```

<210> 15

<211>21

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 15

ttcatgtggg aactagaga t 21

15 <210> 16

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador

<400> 16

aacccttac ccttatgtg gat 23

<210> 17

<211> 23

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 17

30 aaagtcaatt tgcagcgtc ctt 23

<210> 18

<211> 20

<212> ADN

ES 2 459 640 T3

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
<400> 18
5 ggaacctgca acctatggaa 20
<210> 19
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
10 <220>
<223> Cebador
<400> 19
ggtgtggccc taaaagaca 20
<210> 20
15 <211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador
20 <400> 20
atcatgtttg agacctcaa 20

REIVINDICACIONES

1. Un cerdo transgénico, cuyas células nucleadas comprenden un constructo de ácido nucleico, comprendiendo dicho constructo de ácido nucleico una unidad transcripcional que comprende una región reguladora operablemente enlazada a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de citosina desaminasa no porcina, en el que la expresión de dicho polipéptido de citosina desaminasa no porcina en al menos algunas de las células del cerdo da como resultado, al cocultivarlas con células humanas, una menor capacidad de dichas células para transmitir retrovirus endógenos porcinos a las células humanas, en el que dicha citosina desaminasa no porcina se selecciona del grupo que consiste en APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3D, APOBEC3E, APOBEC3F, APOBEC3G, y APOBEC3H.
2. El cerdo transgénico de la reivindicación 1, en el que dicha región reguladora es un promotor constitutivo.
3. El cerdo transgénico de la reivindicación 1, en el que dicha región reguladora porcina es un promotor específico de un tejido o específico de un órgano.
4. El cerdo transgénico de la reivindicación 1, en el que un elemento aislante y una repetición invertida de un transposón flanquean cada lado de dicha unidad transcripcional.
5. El cerdo transgénico de la reivindicación 1, en el que dicha citosina desaminasa no porcina es APOBEC3F humana o APOBEC3G humana.
6. Células nucleadas aisladas derivadas del cerdo transgénico de la reivindicación 1 que comprenden un constructo de ácido nucleico, comprendiendo dicho constructo de ácido nucleico una unidad transcripcional que comprende una región reguladora enlazada operablemente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de citosina desaminasa no porcina, en el que dicha citosina desaminasa no porcina se selecciona del grupo que consiste en APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3D, APOBEC3E, APOBEC3F, APOBEC3G, y APOBEC3H.
7. Tejido aislado del cerdo transgénico de la reivindicación 1, cuyas células nucleadas comprenden un constructo de ácido nucleico, comprendiendo dicho constructo de ácido nucleico una unidad transcripcional que comprende una región reguladora enlazada operablemente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de citosina desaminasa no porcina, en el que dicha citosina desaminasa no porcina se selecciona del grupo que consiste en APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3D, APOBEC3E, APOBEC3F, APOBEC3G, y APOBEC3H.
8. Progenie de dicho cerdo transgénico de la reivindicación 1, cuyas células nucleadas comprenden un constructo de ácido nucleico, comprendiendo dicho constructo de ácido nucleico una unidad transcripcional que comprende una región reguladora enlazada operablemente a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de citosina desaminasa no porcina, en el que dicha citosina desaminasa no porcina se selecciona del grupo que consiste en APOBEC3B, APOBEC3C, APOBEC3D, APOBEC3E, APOBEC3F, APOBEC3G, y APOBEC3H.
9. Un método *in vitro* para disminuir la capacidad de células de cerdo de transmitir retrovirus endógenos porcinos a células humanas, que comprende cocultivar las células nucleadas aisladas de la reivindicación 6 con las células humanas.
10. Las células nucleadas aisladas de la reivindicación 6 o el tejido de la reivindicación 7, para uso en xenotransplante.

FIG 1

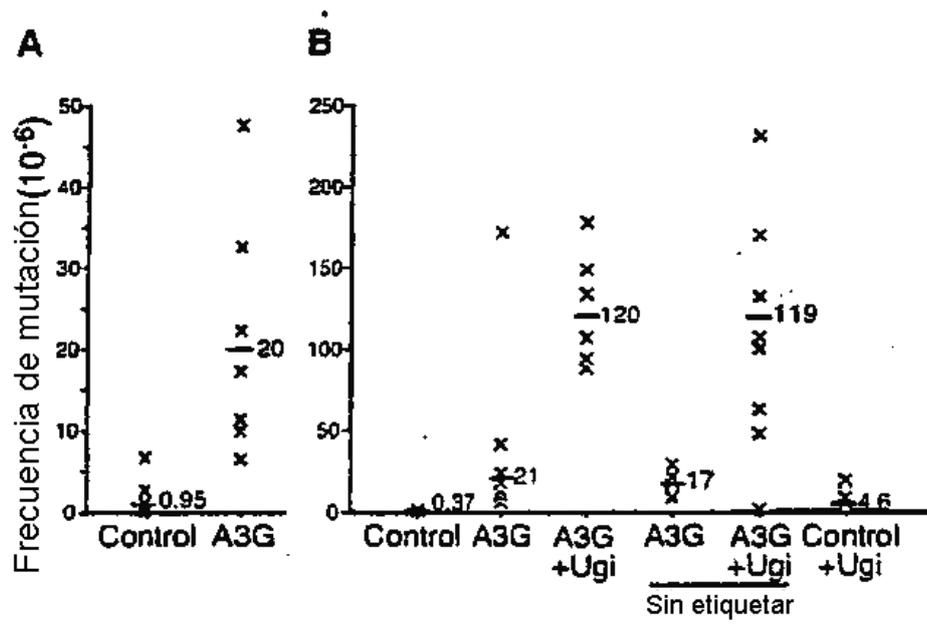


FIG 2

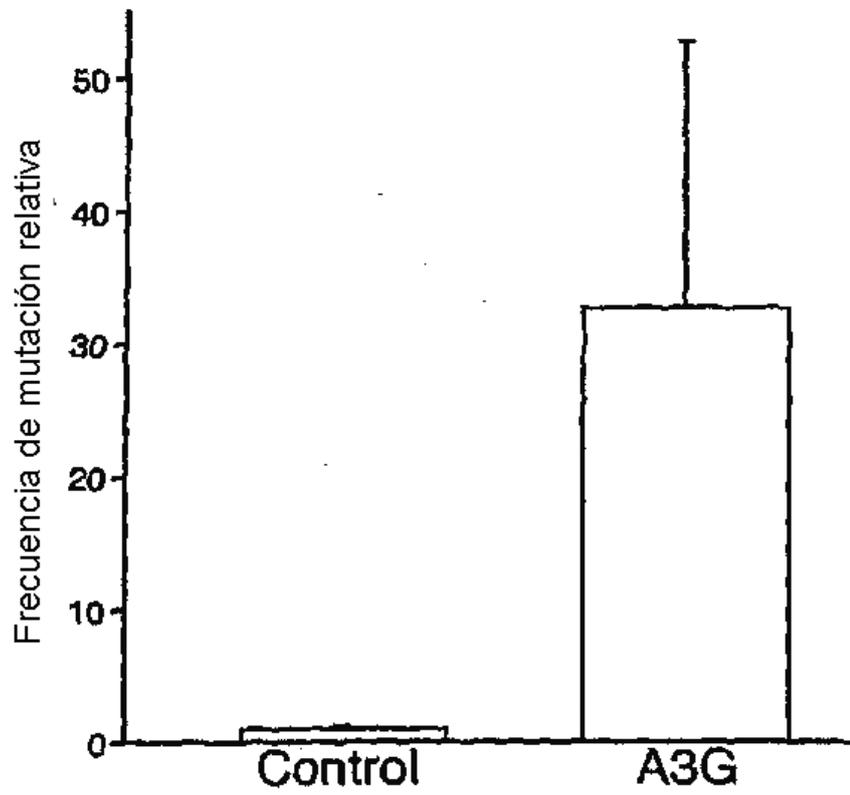


FIG 3

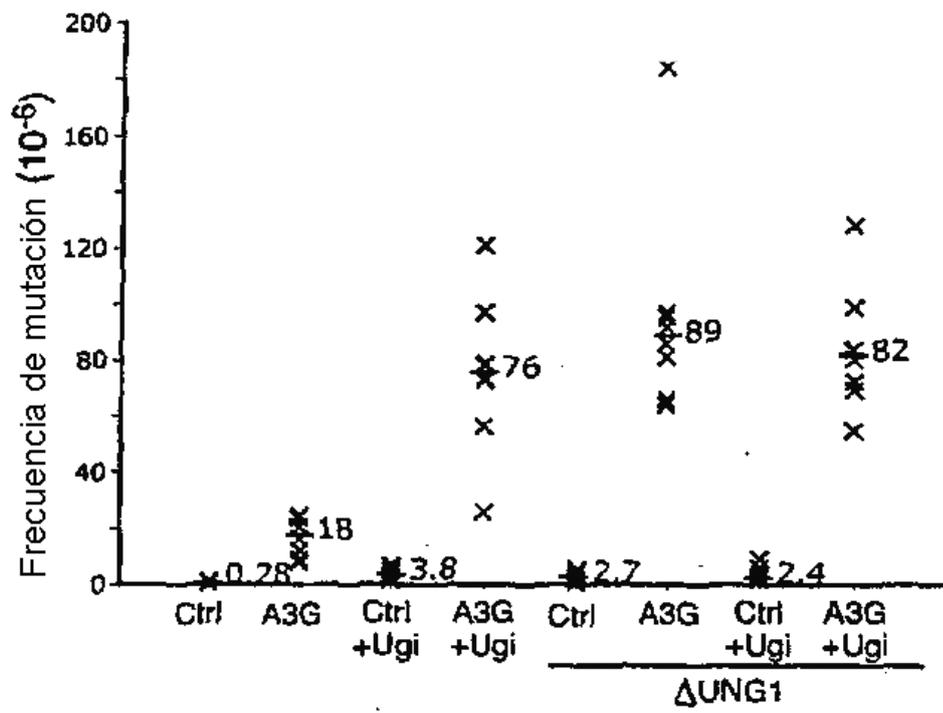


FIG 4

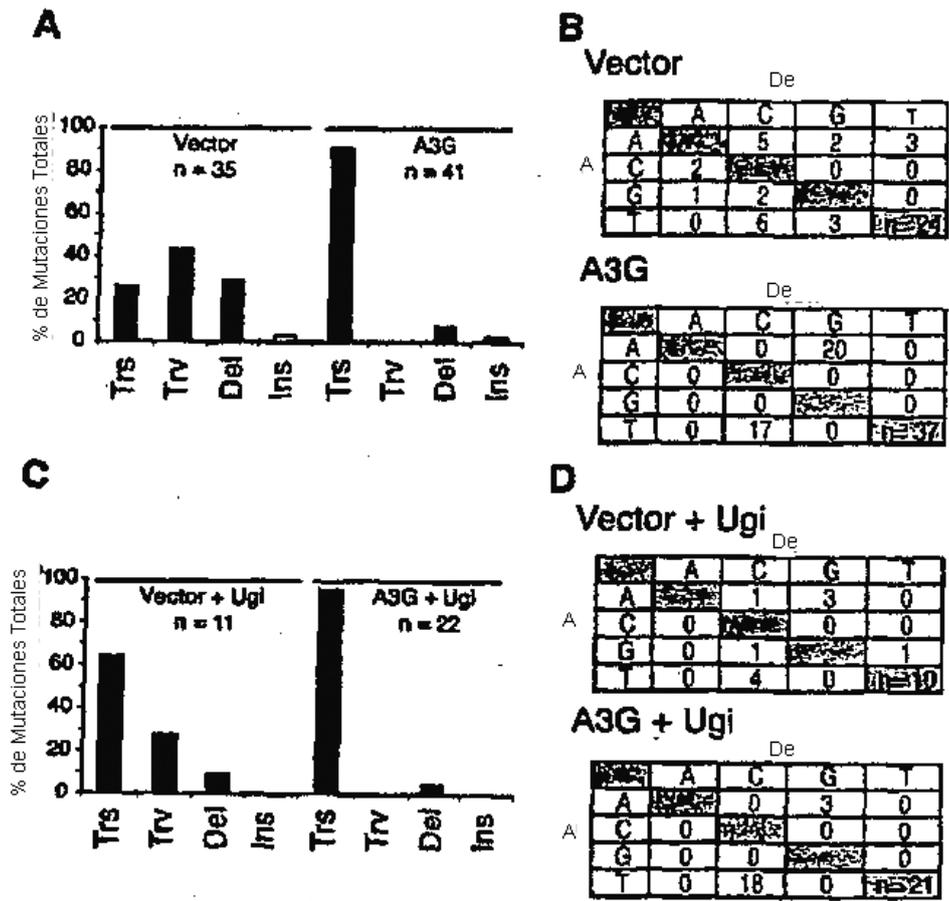


FIG 5

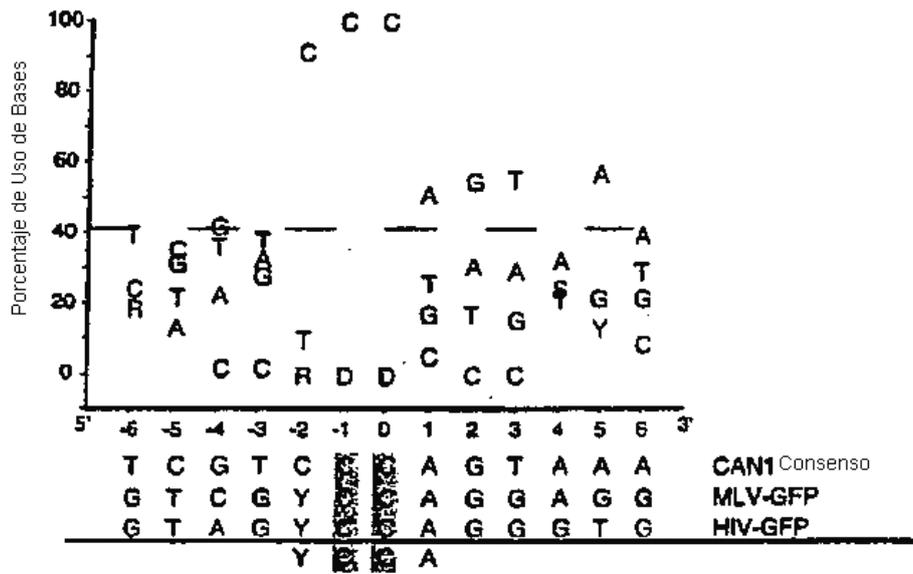


FIG 6

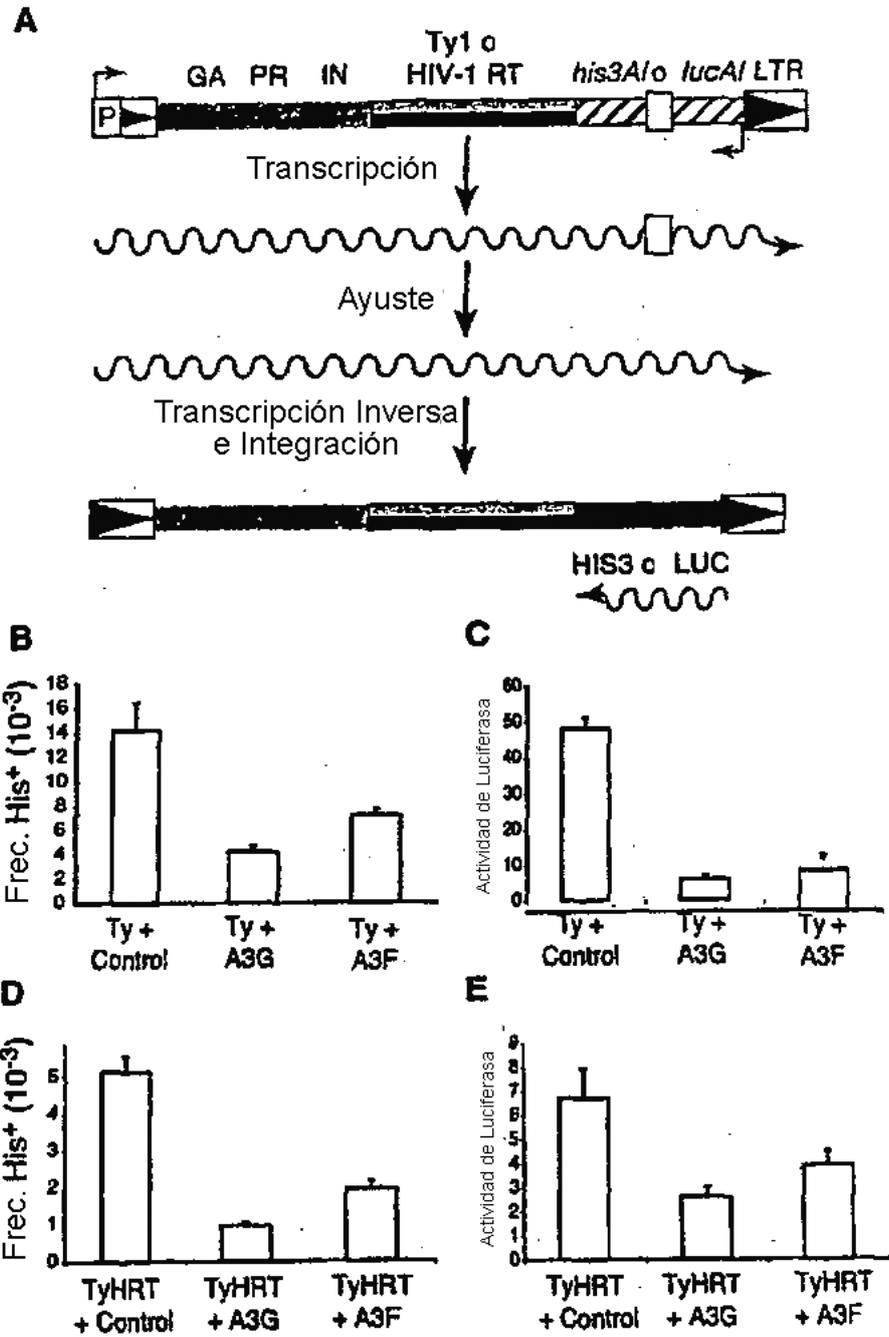


FIG 7

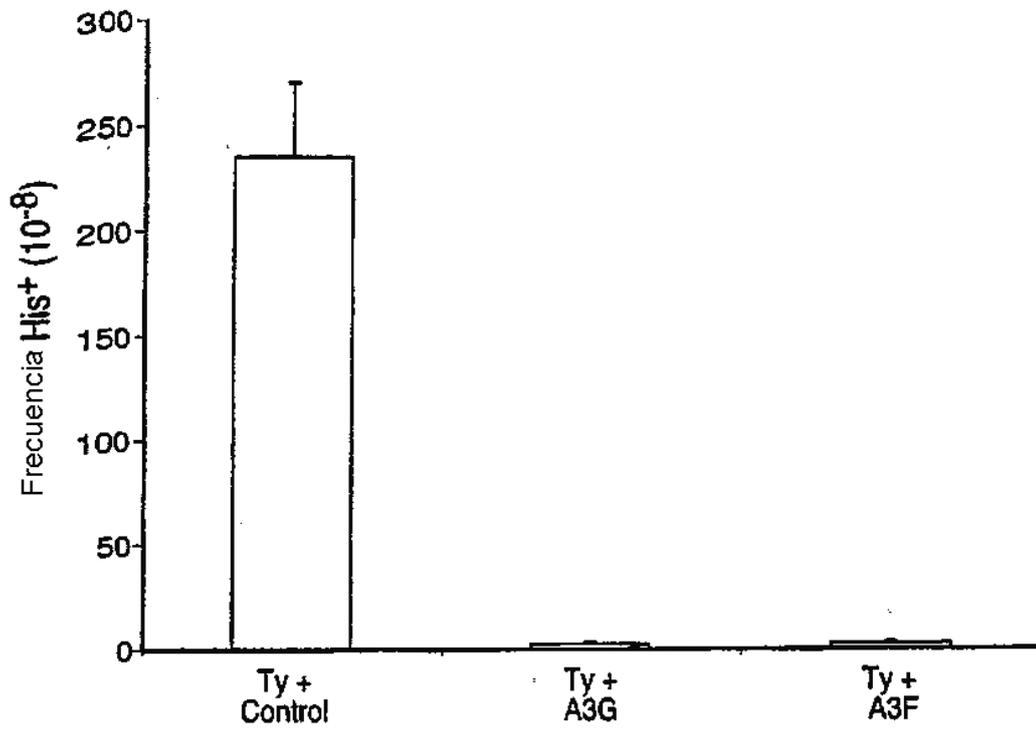
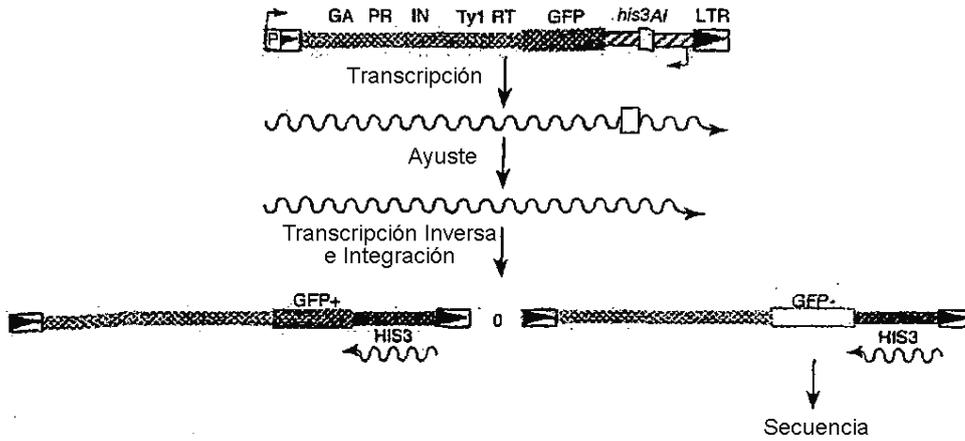


FIG 8

A



B

AAG AAA CCA ATT ATT AAA GGC TTA CTT ACT GAT AGT AGA TCA ACG ATC AGT ATA NTT AAG TCT ACA AAT GAA GAG AAA TTT AGA AAC AGA TTT 372
 TTT GGC ACA AAG GCA ATG AGA CTT AGA GAT GAA GTA TCA GGT AAT AAT TTA TAC GTA TAC TAC ATC GAG ACC AAG AAG AAC ATT GCT GAT GTG 469
 ATG ACA AAR OCT CTT CCG ATA AAA ACA TTT AAA CTA TTA ACT AAC AAA TGG ATT CAT TAG ATC GCG CGC GGA TCC GCC GAT TCA TTA ATG CAG 558
 CTG GCA GGA CAG GTT TCC CGA CTG GAA AGC GGG CAG TGA GCG CAA CCG AAT TAA TGT GAG TTA GCT CAC TCA TTA GGC ACC CCA GGC TTT ACA 651
 CTT TAT GCT TCC GGC TCG TAT GTT GTG TGG AAT TGT GAG CGG ATA ACA ATT TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA CCA TGA TTA CGC CAA GCT TGC 744
 ATG CCT GCA GGT CGA CTC TAG AGG ATC CCC GGG TAC CCG TAG AAA AAA TGA GTA AAG GAG AAG AAC TTT TCA CTG GAG TTG TCC CAA TTC TTG 837
 TTG AAT TAG ATG GTG ATG TTA ATG GGC ACA AAT TTT CTG TCA GTG GAG AGG GTG AAG GTG ATG CAA CAT ACG GAA AAC TTA CCC TTA AAT TTA 930
 TTT GCA CTA CTG GAA AAC TAC CTG TTC CAT GGC CAA CAC TTG TCA CTA CTT TCT CTT ATG GTG TTC AAT GCT TTT CCC GTT ATC CGG ATC ATA 1023
 TGA AAC GGC ATG ACT TTT TCA AGA GTG CCA TGC CCG AAG GGT ATG TAC AGG AAC GCA CTA TAT CTT TCA AAG ATG ACC GGA ACT ACA AGA CGC 1116
 GTG CTG AAG TCA AGT TTG AAG GTG ATA CCC TTG TTA ATC GTA TCG AGT TAA AAG GTA TTG ATT TTA AAG AAG ATG GAA ACA TTC TCG GAC ACA 1209
 AAC TCG AGT ACA ACT ATA ACT CAC ACA ATG TAT ACA TCA CCG CAG ACA AAC AAA AGA ATG GAA TCA AAG CTA ACT TCA AAA TTC GCC ACA ACA 1302
 TTG AAG ATG GAT CCG TTC AAC TAG CAG ACC ATT ATC AAC AAA ATA CTC CAA TTG GCG ATG GCC CTG TCC TTT TAC CAG ACA ACC ATT ACC TGT 1395
 CGA CAC AAT CTG CCC TTT CGA AAG ATC CCA ACG AAA AGC GTG ACC ACA TGG TCC TTC TTG AGT TTG TAA CTG CTG CTG GGA TTA CAC ATG GCA 1488
 TGG ATG AGC TCT ACA AAT AAT GAA TTC CAA CTG AGC GCC GGT CCG TAC CAT TAC CAA CTT GTG TGG TGT CAA AAA TAA TAG GCC TAC TAG TCG 1581
 GCG CGC GGA TCC ATC TGC AGC TTT AAA TAA TCG GTG TCA CTA CAT AAG AAC ACC TTT GGT GGA GGG AAC ATC GTT GGT ACC ATT GGG CGA GGT 1674
 GGC TTC TCT TAT GGC AAC CGC AAG AGC CTT GAA CGC ACT CTC ACT ACG GTG ATG ATC ATT CTT GCC TCG CAG ACA ATC AAC GTG GAG GGT AAT 1767

Mutación a:

FIG 9

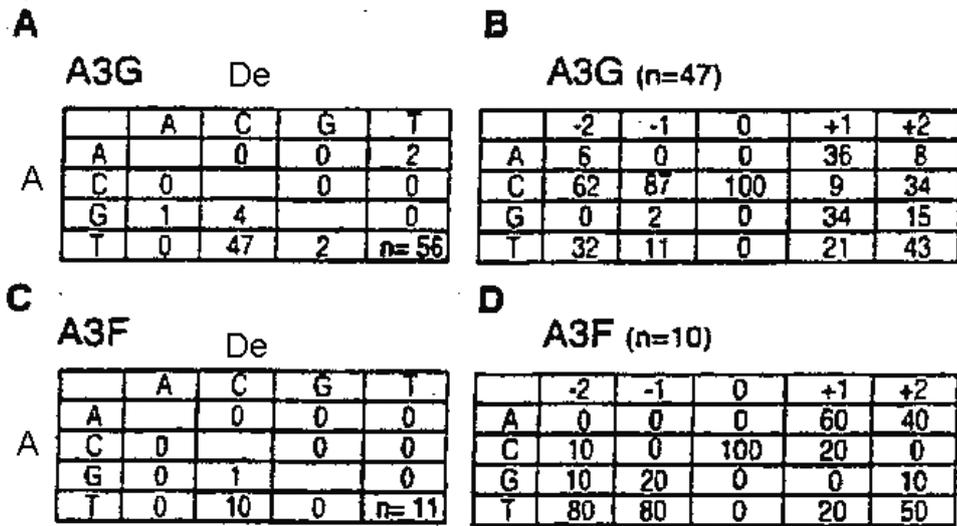


FIG 10

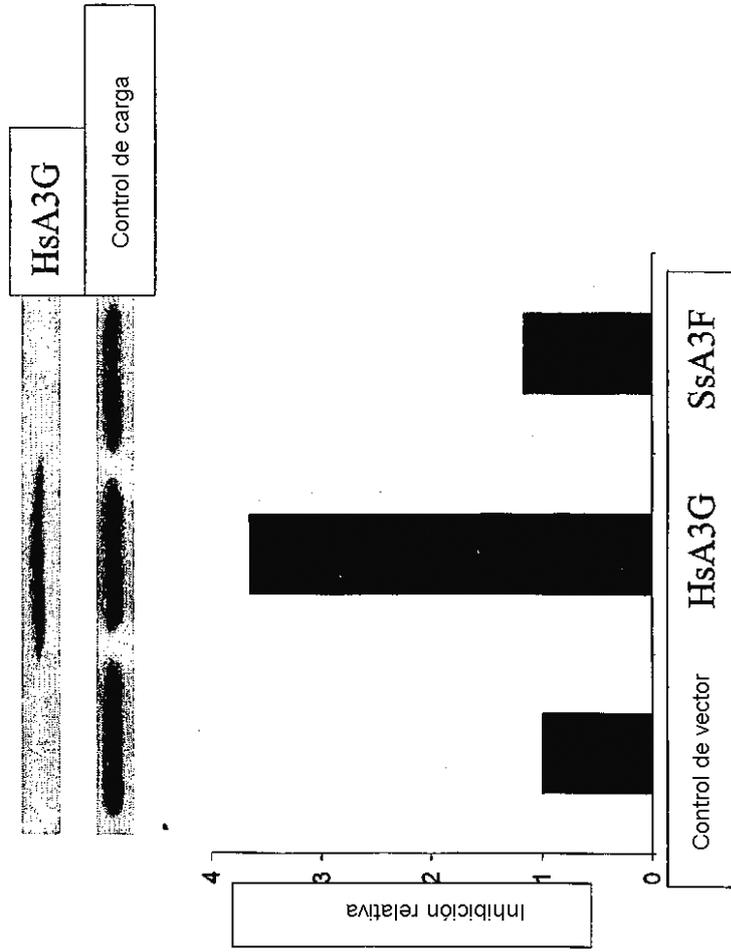


FIG 11

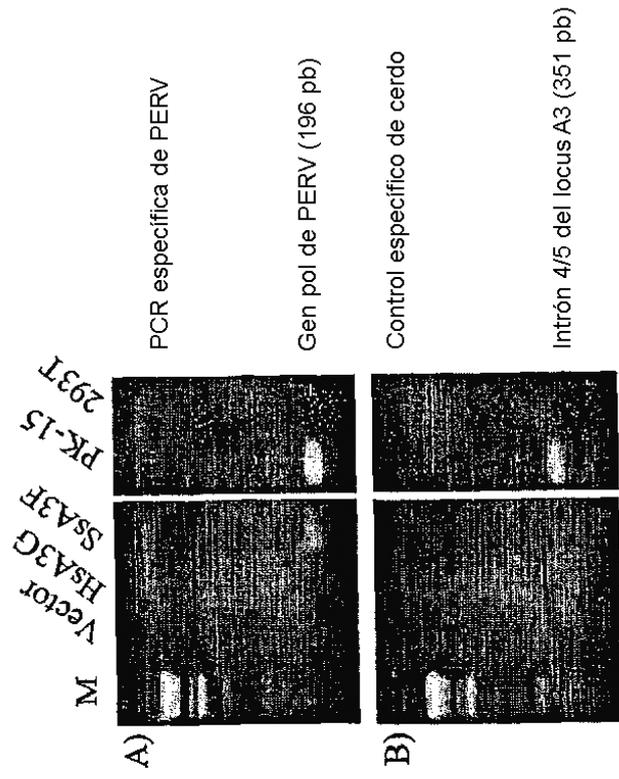


FIG 12

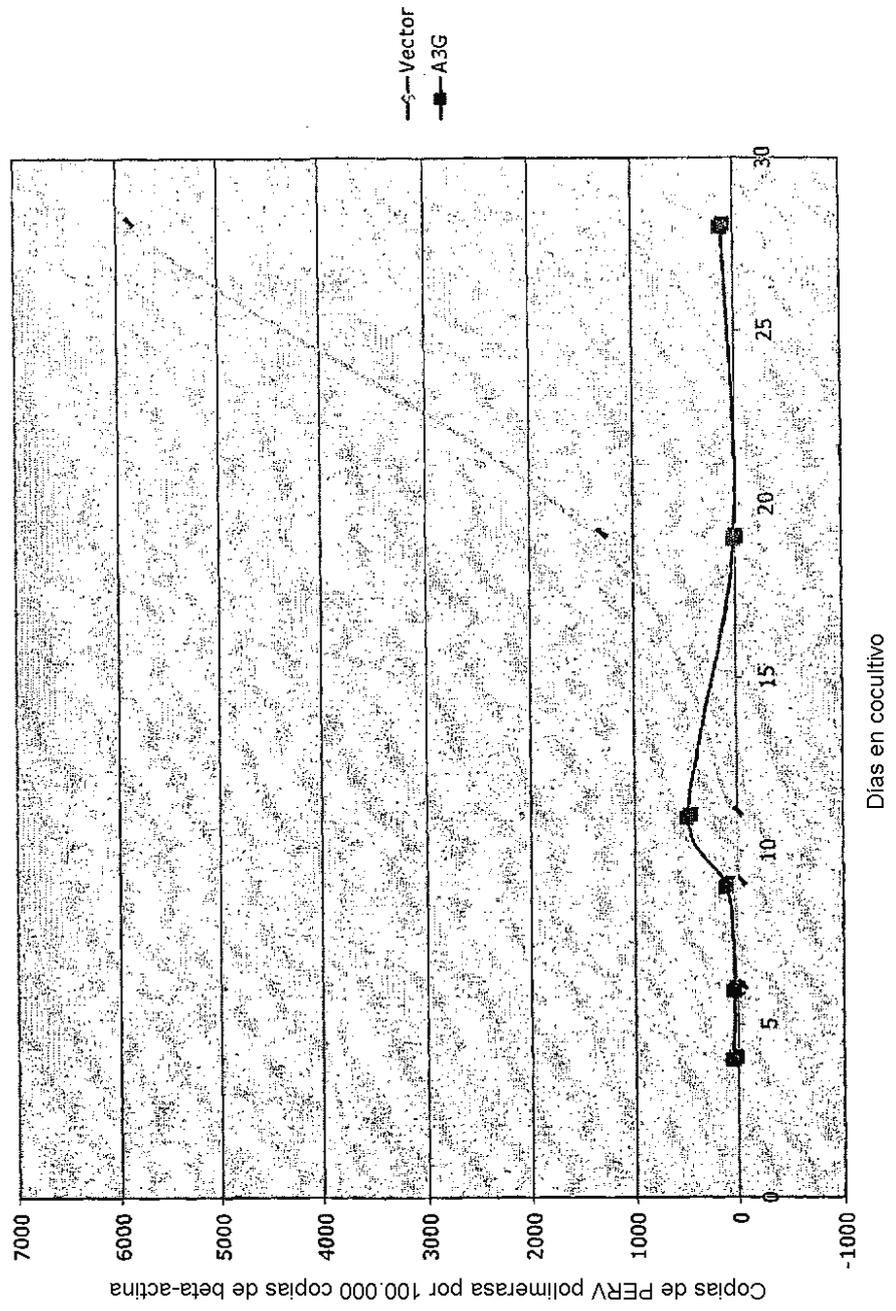


FIG 14

HsA3F	PETHCHAERCFLSWFCDDILSPNTNYEVTWYTSW	SPCPECAGEVA	288
BtA3F	GGTRCHTELRFELSWFHAEKLRPNERYHITWFMSW	SPCMKCAKEVA	117
OaA3F	AGTHCHSERRFKSWFCAKKLRPDECYHITWFMSW	SPCMKCAELVA	104
SsA3F	PDPPCHAELCFLSWFQSWGLSPDEHYVTFISW	SPCCECAAKVA	124
	HXE-----X ₂₄₋₂₈ -----	SPCXXC	

FIG 15

