



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 359 826**

(51) Int. Cl.:
C12N 15/85 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **07803195 .2**

(96) Fecha de presentación : **04.09.2007**

(97) Número de publicación de la solicitud: **2066794**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **10.06.2009**

(54) Título: **Modelo animal para la selección y validación de agentes activos contra el enfisema pulmonar y el cáncer colorrectal.**

(30) Prioridad: **15.09.2006 EP 06120714**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.05.2011

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.05.2011

(73) Titular/es: **FRANKGEN BIOTECHNOLOGIE AG.**
Wilhelm-Bonn-Strasse 8F
61476 Kronberg/Taunus, DE

(72) Inventor/es: **Melchner, Harald Von;**
Wempe, Frank y
De-Zolt, Silke

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Modelo animal para la selección y validación de agentes activos contra el enfisema pulmonar y el cáncer colorrectal

La presente invención se refiere a un modelo animal de roedor, a cultivos celulares y tisulares obtenidos del mismo, que no producen o que producen sólo niveles subóptimos de una o más sestrinas funcionales y que, además, no producen o producen sólo niveles subóptimos de proteína de unión al factor de crecimiento transformante β latente 4 (Itbp4). Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para seleccionar agentes para tratar el enfisema pulmonar y/o el cáncer colorrectal mostrado utilizando el modelo animal, cultivo celular o tisular de la invención. El modelo animal de roedor, cultivo celular o tisular es adecuado para el ensayo preclínico de la eficacia, toxicidad y biodisponibilidad de agentes potenciales.

Antecedentes de la invención

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica con enfisema pulmonar (EPOC) es una enfermedad altamente prevalente que tiene un gran impacto sobre la calidad de vida de los pacientes y sus familias y que mata a millones de personas en todo el mundo. Aunque el factor de riesgo principal para la EPOC es la inhalación de partículas y gases tóxicos que se generan principalmente, pero no exclusivamente, en el humo del tabaco, también están implicadas anomalías primarias (genéticas) de las vías respiratorias, ya que sólo una fracción de los fumadores desarrollan EPOC. La EPOC está asociada con costes muy importantes de atención sanitaria, en gran parte debido a tratamientos costosos tales como la terapia con oxígeno a largo plazo y las admisiones hospitalarias, así como costes indirectos incluyendo la pérdida de capacidad laboral. Además, el tratamiento de la EPOC se limita a los síntomas, ya que no se ha demostrado hasta ahora que ninguna intervención farmacológica modifique la historia natural de la enfermedad (Vestbo J. y Hogg, J. C. Thorax. 61: 86-8, 2006; Fabbri L. M., y col. Am J Respir Crit Care Med. 173: 1056-65, 2006).

El cáncer colorrectal es una de las neoplasias más comunes en el hemisferio Occidental y representa un desafío de salud pública muy importante a pesar de los progresos en la detección y la terapia. La mortalidad total a los 5 años es de aproximadamente el 40%. Aunque la enfermedad en fase temprana puede curarse mediante cirugía, sólo está disponible un tratamiento paliativo para pacientes con cáncer metastásico no resecable cuya tasa de supervivencia está entre 7-24 meses (Shaheen N. J., y col. Am J Gastroenterol. 2006).

De lo anterior se hace evidente que son altamente deseables nuevos compuestos farmacéuticos para el tratamiento de ambas afecciones y que podrían identificarse con el modelo animal de la invención, que muestra tanto enfisema pulmonar como cáncer colorrectal como resultado de mutaciones de pérdida de función en los genes de sestrina 2 y proteína de unión a factor de crecimiento transformante beta latente 4.

Los factores de crecimiento transformante β (TGF- β) pertenecen a una superfamilia de proteínas cuyos miembros controlan el crecimiento y la diferenciación celular en una diversidad de tejidos adultos y están implicados en una amplia variedad de respuestas inflamatorias e inmunes (Shi Y. y Massague, J. Cell. 113: 685-700, 2003; Sheppard D. Proc Am Thorac Soc. 3: 413-7, 2006). La mayoría de las células secretan TGF- β como una citocina latente funcionalmente inactiva, que forma un complejo con su propéptido asociado a latencia (LAP), que interacciona con sus receptores sólo después de su activación por escisión proteolítica. Hay dos complejos latentes estructuralmente diferentes conocidos de TGF- β . El complejo latente pequeño consiste en un dímero de TGF- β maduro unido a la parte N-terminal del propéptido TGF- β -LAP. El complejo latente grande contiene, además de TGF- β -LAP, una de las tres proteínas de unión a TGF- β latentes (Itbp 1, 3 y 4). A menos que se desplace de las Itbp después de la secreción, el TGF- β se deposita habitualmente en la matriz extracelular (MEC) como un complejo de alto peso molecular con Itbp y LAP (Annes J. P., y col. J Cell Sci. 116: 217-24, 2003). Las 4 isoformas existentes de Itbp (Itbp 1-4) se han inactivado por mutación en el ratón (Dabovic B., y col. J Cell Biol. 56: 227-232, 2002; Sterner-Kock A., y col. Genes Dev. 16: 2264-2273, 2002; Shipley J. M., y col. Mol Cell Biol. 20: 4879-87, 2000). Aunque los fenotipos de los ratones *knock out* variaban entre isoformas, tanto los mutantes Itbp3 como Itbp4 desarrollan enfisema pulmonar debido a defectos en la señalización de TGF- β . Sin embargo, al contrario que los ratones Itbp3 mutantes que desarrollan enfisema, que es relativamente leve y estrictamente evolutivo (Dabovic B., y col. J Cell Biol. 56: 227-232, 2002), los enfisemas en los ratones Itbp4 (*Itbp4*^{-/-}) mutantes empeoran con la edad y progresivamente adquieren las características de los enfisemas de inicio tardío que se desarrollan en el contexto de la EPOC en seres humanos (Sterner-Kock A., y col. Genes Dev. 16: 2264-2273, 2002; WO 03/015505). La relevancia potencial de Itbp4 en la patogénesis de la EPOC se ha subrayado recientemente por un estudio clínico que describe una correlación altamente significativa entre síntomas de EPOC específicos y un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en *Itbp4* (Hersh C. P., y col. Am J Respir Crit Care Med. 173: 977-84, 2006). Además del enfisema, los ratones *Itbp4* mutantes desarrollan cáncer colorrectal invasivo (Sterner-Kock A., y col. Genes Dev. 16: 2264-2273, 2002; documento WO 03/015505). También se ha descrito recientemente una relación entre la expresión de *Itbp4* y la progresión del cáncer en un estudio clínico de pacientes con cáncer colorrectal (Bertucci F., y col. Oncogene. 23: 1377-91, 2004).

La sestrina 2 pertenece a una familia de proteínas altamente conservadas descubiertas inicialmente como proteínas inducibles por p53 (Velasco-Miguel S., y col. Oncogene. 18: 127-37, 1999; Peeters H., y col. Hum Genet. 112: 573-80, 2003; Budanov A. V., y col. Oncogene. 21: 6017-31, 2002; documentos WO 00/12525; US 2002/0103353). Las

células de mamífero expresan tres isoformas denominadas sestrina 1 (sestrina 1; también conocida como PA26), sestrina 2 (sestrina 2; también conocida como Hi95) y sestrina 3 (Figura 1). Se ha demostrado recientemente que dos de las sestrinas (sestrina 1 y sestrina 2) regulan los niveles de peróxido intracelular (ROS) (Budanov A. V., y col. Science. 304: 596-600, 2004; Sablina A. A., y col. Nat Med. 11: 1306-13, 2005). Más específicamente, se cree que las sestrinas regeneran (reducen) las peroxirredoxinas (Prx), que son proteínas antioxidantes altamente conservadas y expresadas ubicuamente (revisado en Georgiou G. y Masip, L. Science. 300: 592-4, 2003; Wood Z. A., y col. Trends Biochem Sci. 28: 32-40, 2003). Al reducir el H₂O₂ a H₂O, las Prx se oxidan en su denominada cisteína peroxidática (Cys-SH), que se convierte en ácido sulfénico (Cys-SOH) (Figura 2). En bacterias, cuando la Prx AhpC es la secuestrante primaria de H₂O₂, la AhpC oxidada se reduce posteriormente por la reductasa especializada AhpF. Sin embargo, a diferencia de AhpC, las Prx de mamífero son altamente susceptibles a la sobreoxidación produciendo ácido sulfínico (Cys-SO₂H) en presencia de altas concentraciones de peróxido (Figura 2). Los ácidos sulfínicos de proteínas no pueden reducirse por reductores celulares típicos tales como glutatión y tioredoxina y, por lo tanto, su formación se ha considerado un proceso irreversible. Una vez que la Prx se ha convertido en ácido sulfínico ya no es enzimáticamente activa, y la enzima inactiva se acumula en las células expuestas a estrés oxidativo (Wood Z. A., y col. Trends Biochem Sci. 28: 32-40, 2003). Sin embargo, más recientemente se ha observado una recuperación gradual de las Prx después de la inactivación oxidativa inicial en células eucariotas (Mitsumoto A., y col. Free Radic Biol Med. 30: 625-35, 2001; Woo H. A., y col. Science. 300: 653-6, 2003) y se ha propuesto a las sestrinas como las enzimas catalizantes debido a su homología con el homólogo de sestrina bacteriano —AhpD—, que regenera la AhpC Prx, y debido a su capacidad para reducir los niveles de ROS intracelulares (Budanov A. V., y col. Science. 304:596-600, 2004).

Se cree que en células eucariotas las Prx son tanto antioxidantes que protegen frente al estrés como reguladores de la señalización mediada por ROS (Wood Z. A., y col. Science. 300: 650-3, 2003). Se ha sabido durante algún tiempo que las interacciones de ligando/receptor generan explosiones de ROS, que actúan como segundos mensajeros en las rutas de transducción de señales, incluyendo la ruta de TGF-β (Bae Y. S., y col. J Biol Chem. 272: 217-21, 1997; Lo Y. Y. y Cruz, T. F. J Biol Chem. 270: 11727-30, 1995; Mills E. M., y col. J Biol Chem. 273: 22165-8, 1998; Sundaresan M., y col. Science. 270: 296-9, 1995; Thannickal V. J., y col. J Biol Chem. 273: 23611-5, 1998; Thannickal V. J., y col. Faseb J. 14: 1741-8, 2000). Se ha demostrado que una señalización de TGF-β defectuosa está implicada en la patología del enfisema pulmonar y del cáncer colorrectal tanto en modelos animales (incluyendo el documento WO 03/015505 A3) como en humanos (Morris D. G., y col. Nature. 422: 169-73, 2003; Neptune E. R., y col. Nat Genet. 33: 407-11, 2003; Sterner-Kock A., y col. Genes Dev. 16: 2264-2273, 2002; Massague J., y col. Cell. 103: 295-309, 2000; Zhu Y., y col. Cell. 94: 703-14, 1998).

La asociación entre ROS y TGF-β es compleja y se produce a diferentes niveles de la cascada de señalización. En primer lugar, se ha demostrado que ROS activa el TGF-β1 latente tanto *in vitro* como *in vivo* (Annes J. P., y col. J Cell Sci. 116: 217-24, 2003; Barcellos-Hoff M. H. y Dix, T. A. Mol Endocrinol. 10: 1077-83, 1996). En línea con esto, Fatma y col. han descrito recientemente que células epiteliales lenticulares obtenidas de ratones *knock out* para Prx6 son altamente susceptibles al estrés oxidativo y desarrollan un fenotipo indistinguible de la estimulación por TGF-β. Los inventores podían atribuir este fenotipo a una activación mediada por ROS de TGF-β latente que era fácilmente reversible por antioxidantes (Fatma N., y col. Cell Death Differ. 12: 734-50, 2005). En segundo lugar, el TGF-β requiere de ROS para la inducción de diversos genes diana tales como PAI-1, CTGF y genes de la matriz extracelular (Jiang Z., y col. Biochem Biophys Res Commun. 309: 961-6, 2003; Park S. K., y col. Biochem Biophys Res Commun. 284: 966-71, 2001). Estudios recientes han demostrado que la fosforilación de smad2,3 inducida por TGF-β también es parcialmente dependiente de ROS (Cucoranu I., y col. Circ Res. 97: 900-7, 2005), presumiblemente mediante la inactivación de una fosfatasa especializada. Se ha sabido durante algún tiempo que las fosfatasas son susceptibles a la inactivación por ROS (Seo J. H., y col. Mol Biol Cell. 16:348-57, 2005; Chiarugi P. y Cirri, P. Trends Biochem Sci. 28:509-14, 2003) y se ha descubierto recientemente una fosfatasa smad2,3 (PPM1A) capaz de terminar la señalización de TGF-β (Lin X., y col. Cell. 125: 915-28, 2006. Third, TGF-β itself induces superoxide production by activating NADPH oxidases presumably by the transcriptional upregulation of Nox4 (Sturrock A., y col. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 290: L661-L673, 2006).

Descripción de la invención

Se ha descubierto ahora que la ablación genética de una sestrina, en particular la sestrina 2, del modelo animal (modelo de ratón *ltbp4*^{-/-}) descrito en el documento WO 03/015505 daba como resultado una recuperación significativa de las patologías (véanse los ejemplos), indicando que esta familia de proteínas podría proporcionar dianas moleculares para el tratamiento de la EPOC y del cáncer colorrectal. Se cree que la ablación de la sestrina 2 en el modelo animal del documento WO 03/015505 reactivaba la señalización de TGF-β, presumiblemente por aumento de los niveles de segundos mensajeros intracelulares ROS. Esto a su vez mejoró significativamente ambas patologías como se ilustra por los ejemplos, sugiriendo que el enfisema pulmonar y el cáncer colorrectal pueden tratarse por antagonismo de la función de la sestrina. La presente invención se refiere por lo tanto a

(1) un modelo animal de roedor, que no produce una o más sestrinas funcionales, o que produce niveles de traducción reducidos al menos el 50% de una o más sestrinas, preferentemente la sestrina 2, y además no produce proteína de unión al factor de crecimiento transformante β latente 4 (en lo sucesivo "ltbp4") o produce niveles de traducción reducidos al menos el 50% de ltbp4;

(2) un modelo animal de roedor, que no expresa una o más sestrinas funcionales, o que expresa niveles de traducción reducidos al menos el 50% de una o más sestrinas;

(3) un cultivo celular o tisular aislado de los modelos animales de roedor que se han definido en (1) o (2) anteriormente, en el que los niveles de expresión en la célula o en las células del tejido de las proteínas sestrina y *ltbp4* son como se han definido en (1) o (2);

(4) un procedimiento para preparar el modelo animal de roedor de (1) anterior, que comprende alterar el gen de sestrina y/o *ltbp4* en una célula germinal de un animal roedor de partida;

(5) un procedimiento para seleccionar un agente para tratar un síntoma que aparece en el modelo animal de roedor del (1) anterior, que comprende:

(i) aplicar uno o más agentes a ensayar ha dicho modelo animal de roedor,

(ii) determinar si uno o más síntomas que aparecen en dicho modelo animal de roedor han cambiado como resultado de la aplicación de dicho agente o agentes;

(6) un procedimiento para seleccionar un agente que interfiera con la producción de ROS y la señalización de TGF- β , que comprende:

(i) aplicar uno o más agentes a ensayar al cultivo celular o tisular de (3) anterior,

(ii) determinar si los niveles de ROS celulares y la señalización de TGF- β han cambiado como resultado de la aplicación de dicho agente o agentes;

(7) un procedimiento para analizar si el cáncer y/o enfisema pulmonar está causado por una expresión proteica o génica de *ltbp4* y sestrina o un nivel de expresión diferencial o por un defecto en el gen de *ltbp4* y sestrina, que comprende:

(i) caracterizar la expresión proteica o génica de *ltbp4* y sestrina o el nivel de expresión o el estado alélico del gen de *ltbp4* y sestrina de un individuo que tiene cáncer o enfisema pulmonar,

(ii) caracterizar la expresión proteica o génica de *ltbp4* y sestrina o el nivel de expresión o el estado alélico del gen de *ltbp4* y sestrina de un individuo de control, indicando una diferencia en la expresión proteica o génica de *ltbp4* y sestrina o el nivel de expresión o el estado alélico del gen de *ltbp4* y sestrina que el cáncer y/o el enfisema pulmonar y/o la cardiomiopatía está relacionada con una expresión proteica o génica de *ltbp4* y sestrina o un nivel de expresión diferencial o por un defecto en los genes de *ltbp4* y sestrina;

En conclusión, la presente invención proporciona un modelo animal de roedor de enfermedad humana que pone de manifiesto algunas funciones cruciales de las proteínas sestrinas. A la vista de estas funciones, el modelo animal de roedor de la invención puede usarse para desarrollar nuevos tratamientos para el enfisema pulmonar y el cáncer que se dirijan a proteínas sestrinas y a su papel en el metabolismo de ROS y en la señalización de TGF- β .

Descripción de las figuras

Figura 1: Secuencia de aminoácidos de las sestrinas de ratón y homología entre isoformas. Las secuencias de las isoformas se muestra adicionalmente en las SEC ID N°: 1 a 3.

Figura 2: Oxidación de la cisteína peroxidática de peroxirredoxinas (Prx) por superóxidos. Las Prx reducidas forman dímeros mediante un enlace disulfuro (1). Las Prx oxidadas forman ácido sulfénico (2), que se reduce por tiorredoxina o glutatión en una reacción inversa (1). Las Prx sobreoxidadas forman ácido sulfínico, que no puede reducirse por tiorredoxina o glutatión (3). Se cree que las sestrinas regeneran las Prx sobreoxidadas. Para una explicación adicional véase el texto.

Figura 3: Inserción de trampa de genes pT1 β geo en el último intrón del gen de sestrina 2 (Ensembl Id: *ENSMUSG00000028893*) y posición de los cebadores específicos de alelo (flechas). La proteína de fusión resultante carece de 27 aminoácidos de la sestrina 2.

Figura 4: Montaje completo de embrión E7.5 teñido con X-Gal.

Figura 5: Análisis de la expresión génica de sestrina 2 en ratones mutantes W077E04. A. qRT-PCR del ARN total extraído de pulmones de ratones tipo silvestre (WT), heterocigotos (+/-) y homocigotos (-/-). B. Análisis de transferencia de Western de la expresión de proteína sestrina 2 en fibroblastos aislados de colon (carriles 1, 2) y pulmón (carriles 3, 4) de ratón usando anticuerpos policlona anti-sestrina 2 de ratón (PTG Inc., Chicago, IL) y anti-tubulina. Las bandas minoritarias que reaccionan con el anticuerpo policlona anti-sestrina 2 son muy probablemente inespecíficas.

Figura 6: Moldes de silicona traqueobronquiales de ratones de tipo silvestre de 5,5 meses de edad, simples

mutantes *ltbp4* y dobles mutantes *ltbp4/sesn2*.

Figura 7: Enfisema pulmonar de ratones simples mutantes *ltbp4* y dobles mutantes *ltbp4/sesn2* de la misma edad. Tinción con HE a 40x aumentos.

5 **Figura 8:** Contenido de elastina y colágeno en pulmones de simples mutantes *ltbp4* y dobles mutantes *ltbp4/sesn2*. A. Elastina (negro) teñida con resorcina-fucsina de Weigert a 200x aumentos. B. Colágeno (azul) teñido con tinción tricrómica de Masson a 200x aumentos.

Figura 9: Molde de silicona traqueobronquial de un pulmón *ltbp4^{-/-}* heterocigoto para alelos nulos de *sesn2*.

Figura 10: Deposición de colágeno en pulmones mutantes *ltbp4* heterocigotos (*sesn^{+/+}*) y homocigotos (*sesn^{-/-}*) para el alelo nulo de *sesn2*. Colágeno (azul) teñido con tinción tricrómica de Masson a 200x aumentos.

10 **Figura 11:** Adenoma colorrectal en ratones simples mutantes (*ltbp4^{-/-}*) y dobles mutantes (*ltbp4^{-/-} sesn2^{-/-}*) de la misma edad.

Figura 12: Niveles de P-smad2 en el colon de ratones simples mutantes (*ltbp4^{-/-}*) y dobles mutantes (*ltbp4^{-/-} sesn2^{-/-}*) de la misma edad. Las células positivas son de color marrón rojizo.

15 **Figura 13:** Niveles de P-smad2 en pulmones mutantes *sesn2*. Se tiñeron secciones pulmonares con anticuerpo policlonal anti-P-smad2. Las células positivas eran de color marrón rojizo.

Figura 14: Deposición de tejido conectivo aumentada en pulmones mutantes *sesn2*. Tinción con HE a 200x (parte superior) y 400x (parte inferior) aumentos.

20 **Figura 15:** Niveles de ROS en MLF. A. Cantidades de ROS inducidas por H₂O₂ (200 μM, 3 horas) y basales medidas mediante FACS (530 nm) después del tratamiento con DCF. FL1-H, intensidad de fluorescencia. B. Cantidades de ROS inducidas por H₂O₂ y basales que se acumulan en MLF expresadas como intensidad media de la fluorescencia celular ± DT de los dos experimentos independientes mostrados en A.

Descripción detallada de la invención

Los términos y abreviaturas particulares utilizadas para definir la presente invención se definen adicionalmente en lo siguiente.

25 Las expresiones “no produce sestrinas funcionales” “no produce *ltbp4* funcional” indican la ausencia de expresión eficaz de sestrina y *ltbp4*, respectivamente. Una “ausencia de expresión eficaz de sestrina y *ltbp4*” también incluye la expresión de proteínas sestrinas no funcionales (es decir, truncadas) y *ltbp4* que no están ejerciendo la función de la proteína nativa.

30 Las expresiones “produce niveles subóptimos de sestrinas” y “produce niveles subóptimos de *ltbp4*” abarcan el nivel de traducción de las proteínas sestrina y *ltbp4*, que es insuficiente para ejercer su función. Preferentemente, el nivel se reduce al menos el 50%, más preferentemente el 70% y, más preferentemente, el 100%.

La expresión “interrupción homocigota” se refiere a una mutación idéntica en ambos alelos de un gen.

La expresión “interrupción heterocigota” se refiere a una mutación en solo un alelo de un gen. El término “mutación” se refiere a un cambio de uno o más pares de nucleótidos de una molécula de ADN.

35 El término “inserción” se refiere a una mutación identificada por la presencia de uno o más pares de bases adicionales en el ADN. El término “deleción” se refiere a una mutación generada por eliminación de una secuencia de ADN (uno o más pares de bases), uniéndose entre sí las regiones en cada lado. La expresión “mutación por sustitución” se refiere a un intercambio de nucleótido. La mutación por sustitución puede dar como resultado un cambio de aminoácido o puede introducir un codón de terminación de la traducción prematuro. Además, una
40 mutación por sustitución puede afectar al corte y empalme o a la expresión del gen cuando se produce en sitios necesarios para el corte y empalme o la regulación génica.

La expresión “direccionamiento génico” se refiere a un tipo de recombinación homóloga que se produce cuando un fragmento de ADN genómico se introduce en una célula y ese fragmento se recombina con secuencias homólogas en el genoma. La expresión “integración de trampa de genes” se refiere a la inserción de un vector, que comprende
45 un gen indicador y que se activa tras su inserción en una unidad de transcripción activa del genoma. El término “mutagénesis” indica un tratamiento químico o físico que cambia nucleótidos en el genoma de un organismo. Un ejemplo de una mutagénesis química es la mutagénesis por *N*-etil-*N*-nitrosurea (ENU).

50 El término “exón” incluye un segmento de un gen que está codificado para dar un producto de ARNm. Los exones individuales pueden contener ADN codificante de proteína y/o ADN no codificante. El término “intrón” indica ADN no codificante, que separa exones vecinos en un gen. Durante la expresión génica, tanto los intrones como los exones se transcriben en ARN pero las secuencias intrónicas transcritas se eliminan posteriormente por corte y empalme del

ARN y no están presentes en el ARNm. La expresión “región reguladora” se refiere a la secuencia de nucleótidos que comprende regiones que son necesarias para la regulación de la transcripción génica. Estas regiones comprenden, por ejemplo, promotores y potenciadores y pueden localizarse en regiones no traducidas 5', exones, intrones y UTR 3'. La expresión “sitio de corte y empalme” incluye los nucleótidos al comienzo y al final del intrón que son necesarios para la unión de dos exones por eliminación del intrón intercalado durante el procesamiento del transcrito primario a ARNm funcional.

La expresión “enfisema pulmonar” indica un síntoma de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) caracterizado por un aumento de tamaño más allá de lo normal de los espacios aéreos distales a los bronquiolos terminales y por infiltrados inflamatorios.

El término “cardiomiopatía” designa una enfermedad no inflamatoria primaria del músculo cardíaco que es el resultado de una hipertensión pulmonar que complica la EPOC. El término “cáncer” se refiere a una proliferación descontrolada de las células epiteliales que revisten las criptas colónicas.

El “metabolismo de ROS” se refiere a la producción y neutralización (reducción) de especies de oxígeno reactivo intracelulares tales como peróxido de hidrógeno y aniones de oxígeno. La expresión “cambios profibróticos” se refiere a una deposición tisular aumentada de colágeno asociada con una multiplicación de fibroblastos.

La expresión “selección de un agente para tratar un síntoma” incluye escoger una composición para el tratamiento de la afección.

La expresión “aplicación de uno o más agentes” se refiere a administrar compuestos individuales o combinaciones de compuestos por vía oral, por inhalación, por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular, o por vía tópica, por ejemplo, por vía oftálmica, vaginal, rectal o intranasal.

La invención se describe en lo sucesivo en más detalle por referencia a las Figuras y Ejemplos adjuntos.

En una realización preferida del aspecto (1) de la invención, el genoma del roedor comprende una interrupción homocigota de los genes *sesn2* y *Itbp4*. Preferentemente, esta interrupción homocigota se ha generado por una mutación y esta mutación puede ser una mutación por inserción, delección o sustitución. Además, preferentemente, dicha mutación se genera por direccionamiento génico, atrapamiento génico o mutagénesis química y se ha producido en un exón, intrón, región reguladora o sitio de corte y empalme del gen de sestrina 2, preferentemente en el último intrón (es decir, el 9º intrón) del gen de sestrina 2, y en un exón, intrón, región reguladora o sitio de corte y empalme del gen *Itbp4*, preferentemente el 5º intrón de *Itbp4*. También se prefiere que los sitios de mutación den origen a una expresión de un gen indicador detectable tal como proteínas fluorescentes (tales como GFP y sus derivados), enzimas (tales como LacZ) o marcadores de selección (tales como β geo). Se prefiere particularmente que:

(i) el gen de sestrina 2 se interrumpa en el 9º intrón por inserción de un vector de trampa de genes, preferentemente pT1 β geo (SEC ID N°: 10); y/o

(ii) el gen de *Itbp4* se interrumpa en el 5º intrón por inserción de un vector de trampa de genes, preferentemente U3Cre (SEC ID N°: 16).

En una realización preferida adicional, dicho roedor comprende una interrupción heterocigota del gen de *sesn2* y una interrupción homocigota del gen de *Itbp4* o una interrupción homocigota del gen de sestrina 2 y una interrupción heterocigota del gen de *Itbp4*.

En otro aspecto de la invención, el modelo animal de roedor presenta enfisema pulmonar y/o cardiomiopatía y/o cáncer colorrectal. Además, el roedor es preferentemente un ratón o rata.

En una realización preferida adicional, el modelo animal de roedor presenta defectos en el metabolismo de ROS y/o cambios profibróticos en uno o más órganos principales, preferentemente en el pulmón o colon.

En una realización preferida adicional, el modelo animal de roedor desarrolla síntomas que son menos graves que los presentados por el modelo animal descrito en el documento WO 03/015505.

La realización (3) de la invención se refiere a un cultivo celular o tisular aislado de un modelo animal de roedor de (1) o (2). Preferentemente, la célula procede del pulmón o del colon.

En un aspecto preferido de esta realización, el cultivo celular o tisular se aísla de un modelo animal de roedor cuyo genoma comprende una interrupción homocigota de uno o más genes de sestrina, de modo que dichos genes no producen sestrinas funcionales, preferentemente sestrina 2, y una interrupción homocigota del gen de *Itbp4*, de modo que dicho gen no produce *Itbp4* funcional.

En otro aspecto preferido de esta realización, el cultivo celular o tisular se aísla de un modelo animal de roedor cuyo genoma comprende una interrupción heterocigota de uno o más genes de sestrina, de modo que dichos genes producen sólo el 50% o menos de sestrinas funcionales, preferentemente sestrina 2, y una interrupción homocigota

del gen de *Itbp4*, de modo que dicho gen no produce *Itbp4* funcional.

En otro aspecto preferido de esta realización, el cultivo celular o tisular se aísla de un modelo animal de roedor cuyo genoma comprende una interrupción homocigota de uno o más genes de sestrina, preferentemente sestrina 2, y una interrupción heterocigota de *Itbp4*, de modo que dicho gen produce sólo el 50% o menos de *Itbp4* funcional. Se prefiere particularmente que el cultivo celular o tisular proceda del pulmón o del colon. La realización (4) de la invención se refiere a un procedimiento para preparar el modelo animal de roedor de las realizaciones (1) y (2), que comprende interrumpir el gen de sestrina y/o *Itbp4* en una célula germinal de un animal no humano de partida. En un aspecto preferido de esta realización, la célula germinal es una célula ES. El procedimiento puede comprender además introducir las células ES resultantes en blastocistos, inyectar los blastocistos obtenidos en madres adoptivas de roedor respectivas y cruzar entre sí las quimeras resultantes.

La realización (5) de la invención se refiere a un procedimiento para seleccionar un agente o agentes para tratar un síntoma que aparece en el modelo animal de roedor de la invención, que comprende: (i) aplicar uno o más agentes a ensayar al modelo animal de la invención; y (ii) determinar si uno o más síntomas que aparecen en el modelo animal de roedor de la presente invención han cambiado como resultado de la aplicación de dicho agente o agentes. En una realización preferida, el síntoma se selecciona de un grupo que consiste en enfisema pulmonar, cardiomiopatía y cáncer. El agente, que es adecuado para tratar un síntoma que aparece en el modelo animal de roedor de la invención, puede ser un producto farmacéutico. El agente, que es adecuado para tratar un síntoma que aparece en el modelo animal de la invención, puede ser adecuado para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento del enfisema pulmonar.

La realización (6) de la invención se refiere a un procedimiento para seleccionar un agente que interfiera con la producción de ROS y la señalización de TGF- β , que comprende:

(i) aplicar uno o más agentes a ensayar al cultivo celular o tisular del (3) anterior,

(ii) determinar si los niveles de ROS celulares y la señalización de TGF- β han cambiado como resultado de la aplicación de dicho agente o agentes.

Se prefiere particularmente en dicho procedimiento que el cultivo celular o tisular sea de pulmón o colon.

La realización (7) de la invención es un procedimiento para analizar si el enfisema pulmonar y/o cáncer esta causado por una expresión proteica o génica de *Itbp4* y sestrina o un nivel de expresión diferencial o por un defecto en los genes de *Itbp4* y sestrina, que comprende la (i) caracterización de la expresión proteica o génica de *Itbp4* y sestrina o el nivel de expresión o el estado alélico del gen de *Itbp4* y sestrina de un individuo que tiene enfisema pulmonar y/o cáncer, y la (ii) caracterización de la expresión proteica o génica de *Itbp4* y sestrina o el nivel de expresión o el estado alélico del gen de *Itbp4* y sestrina de un individuo de control. Una diferencia en la expresión proteica o génica de *Itbp4* y sestrina o el nivel de expresión o en el estado alélico del gen de *Itbp4* y sestrina indica que un defecto en los genes de *Itbp4* y sestrina está implicado en la patogénesis del enfisema pulmonar y/o del cáncer.

El procedimiento descrito en (7) puede usarse para diagnosticar el enfisema pulmonar o el cáncer, que comprende la (i) caracterización de la expresión proteica o génica de *Itbp4* y sestrina o el nivel de expresión o el estado alélico del gen de *Itbp4* y sestrina de un individuo, y la (ii) caracterización de la expresión proteica o génica de *Itbp4* y sestrina o el nivel de expresión o el estado alélico del gen de *Itbp4* y sestrina de un individuo de control. Una diferencia en la expresión proteica o génica de *Itbp4* y sestrina o el nivel de expresión o en el estado alélico del gen de *Itbp4* y sestrina indica la presencia de enfisema pulmonar y/o cáncer en dicho individuo. Entre los niveles de expresión determinados está el nivel de expresión de *Itbp4*, que es un indicador de la gravedad del enfisema pulmonar o del cáncer, mientras que el nivel de expresión de sestrina es un marcador para la progresión de la enfermedad, de modo que bajos niveles de expresión son beneficiosos para la progresión de la enfermedad.

El término "individuo" usado en relación con la realización (7) se refiere a un individuo con un estado alélico de gen de *Itbp4* y sestrina anormal sospechoso, es decir, un paciente. La expresión "individuo de control" se refiere a un individuo sano que tiene un estado alélico de *Itbp4* y sestrina normal.

En una realización preferida de los procedimientos para analizar si el enfisema pulmonar y/o el cáncer están relacionados con *Itbp4* y sestrina, y para diagnosticar el enfisema pulmonar y el cáncer, el estado alélico del gen de *Itbp4* y sestrina y la expresión o el nivel de expresión de *Itbp4* y sestrina se detectan por PCR genómica, RT-PCR, análisis de Northern, análisis de micromatrices (microplacas de ADN) o anticuerpos dirigidos contra las proteínas *Itbp4* y sestrina.

Los procedimientos de las realizaciones (5) a (7) son adecuados para realizarse *in vivo* e *in vitro*.

El modelo animal de roedor de la presente invención puede usarse para analizar minuciosamente los mecanismos moleculares que controlan la ruta de sestrina/TGF- β , y para la identificación y clonación de genes modificadores capaces de modificar, agravar, reducir o inhibir el fenotipo asociado con el enfisema pulmonar y el cáncer u otras afecciones que aparecen en el modelo animal de la invención. Además, el modelo animal de roedor puede usarse para la identificación de marcadores de diagnóstico tempranos para el cáncer y/o el enfisema pulmonar u otras

afecciones que aparecen en el modelo animal de la invención. Además, el modelo animal de roedor de la presente invención puede usarse para el control de la actividad de agentes útiles en la prevención o tratamiento del cáncer y/o del enfisema pulmonar u otras afecciones que aparecen en el modelo animal de roedor de la invención, y como sistema de modelo de ensayo para agentes sospechosos de promover o agravar el cáncer y/o el enfisema pulmonar u otras afecciones que aparecen en el modelo animal de la invención.

La invención se explica adicionalmente en los ejemplos siguientes que, sin embargo, no deben interpretarse como una limitación de la invención.

Ejemplos

Procedimientos

10 Cultivos celulares: Células ES obtenidas de la cepa [129/SvPas] se cultivaron sobre capas alimentadoras de MEF irradiadas (32 Gy) en DMEM complementado con suero fetal de ternera inactivado por calor y preseleccionado al 15% (v/v) (FCS) (Linaris, Bettingen, Alemania), aminoácidos no esenciales 100 mM (Gibco), mercaptoetanol 0,1mM (Sigma), 1000 U/ml de factor inhibidor de leucemia (LIF) (Esgró[®]; Gibco/BRL), como se describe (De-Zolt S., y col. Nucleic Acids Res. 34: e25, 2006). Se establecieron cultivos de fibroblastos de pulmón y colon a partir de ratones

15 adultos de tipo silvestre y sens-/- de acuerdo con protocolos convencionales como se ha descrito anteriormente (Koli K., y col. J Cell Biol. 167: 123-33, 2004) y se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero fetal de ternera al 10% (Life Technologies), penicilina 100 UI/ml y estreptomycin 50 µg/ml. Durante las dos primeras semanas en cultivo se produjo una inmortalización espontánea, generando líneas celulares.

20 RACE 5' y secuenciación: Se prepararon ADNc de líneas celulares ES que expresaban trampa de genes a partir del ARN poliadenilado usando un dispositivo robótico RoboAmp (MWG Biotech, Ebersberg, Alemania) con una capacidad de procesamiento de 96 muestras/día. Se lisaron muestras de 2×10^5 células en 1 ml de tampón de lisis que contenía Tris/HCl 100 mM pH 8,0, LiCl 500 mM, EDTA 10 mM, LiDS al 1% y DTT 5 mM. Se capturó el ARN poliadenilado a partir de los lisados mediante cebadores oligo-d(T) marcados con biotina, de acuerdo con las

25 instrucciones de los fabricantes (Roche Diagnostics Corp., Indianápolis, IN, Estado Unidos) y se pusieron en placas de 96 pocillos revestidas con estreptavidina (AB Gene, Surrey, Reino Unido). Después del lavado, se realizó la síntesis de ADNc en fase sólida *in situ* usando hexámeros aleatorios y SuperScript II RT (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). Para eliminar el exceso de cebadores los ADNc se filtraron a través de placas de PCR Multiscreen (Millipore Corp. Bedford, MA, Estados Unidos). Los extremos 5' de los ADNc purificados se confeccionaron con dCTP usando transferasa terminal -dT- (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la amplificación por PCR de las secuencias celulares adjuntas a los transcritos de la trampa de genes se usaron los cebadores específicos de vector siguientes: 5'-CTA CTA CTA CTA GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG-3' (SEC ID N°: 4) y 5'-GCC AGG GTT TTC CCA GTC ACG A-3' (SEC ID N°: 5); y para la PCR

30 anidada: 5'-CTA CTA CTA CTA GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3' (SEC ID N°: 6) y 5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT GTG AAG GCT GTG CGA GGC CG-3' (SEC ID N°: 7). Los productos de amplificación se secuenciaron directamente usando las máquinas de secuenciación AB377 o ABI3700 (Applied Biosystems ABI, Foster City, Estados Unidos).

40 Inyecciones de células ES, reproducción y genotipado: Se generaron quimeras derivadas de células ES W077E06 (TBV-2; 129SvPas) por inyección de blastocistos C57Bl/6. Las quimeras macho resultantes se cruzaron con hembras C57Bl/6, y la descendencia agutí F1 que contenía el transgén interrumpido se cruzó entre sí para obtener ratones F2 homocigotos. Se realizó el genotipado en ADN de cola de ratón por PCR genómica usando cebadores contra las secuencias que flanquean la inserción de la trampa de genes previamente identificada en células ES por PCR inversa y secuenciación.

45 Histología, histoquímica e inmunohistoquímica: Se prepararon secciones de parafina de tejidos de ratón y se tiñeron usando procedimientos de histología convencionales. Para visualizar fibras de elastina y de colágeno, se tiñeron portaobjetos microscópicos con resorcina-fucsina de Weigert o tinción tricrómica de Masson como se ha descrito anteriormente (Sternier-Kock A., y col. Genes Dev. 16: 2264-2273, 2002). Se realizaron inmunotinciones usando anticuerpos policlonales de conejo anti-P-Smad2 como se ha descrito en Sternier-Kock y col (Sternier-Kock A., y col. Genes Dev. 16: 2264-2273, 2002).

50 Plastinaciones: Tráqueas de pulmones preparados a partir de ratones mutantes y de tipo silvestre se inyectaron a temperatura ambiente con 1-2 ml de silicona E RTV (Dow Corning, Midland, MI, Estados Unidos) usando una jeringa de 2 ml. Se añadió agente de curado a una proporción de 1:10 al polímero de silicona inmediatamente antes de la inyección. La inyección se interrumpió cuando la silicona era visible bajo la superficie de ambos pulmones. Después de la inyección, se dejó que la silicona se endureciera durante 24-48 horas, después de lo cual los especímenes se pusieron en solución de hidróxido de potasio al 10% durante 5-7 días, y después se dejaron en agua en ebullición durante 8-12 horas para separar el tejido del polímero. Después de la maceración en agua en ebullición, los especímenes se pusieron en peróxido de hidrógeno al 5% durante aproximadamente 2 horas para completar la eliminación de tejidos residuales. Después, los moldes se aclararon en agua corriente durante una noche.

55

Aislamiento de ARN, RT-PCR y análisis de proteína: Se aisló el ARN celular total usando el kit RNeasy Mini (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se determinaron espectrofotométricamente (Ultrospec 3000, Amersham) las concentraciones y purezas del ARN, así como por electroforesis en gel de agarosa seguida de tinción con bromuro de etidio. Se realizaron RT-PCR de acuerdo con protocolos convencionales usando 75 ng de ARN total sometido a transcripción inversa en un volumen total de 50 µl. Se realizó un análisis de RT-PCR a tiempo real de la expresión del gen de sestrina 2 en células ES usando química de verde de SYBR (ABgene, Epsom, Reino Unido) y una máquina iCycler (Biorad). Se sintetizó el ADNc a partir del ARN total usando cebado aleatorio y la transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen). Las reacciones de PCR se procesaron como triplicados en volúmenes de 25 µl en placas de 96 pocillos, conteniendo cada reacción ADNc derivado de 15 ng de ARN total, mezcla de fluoresceína SYBR Absolute 1x (ABgene) y 5 pmol de cada uno de los cebadores siguientes: 5'-CCTGGAACGGAACCTCAAATC-3' (SEC ID N°: 8) y 5'-GGGCTTCAAGGAG-CAGCAAG-3' (SEC ID N°: 9). Se dejó que las reacciones de amplificación se desarrollaran durante 35 ciclos a 94°C durante 15 s, 61°C durante 30 s y 72°C durante 30 s. Para los lisados de transferencia de Western de fibroblastos de pulmón y colon, se resolvieron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se hicieron reaccionar con anticuerpo policlonal de conejo anti-sestrina 2 (PTG Inc., Chicago, IL).

Determinación de los niveles de peróxido intracelular: Se trataron con tripsina 3×10^5 fibroblastos de pulmón o de colon de ratones de tipo silvestre *sesn2*^{-/-} sembrados en placas de Petri de 6 cm un día antes, se lavaron en DMEM sin suero y se resuspendieron en 5 ml de DMEM sin suero. Se añadió H₂O₂ a algunos cultivos a una concentración final de 200 µM. Después de una incubación durante 3 horas, se añadió diclorodihidrofluoresceína (DCF) a las células a una concentración final de 30 µM y se incubó durante otra hora. Después de que las células se lavaran en PBS, se trataron con tripsina y se resuspendieron en 300 µl de PBS que se sometieron a análisis de FACS.

Ejemplo 1: Una inserción de trampa de genes pT1βgeo en el gen de sestrina 2 induce una mutación nula en ratones transgénicos.

La línea celular ES de trampa de genes W077E06 se obtuvo por electroporación del vector de trampa de genes pT1βgeo mostrado en la SEC ID N°: 10 en células ES TBV-2 (129SvPas) como se ha descrito anteriormente (Floss, T. y Wurst, W. Methods Mol Biol 185, 347-79, 2002). Se seleccionaron clones de células ES que expresaban trampa de genes en G418 200 µg/ml (Gibco/BRL), se escogieron manualmente, se expandieron y se almacenaron congelados en nitrógeno líquido. La inserción de la trampa de genes en el 9° intrón del gen de sestrina 2 (*sesn2*) se identificó entre los genes recuperados por RACE 5', como se describe en la sección de Procedimientos, y por análisis de la base de datos de secuencias (Genbank en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando el algoritmo BlastN. La inserción de la trampa de genes en la línea celular W077E06 se verificó por PCR genómica (véanse los Procedimientos) usando los cebadores siguientes complementarios a las secuencias de la trampa de genes y del intrón cadena arriba adyacente: 5'-CAGCCTTGAGCCTCTGGAGC-3' (SEC ID N°: 11) y 5'-CTACCCTGAGAAGACGACCCG-3' (SEC ID N°: 12). Las células ES W077E06 verificadas se convirtieron después en ratones mediante inyección de blastocistos. Los ratones F1 que llevaban el alelo de la trampa de genes se cruzaron entre sí y la descendencia F2 se emparejó con ratones *ltbp4*^{-/-} (documento WO 03/015505 A3) para obtener ratones doblemente *knock out*.

La Figura 3 muestra la estrategia de genotipado para los ratones W077E06 (*sesn2*). Se amplificó por PCR ADN de la cola en reacciones en paralelo usando un cebador directo en el 9° exón (5'-CTACCCTGAGAAGACGACCCG-3'; SEC ID N°: 13) y dos cebadores inversos; uno en el 9° intrón para detectar el alelo de tipo silvestre (5'-GGACAAATCAAGGTTACACAGAAAAAGTC-3'; SEC ID N°: 14) y el otro en el sitio aceptor de corte y empalme de la trampa de genes para detectar el alelo de la trampa de genes (5'-CAGCCTTGAGCCTCTGGAGC-3'; SEC ID N°: 15). Se dejó que las reacciones de amplificación se desarrollaran durante 30 ciclos a 94°C durante 15 s, 61°C durante 30 s y 72°C durante 30s.

El cruzamiento de la descendencia heterocigota F1 entre sí produjo una descendencia homocigota a una frecuencia que concuerda con un patrón de herencia mendeliana del transgén interrumpido, indicando que el *sesn2* no es necesario para el desarrollo. Los ratones mutantes se desarrollaron normalmente después del nacimiento y eran sumamente indistinguibles de sus hermanos de camada heterocigotos y de tipo silvestre.

La inserción de la trampa de genes en el 9° intrón del gen *sesn2* induce un transcrito de fusión en el que los exones cadena arriba de la inserción se cortan y empalman en fase de lectura respecto a βgeo. Debido a que la transcripción se termina en el sitio de poliadenilación de la trampa de genes, el transcrito de fusión procesado codifica una versión truncada de *sesn2* y el indicador βgeo (Figura 3). La Figura 4 muestra una expresión débil de esta proteína en un embrión heterocigoto temprano teñido con X-Gal.

Los transcritos de *sesn2* de tipo silvestre se perdieron completamente de pulmones de ratones W077E06 homocigotos, mientras que los pulmones heterocigotos expresaban aproximadamente el 50% de los niveles de tipo silvestre (Figura 5A). Además, en fibroblastos aislados de pulmón (MLF) y colon (CLF), que expresan ambos altos niveles de *sesn2* (Figura 5B), no se detectó proteína en las células de ratones W077E06 homocigotos, sugiriendo que la inserción de la trampa de genes había inducido una mutación nula (Figura 5B). De acuerdo con la débil expresión de β-galactosidasa en los embriones tempranos (Figura 4), los MLF mutantes expresaban sólo cantidades

vestigiales de la proteína de fusión *sesn2/geo*, insinuando que la proteína relativamente grande es inestable (Figura 5B). Dada su baja expresión, es poco probable que esta proteína tenga un efecto negativo dominante incluso si la proteína truncada conservase cierta función residual.

Ejemplo 2: Los alelos nulos de *sesn2* mejoran el enfisema pulmonar en ratones *Itbp4*^{-/-}.

5 Células ES 129/Sv (D3) con una inserción de vector de trampa de genes U3Cre (SEC ID N°: 16) en el 5° intrón del gen de *Itbp4* se inyectaron en blastocistos C57BL/6 como se ha descrito anteriormente (documento WO 03/015505, Thorey, I. S. y col. Mol Cell Biol 18, 3081-3088, 1998). Las quimeras macho resultantes se cruzaron con hembras C57BL/6 y la descendencia agutí se ensayó para determinar la transmisión del transgén por transferencia de material de la cola. Se escindió ADN de cola de ratón con BglII que no corta provirus. El ADN se fraccionó en geles de agarosa al 1%, se transfirió sobre filtros de nylon Hybond N (Amersham/Pharmacia, Piscataway, NJ) y se hibridó con una sonda de secuencia flanqueante de provirus marcada con ³²P. Los animales heterocigotos para la inserción de la trampa de genes se retrocruzaron con ratones C57BL/6 durante al menos seis generaciones antes de analizar los fenotipos en la descendencia heterocigota y homocigota. Para obtener cepas dobles mutantes, los ratones *Itbp4*^{+/-} heterocigotos se cruzaron con ratones *sesn2*^{-/-} homocigotos y la descendencia se genotipó por PCR de ADN de cola como se ha descrito en el Ejemplo 1, usando los cebadores específicos de alelo siguientes: alelo de tipo silvestre de *Itbp4* = 5'-CCAATCTTGCTTCTTTGCTGAGC-3' (SEC ID N°: 17) y 5'-GGC-TCATGCTTGAATGTTTCAG-3' (SEC ID N°: 18); trampa de genes de *Itbp4* (alelo mutante) = 5'-CCAATCTTGCTTCTTTGCTGAGC-3' (SEC ID N°: 19) y 5'-ATCATGCAAGCTGGTGG-CTG-3' (SEC ID N°: 20); alelo de tipo silvestre *sesn2* = 5'-CTACCCTGAGAAGACGACCCG-3' (SEC ID N°: 21) y 5'-GGACAAATCAAGTTACACAGAAAAAAGTC-3' (SEC ID N°: 22); trampa de genes de *sesn2* (alelo mutante) = 5'-CTACCCTGAGAAGACGACCCG-3' (SEC ID N°: 23) y 5'-CAGCCTTGAGCCTCTGGAGC-3' (SEC ID N°: 24).

La Figura 6B muestra un pulmón enfisematoso típico de un ratón *Itbp4*^{-/-} adulto (documento WO 03/015505). Muestra alvéolos masivamente dilatados rodeados por paredes de los septos delgadas, displásicas y frecuentemente rotas. El tejido conectivo lobular está significativamente reducido y los pulmones muestran áreas atelectásicas multifocales. De acuerdo con una recuperación parcial, los espacios alveolares en los hermanos de camada dobles mutantes *Itbp4*^{-/-} *sesn2*^{-/-} eran más numerosos, de un tamaño reducido y estaban separados por paredes más gruesas (Figura 6D).

Para detectar el grado de daño de los bronquiolos, conductos alveolares y alvéolos, los inventores visualizaron los árboles traqueobronquiales de estos animales por plastinación. La plastinación implica la instilación de silicona en las tráqueas del pulmón aislado. Puesto que los conductos alveolares impiden que la silicona entre en los sacos alveolares, la técnica proporciona una imagen tridimensional informativa del árbol traqueobronquial (Perry S. F., y col. Exp Lung Res. 26: 27-39, 2000). La Figura 7 (paneles izquierdos) muestra el árbol traqueobronquial de dos ratones de tipo silvestre de 5,5 meses de edad con ramificaciones hacia abajo hasta los bronquiolos terminales y los conductos alveolares. En hermanos de camada *Itbp4* mutantes, estas ramificaciones estaban casi completamente ocultas por espacios aéreos aumentados de tamaño rellenos con silicona, sugiriendo que los bronquiolos terminales y los conductos alveolares estaban aumentados de tamaño y con fugas (Figura 7, paneles del medio). Sin embargo, se observó una mejora espectacular en la arquitectura traqueobronquial en ratones *Itbp4*^{-/-} que llevaban dos alelos nulos *sesn2* (*Itbp4*^{-/-} *sesn2*^{-/-}) (Figura 7, paneles derechos). Al contrario que una arquitectura traqueobronquial casi invisible en ratones *Itbp4*^{-/-}, el árbol traqueobronquial de los dobles mutantes estaba de nuevo próximo a la normalidad, insinuando una regeneración de los bronquiolos terminales y de los conductos alveolares. Estas modificaciones eran mucho más espectaculares que los cambios paranquimales que presumiblemente reflejan una regeneración desigual de fibras de colágeno y elastina, que son los componentes principales de la MEC pulmonar (Suki B., y col. J Appl Physiol. 98: 1892-9, 2005). Aunque ambos forman redes de fibras densas por todo el pulmón, las fibras de elastina se distribuyen uniformemente, mientras que las fibras de colágeno tienden a condensarse alrededor de los bronquiolos terminales y de los conductos alveolares (Toshima M., y col. Arch Histol Cytol. 67: 31-40, 2004). Basándose en esto, los inventores especularon que la recuperación preferente del árbol traqueobronquial en los ratones *Itbp4*^{-/-} *sesn2*^{-/-} podía ser el resultado de un exceso de deposición de colágeno en la MEC pulmonar.

Para ensayar esto, Los inventores visualizaron la elastina y el colágeno en secciones de tejido pulmonar usando tinciones histoquímicas específicas. La Figura 8A muestra que la red de elastina de pulmones *Itbp4*^{-/-} y *Itbp4*^{-/-} *sesn2*^{-/-} aparecía fragmentada, discontinua y condensada en ambos. Por el contrario, la deposición de colágeno se aumentaba espectacularmente en los pulmones de dobles mutantes (Figura 8B). Puesto que el TGF-β es uno de los inductores de colágeno más potentes, la deposición excesiva de colágeno sugería una reactivación de la señalización de TGF-β en los pulmones *Itbp4*^{-/-} *sesn2*^{-/-}. Puesto que también se observó recuperación traqueobronquial y deposición aumentada de colágeno en ratones *Itbp4*^{-/-} heterocigotos para *sesn2* (*Itbp4*^{-/-} *sesn2*^{+/-}) (Figuras 9, 10), la mutación *sesn2* podría ser haploinsuficiente.

Ejemplo 3: Los alelos nulos de *sesn2* mejoran el prolapso rectal y los adenomas colorrectales en ratones *Itbp4*^{-/-}.

La Figura 13 muestra un adenoma colorrectal típico de ratón *Itbp4*^{-/-} (documento WO 03/015505 A3) de 3 meses de edad. Microscópicamente, la región mostraba focos de criptas aberrantes que contenían células epiteliales en regeneración y un número aumentado de células caliciformes. Aunque los hermanos de camada dobles mutantes *Itbp4*^{-/-} *sesn2*^{-/-} también mostraban adenomas, estos eran de un tamaño significativamente menor y contenían menos

células caliciformes (Figura 11), sugiriendo un rescate fenotípico parcial. Puesto que el fenotipo *ltbp4*^{-/-} está esencialmente causado por una activación de TGF-β defectuosa (Sternier-Kock A., y col. Genes Dev. 16: 2264-2273, 2002), los inventores ensayaron si el rescate parcial estaba asociado con una reactivación de la señalización de TGF-β. Con este fin, los inventores determinaron los niveles de smad2 fosforilado en secciones tisulares por inmunohistoquímica. De acuerdo con una activación de la señalización de TGF-β en ratones *ltbp4*^{-/-} *sesn2*^{-/-}, los niveles de p-smad2 eran muy elevados en comparación con los ratones simples mutantes *ltbp4*^{-/-}, que no tenían P-smad2 detectable en su colon (Figura 12).

Ejemplo 4: Los pulmones *sesn2*^{-/-} muestran una señalización de TGF-β aumentada.

La deposición de colágeno aumentada en el pulmón y los niveles de P-smad2 aumentados en el colon de ratones *ltbp4*^{-/-} *sesn2*^{-/-} sugerían que la ruta del TGF-β podría estar activada de forma similar en los ratones *sesn2*^{-/-} a pesar de su fenotipo sumamente normal. Para ensayar esto, los inventores visualizaron el P-smad2 en secciones tisulares de pulmón como se ha descrito anteriormente. En un experimento preliminar, los inventores encontraron que los niveles de P-smad2 en pulmones *sesn2*^{-/-} superaban significativamente los niveles de tipo silvestre, sugiriendo que la pérdida de sestrina 2 activa el TGF-β (Figura 13). Además, aunque no se podía detectar una deposición de colágeno aumentada mediante la tinción tricrómica de Mason (no se muestran los datos), los pulmones *sesn2*^{-/-} mostraban un tejido conectivo más abundante, espacios aéreos más pequeños y paredes intraalveolares más gruesas, concordando todo con una fibrosis inducida por TGF-β incipiente (Figura 14) (Sime P. J., y col. J Clin Invest. 100: 768-76, 1997; Lee M. S., y col. Am J Pathol. 147: 42-52, 1995; Sanderson N., y col. Proc Natl Acad Sci U S A. 92: 2572-6, 1995).

Ejemplo 5: Acumulación de peróxido aumentada en fibroblastos de pulmón de ratón (MLF) obtenidos de ratones *sesn2*^{-/-}.

Experimentos publicados recientemente han demostrado que la inhibición de la expresión de *sesn2* por ARNhc compromete la capacidad de la célula para procesar ROS, conduciendo a la acumulación de ROS y a estrés oxidativo (Budanov A. V., y col. Science 304: 596-600, 2004). En línea con esto, los inventores esperaban que las funciones antioxidantes estuvieran comprometidas de forma similar en células obtenidas de ratones *knock out* para *sesn2*. Para ensayar esto, los inventores cuantificaron los niveles de ROS inducidos por H₂O₂ y basales en MLF usando el procedimiento de fluorescencia de diclorodihidrofluoresceína (DCF). La Figura 15 muestra que los MLF *sesn2*^{-/-} se acumulaban significativamente más ROS que las células de tipo silvestre correspondientes, independientemente del pretratamiento con H₂O₂ 200 mM. Los resultados son equivalentes a los obtenidos en los experimentos de reducción de la expresión (*knock down*) con ARNhc y concuerdan con una pérdida de función de *sesn2* en los MLF mutantes.

Listado de Secuencias, Texto Libre

SEC ID Nº: 1-9	Cebador	
SEC ID Nº: 10	Elementos del plásmido pT β geo de vector de trampa de genes:	
	- Aceptor de corte y empalme En-2	2284-4163
	β Geo	4164-8053
	- SV40 pA	8054-8496
	- cadena principal del plásmido	8497-2283
SEC ID Nº: 11-15	Cebador	
SEC ID Nº: 16	Elementos del plásmido U3Cre de vector de trampa de genes:	
	- LTR 1-1475 y 3046-4520	
	- Cre 3-1090 y 3074-4133	
	- gag/env: 1475-3045	
SEC ID Nº: 17-24	Cebador	

LISTADO DE SECUENCIAS

5	<110> FrankGen Biotechnologie AG
	<120> Modelo animal para la selección y validación de agentes activos contra el enfisema pulmonar y el cáncer colorrectal
10	<130> 071673wo/JH
	<150> EP 06120714.8
	<151> 15-09-2006
15	<160> 24
	<170> PatentIn versión 3.3
	<210> 1
20	<211> 492
	<212> PRT
	<213> Mus musculus
	<400> 1
25	

ES 2 359 826 T3

Met	Arg	Leu	Ala	Ala	Ala	Ser	Asn	Glu	Ala	Tyr	Ala	Ala	Ser	Leu	Ala	1	5	10	15
Val	Ser	Glu	Leu	Leu	Ser	Cys	His	Gln	Cys	Gly	Gly	Asp	Arg	Gly	Gln	20	25	30	
Asp	Glu	Glu	Leu	Gly	Ile	Arg	Ile	Pro	Arg	Pro	Leu	Gly	His	Gly	Pro	35	40	45	
Ser	Arg	Phe	Ile	Pro	Glu	Lys	Glu	Met	Leu	Gln	Val	Gly	Ser	Glu	Asp	50	55	60	
Ala	Gln	Met	His	Ala	Leu	Phe	Ala	Asp	Ser	Phe	Ala	Ala	Leu	Gly	Arg	65	70	75	80
Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	Leu	Val	Met	Val	Phe	His	Pro	Gln	Tyr	Leu	Glu	85	90	95	
Ser	Phe	Leu	Lys	Thr	Gln	His	Tyr	Leu	Leu	Gln	Met	Asp	Gly	Pro	Leu	100	105	110	
Pro	Leu	His	Tyr	Arg	His	Tyr	Ile	Gly	Ile	Met	Ala	Ala	Ala	Arg	His	115	120	125	
Gln	Cys	Ser	Tyr	Leu	Val	Asn	Leu	His	Val	Ser	Asp	Phe	Leu	His	Val	130	135	140	
Gly	Gly	Asp	Pro	Lys	Trp	Leu	Asn	Gly	Leu	Glu	Asn	Ala	Pro	Gln	Lys	145	150	155	160

Leu Gln Asn Leu Gly Glu Leu Asn Lys Val Leu Ala His Arg Pro Trp
 165 170 175

Leu Ile Thr Lys Glu His Ile Glu Gly Leu Leu Lys Ala Glu Glu His
 180 185 190

Ser Trp Ser Leu Ala Glu Leu Val His Ala Val Val Leu Leu Thr His
 195 200 205

Tyr His Ser Leu Ala Ser Phe Thr Phe Gly Cys Gly Ile Ser Pro Glu
 210 215 220

Ile His Cys Asp Gly Gly His Thr Phe Arg Pro Pro Ser Val Ser Asn
 225 230 235 240

Tyr Cys Ile Cys Asp Ile Thr Asn Gly Asn His Ser Val Asp Glu Met
 245 250 255

Gln Val Asn Ser Ala Gly Asn Ala Ser Val Ser Asp Ser Phe Phe Glu
 260 265 270

Val Glu Ala Leu Met Glu Lys Met Arg Gln Leu Gln Glu Cys Arg Glu
 275 280 285

Glu Glu Glu Ala Ser Gln Glu Glu Met Ala Ser Arg Phe Glu Met Glu
 290 295 300

Lys Arg Glu Ser Met Phe Val Phe Ser Ser Asp Asp Asp Glu Val Thr
 305 310 315 320

Pro Ala Arg Asp Val Ser Arg His Phe Glu Asp Thr Ser Tyr Gly Tyr
 325 330 335

Lys Asp Phe Ser Arg His Gly Met His Val Pro Thr Phe Arg Val Gln
 340 345 350

Asp Tyr Cys Trp Glu Asp His Gly Tyr Ser Leu Val Asn Arg Leu Tyr
 355 360 365

Pro Asp Val Gly Gln Leu Ile Asp Glu Lys Phe His Ile Pro Tyr Asn
 370 375 380

Leu Thr Tyr Asn Thr Met Ala Met His Lys Asp Val Asp Thr Ser Met
 385 390 395 400

Leu Arg Arg Ala Ile Trp Asn Tyr Ile His Cys Met Phe Gly Ile Arg
 405 410 415

Tyr Asp Asp Tyr Asp Tyr Gly Glu Ile Asn Gln Leu Leu Asp Arg Ser
 420 425 430

Phe Lys Val Tyr Ile Lys Thr Val Val Cys Thr Pro Glu Lys Val Thr
 435 440 445

Lys Arg Met Tyr Asp Ser Phe Trp Arg Gln Phe Lys His Ser Glu Lys
 450 455 460

Val His Val Asn Leu Leu Leu Ile Glu Ala Arg Met Gln Ala Glu Leu
 465 470 475 480

Leu Tyr Ala Leu Arg Ala Ile Thr Arg Tyr Met Thr
 485 490

<210> 2
 <211> 492
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 2

Met Asn Arg Gly Gly Ser Ser Ala Ser Ala Ser Ala Asn Tyr Leu Leu
 1 5 10 15

Cys Thr Asn Cys Arg Lys Val Leu Arg Lys Asp Lys Arg Ile Arg Val
 20 25 30

Ser Gln Pro Leu Thr Arg Gly Pro Ser Ala Phe Ile Pro Glu Lys Glu
 35 40 45

Val Val Gln Ala Asn Thr Ala Asp Glu Arg Thr Asn Phe Leu Val Glu
 50 55 60

Glu Tyr Ser Thr Ser Gly Arg Leu Asp Asn Ile Thr Gln Val Met Ser
 65 70 75 80

Leu His Thr Gln Tyr Leu Glu Ser Phe Leu Arg Ser Gln Phe Tyr Met
 85 90 95

Leu Arg Met Asp Gly Pro Leu Pro Leu Pro Asp Arg His Tyr Ile Ala
 100 105 110

Ile Met Ala Ala Ala Arg His Gln Cys Ser Tyr Leu Ile Asn Met His
 115 120 125

Val Asp Glu Phe Leu Lys Thr Gly Gly Ile Ala Glu Trp Leu Asn Gly
 130 135 140

ES 2 359 826 T3

Leu Glu Tyr Val Pro Gln Arg Leu Arg Asn Leu Asn Glu Ile Asn Lys
 145 150 155 160
 Leu Leu Ala His Arg Pro Trp Leu Ile Thr Lys Glu His Ile Gln Lys
 165 170 175
 Leu Val Lys Thr Gly Glu Asn Asn Trp Ser Leu Pro Glu Leu Val His
 180 185 190
 Ala Val Val Leu Leu Ala His Tyr His Ala Leu Ala Ser Phe Val Phe
 195 200 205
 Gly Ser Gly Ile Asn Pro Glu Arg Asp Pro Gly Ile Ala Asn Gly Phe
 210 215 220
 Arg Leu Ile Ser Val Ser Ser Phe Cys Val Cys Asp Leu Ala Asn Asp
 225 230 235 240
 Asn Ser Ile Glu Asn Thr Ser Leu Ala Gly Ser Asn Phe Gly Ile Val
 245 250 255
 Asp Ser Leu Gly Glu Leu Glu Ala Leu Met Glu Arg Met Lys Arg Leu
 260 265 270
 Gln Glu Asp Arg Glu Asp Asp Glu Thr Thr Arg Glu Glu Met Thr Thr
 275 280 285
 Arg Phe Glu Lys Glu Lys Lys Glu Ser Leu Phe Val Val Pro Gly Glu
 290 295 300
 Thr Leu His Ala Phe Pro His Ser Asp Phe Glu Asp Asp Val Ile Val
 305 310 315 320
 Thr Ala Asp Val Ser Arg Tyr Ile Glu Asp Pro Ser Phe Gly Tyr Glu
 325 330 335
 Asp Phe Ala Arg Arg Gly Glu Glu His Leu Pro Thr Phe Arg Ala Gln
 340 345 350
 Asp Tyr Thr Trp Glu Asn His Gly Phe Ser Leu Val Asn Arg Leu Tyr
 355 360 365
 Ser Asp Ile Gly His Leu Leu Asp Glu Lys Phe Arg Met Val Tyr Asn
 370 375 380
 Leu Thr Tyr Asn Thr Met Ala Thr His Glu Asp Val Asp Thr Thr Thr

ES 2 359 826 T3

385		390		395		400									
Leu	Arg	Arg	Ala	Leu	Phe	Asn	Tyr	Val	His	Cys	Met	Phe	Gly	Ile	Arg
			405						410					415	
Tyr	Asp	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Gly	Glu	Val	Asn	Gln	Leu	Leu	Glu	Arg	Ser
			420					425					430		
Leu	Lys	Val	Tyr	Ile	Lys	Thr	Val	Thr	Cys	Tyr	Pro	Glu	Arg	Thr	Thr
		435					440					445			
Lys	Arg	Met	Tyr	Asp	Ser	Tyr	Trp	Arg	Gln	Phe	Thr	His	Ser	Glu	Lys
	450					455					460				
Val	His	Val	Asn	Leu	Leu	Leu	Met	Glu	Ala	Arg	Met	Gln	Ala	Glu	Leu
465				470						475					480
Leu	Tyr	Ala	Leu	Arg	Ala	Ile	Thr	Arg	His	Leu	Thr				
				485					490						

<210> 3
 <211> 480
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 3

5

ES 2 359 826 T3

Met	Ile	Val	Ala	Asp	Ser	Glu	Cys	His	Ser	Glu	Ile	Lys	Gly	Tyr	Leu
1				5					10					15	
Pro	Phe	Thr	Arg	Gly	Gly	Val	Ala	Gly	Pro	Glu	Thr	Arg	Glu	Glu	His
			20					25					30		
Arg	Glu	Gly	Gln	Ala	Arg	Arg	Gly	Ser	Arg	Gly	Pro	Ser	Ala	Phe	Ile
		35					40					45			
Pro	Val	Glu	Glu	Ile	Leu	Arg	Glu	Gly	Ala	Glu	Ser	Leu	Glu	Gln	His
	50					55					60				
Leu	Gly	Leu	Glu	Ala	Leu	Met	Ser	Ser	Gly	Arg	Val	Asp	Asn	Leu	Ala
65					70					75					80
Val	Val	Met	Gly	Leu	His	Pro	Asp	Tyr	Leu	Ser	Ser	Phe	Trp	Arg	Leu
				85					90					95	
His	Tyr	Leu	Leu	Leu	His	Thr	Asp	Gly	Pro	Leu	Ala	Ser	Ser	Trp	Arg
			100					105					110		
His	Tyr	Ile	Ala	Ile	Met	Ala	Ala	Ala	Arg	His	Gln	Cys	Ser	Tyr	Leu

			115				120					125					
Val	Gly 130	Ser	His	Met	Thr	Glu 135	Phe	Leu	Gln	Thr	Gly 140	Gly	Asp	Pro	Glu		
Trp 145	Leu	Leu	Gly	Leu	His 150	Arg	Ala	Pro	Glu	Lys 155	Leu	Arg	Lys	Leu	Ser 160		
Glu	Val	Asn	Lys	Leu 165	Leu	Ala	His	Arg	Pro 170	Trp	Leu	Ile	Thr	Lys 175	Glu		
His	Ile	Gln	Ala 180	Leu	Leu	Lys	Thr	Gly 185	Glu	His	Ser	Trp	Ser 190	Leu	Ala		
Glu	Leu	Ile 195	Gln	Ala	Leu	Val	Leu 200	Leu	Thr	His	Cys	His 205	Ser	Leu	Ala		
Ser	Phe 210	Val	Phe	Gly	Cys	Gly 215	Ile	Leu	Pro	Glu	Gly 220	Asp	Ala	Glu	Gly		
Ser 225	Pro	Ala	Ser	Gln	Ala 230	Pro	Ser	Pro	Pro	Ser 235	Glu	Gln	Gly	Thr	Pro 240		
Pro	Ser	Gly	Asp	Pro 245	Leu	Asn	Asn	Ser	Gly 250	Gly	Phe	Glu	Ala	Ala 255	Arg		
Asp	Val	Glu	Ala 260	Leu	Met	Glu	Arg	Met 265	Arg	Gln	Leu	Gln	Glu 270	Ser	Leu		
Leu	Arg	Asp 275	Glu	Gly	Ala	Ser	Gln 280	Glu	Glu	Met	Glu	Asn 285	Arg	Phe	Glu		
Leu 290	Glu	Lys	Ser	Glu	Ser	Leu 295	Leu	Val	Thr	Pro	Ser 300	Ala	Asp	Ile	Leu		
Glu 305	Pro	Ser	Pro	His	Pro 310	Asp	Ile	Leu	Cys	Phe 315	Val	Glu	Asp	Pro	Ala 320		
Phe	Gly	Tyr	Glu	Asp 325	Phe	Thr	Arg	Arg	Gly 330	Thr	Gln	Ala	Pro	Pro 335	Thr		
Phe	Arg	Ala	Gln 340	Asp	Tyr	Thr	Trp	Glu 345	Asp	His	Gly	Tyr	Ser 350	Leu	Ile		
Gln	Arg	Leu 355	Tyr	Pro	Glu	Gly	Gly 360	Gln	Leu	Leu	Asp	Glu 365	Lys	Phe	Gln		

ES 2 359 826 T3

Val Ala Cys Ser Leu Thr Tyr Asn Thr Ile Ala Met His Ser Gly Val
370 375 380

Asp Thr Ser Met Leu Arg Arg Ala Ile Trp Asn Tyr Ile His Cys Val
385 390 395 400

Phe Gly Ile Arg Tyr Asp Asp Tyr Asp Tyr Gly Glu Val Asn Gln Leu
405 410 415

Leu Glu Arg Asn Leu Lys Ile Tyr Ile Lys Thr Val Ala Cys Tyr Pro
420 425 430

Glu Lys Thr Thr Arg Arg Met Tyr Asn Leu Phe Trp Arg His Phe Arg
435 440 445

His Ser Glu Lys Val His Val Asn Leu Leu Leu Leu Glu Ala Arg Met
450 455 460

Gln Ala Ala Leu Leu Tyr Ala Leu Arg Ala Ile Thr Arg Tyr Met Thr
465 470 475 480

<210> 4
<211> 48
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

<220>
<221> misc feature
<222> (36)..(47)
<223> n = inosina

<400> 4
ctactactac taggccacgc gtcgactagt acgggnnggg nngggngg 48

<210> 5
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

<400> 5
gccagggttt tccagtcac ga 22

<210> 6
<211> 32
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> cebador

<400> 6
ctactactac taggccacgc gtcgactagt ac 32

5 <210> 7
<211> 38
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> cebador

<400> 7
tgtaaaacga cggccagtgt gaaggctgtg cgaggccg 38

15 <210> 8
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> cebador

<400> 8
cctggaacgg aacctcaaaa t 21

25 <210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> cebador

<400> 9
gggcttcaag gagcagcaag 20

35 <210> 10
<211> 8950
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> vector de trampa génica pTbetageo

45 <400> 10
tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt 60
tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt cagaggtggc 120
gaaacccgac aggactataa agataccagg cgtttccccc tggaagctcc ctcggtgcgct 180
ctcctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct tcgggaagcg 240
tggcgctttc tcatagctca cgctgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgctcca 300

agctgggctg	tgtgcacgaa	cccccgctc	agcccgaccg	ctgcgcctta	tccggttaact	360
atcgctcttg	gtccaacccg	gtaagacacg	acttatcgcc	actggcagca	gccactggta	420
acaggattag	cagagcgagg	tatgtaggcg	gtgctacaga	gttcttgaag	tgggtggccta	480
actacggcta	cactagaaga	acagtatttg	gtatctgcgc	tctgctgaag	ccagttacct	540
tcggaaaaag	agttggtagc	tcttgatccg	gcaaacaaac	caccgctggg	agcgggtggtt	600
tttttgtttg	caagcagcag	attacgcgca	gaaaaaaagg	atctcaagaa	gaccccttga	660
tcttttctac	ggggtctgac	gctcagtggg	acgaaaactc	acgttaaggg	attttgggtca	720
tgagattatc	aaaaaggatc	ttcacctaga	tcctttttaa	ttaaaaatga	agtttttaaat	780
caatctaaag	tatatatgag	taaacttggg	ctgacagtta	ccaatgctta	atcagtggagg	840
cacctatctc	agcgatctgt	ctatttcgtt	catccatagt	tgccctgactc	cccgtcgtgt	900
agataactac	gatacgggag	ggcttaccat	ctggccccag	tgctgcaatg	ataccgagag	960
acccacgctc	accgggtcca	gatttatcag	caataaacca	gccagccgga	agggccgagc	1020
gcagaagtgg	tcctgcaact	ttatccgcct	ccatccagtc	tattaattgt	tgccgggaag	1080
ctagagtaag	tagttcgcca	gttaatagtt	tgcgcaacgt	tgttgccatt	gctacaggca	1140
tcgtgggtgc	acgctcgctg	tttggtatgg	cttcattcag	ctccggttcc	caacgatcaa	1200
ggcgagttac	atgatcccc	atgttgtgca	aaaaagcggg	tagctccttc	ggtcctccga	1260
tcgttgtcag	aagtaagttg	gccgcagtg	tatcactcat	ggttatggca	gcactgcata	1320
attctcttac	tgtcatgcca	tcgtaagat	gcttttctgt	gactgggtgag	tactcaacca	1380
agtcattctg	agaatagtgt	atgcggcgac	cgagttgctc	ttgcccggcg	tcaatacggg	1440
ataataccgc	gccacatagc	agaacttta	aagtgtcat	cattggaaaa	cgttcttcgg	1500
ggcgaaaaact	ctcaaggatc	ttaccgctgt	tgagatccag	ttcgatgtaa	cccaactcgtg	1560
cacccaactg	atcttcagca	tcttttactt	tcaccagcgt	ttctgggtga	gcaaaaacag	1620
gaaggcaaaa	tgccgcaaaa	aagggaataa	gggcgacacg	gaaatgttga	atactcatac	1680
tcttcctttt	tcaatattat	tgaagcattt	atcagggtta	ttgtctcatg	agcggataca	1740
tatttgaaatg	tatttagaaa	ataaaacaaa	taggggttcc	gcgcacattt	ccccgaaaag	1800
tgccacctga	cgtctaagaa	accattatta	tcatgacatt	aacctataaa	aataggcgta	1860
tcacgaggcc	cttctgtctc	gcgcgtttcg	gtgatgacgg	tgaaaacctc	tgacacatgc	1920
agctcccggg	gacggtcaca	gcttgtctgt	aagcggatgc	cgggagcaga	caagcccgtc	1980
agggcgcgtc	agcgggtggt	ggcgggtgtc	ggggctggct	taactatgcg	gcatcagagc	2040
agattgtact	gagagtgcac	catatgcggg	gtgaaatacc	gcacagatgc	gtaaggagaa	2100
aataccgcat	caggcgccat	tcgccattca	ggctgcgcaa	ctgttgggaa	ggcgcatcgg	2160
tgccgggcctc	ttcgctatta	cgccagctgg	cgaaaggggg	atgtgctgca	aggcgattaa	2220

gttgggtaac gccagggttt tcccagtcac gacgttgtaa aacgacggcc agtgccaagc	2280
ttggaattca tgggaagagg aaccgaaagt atgtttttca gatgttcttt ctcaaaaata	2340
ggagtttgcg gaggttgag tgtgtgtgtg aggacacgaa cccaggggtg gaggagactg	2400
gaggacagag ccctctttcc caggagaggga aggaggagag tttgagatcc gctccggaag	2460
tcggggttca ggtttgagca ggccaggcct ctcccgtggt ctgcccctct tgtcctagaa	2520
gcctcactgg ccaggtgtaa gccaggtcgt gggtgccgag ccctgtctcc tcctcctcag	2580
catggatgtg aagaggactg tatggcgtgc ggggtgtgtg gaccgtgggt aacttaaaa	2640
caccgggttt tgatctgca ctgtcccga tgtcctctgg tgtcaaaga cccttttggg	2700
tttgcccttt ggtaagagcg ccgggatcta ctgtctgga ggccaggag tcctcagccg	2760
aggcttgccg ccctgactg cactgcactg agtagtgat gggagagtct ggtaccgcac	2820
tgccggtttc ctccaccatc ccgcagcgc agggcagtgc attccgtcct ggctgcgaag	2880
gggatggtc gggccttctc cagcctcttc cgcttctagc ggaaggggccc ttgatggaag	2940
ggcccgcatg tctcaaagt tgattcatgc ttcttgaca gagaaagacc agaaagaagg	3000
tctcaagttt tagccggtag ccggtatggc ctttctgca cggcaccata tgaaccttgt	3060
gaccctgaca aagagacccc tctaaccxaa gaccctacc acttaccctt tccctttgaa	3120
ggctttccca caccaccctc cacacttgcc ccaaacactg ccaactatgt aggaggaagg	3180
ggttgggact aacagaagaa ccggttggtg ggaagctgtt gggaggggtca ctttatgttc	3240
ttgccaagg tcagttgggt ggctgcttc tgatgaggtg gtccaagggt ctggggtaga	3300
aggtgagagg gacaggccac caaggtcagc cccccccccc tatcccatag gagccaggtc	3360
cctctcctgg acaggaagac tgaaggggag atgccagaga ctcagtgaag cctgggggtac	3420
cctattggag tccttcaagg aaacaaactt ggctcacca ggctcagcc ttggctcctc	3480
ctgggaactc tactgccctt gggatcccct tgtagttgtg ggttacatag gaagggggac	3540
gggattcccc ttgactggct agcctactct tttcttcagt cttctccatc tcctctcacc	3600
tgtctctga ccctttccct aggatagact tggaaaaaga taaggggaga aaacaaatgc	3660
aaacgaggcc agaaagattt tggctgggca ttccttcgc tagcttttat tgggatcccc	3720
tagtttgtga taggcctttt agctacatct gccaatccat ctcatthttca cacacacaca	3780
caccactttc cttctggtca gtgggcacat gtccagcctc aagtttatat caccaccccc	3840
aatgccaac acttgatatg ccttgggcgg gtcaccccc cccccacccc cagtatctgc	3900
aacctcaagc tagcttgggt gcgttggtt tggataagta gctagactcc agcaaccagt	3960
aacctctgcc cttctcctc catgacaacc aggtcccagg tcccgaaaac caaagaagaa	4020
gaaccctaac aaagaggaca agcggcctcg cacagccttc actgctgagc agctccagag	4080

gctcaaggct gagtttcaga ccaacaggta cctgacagag cagcggcgcc agagtctggc 4140
acaggagctc ggtacccgga agatctggac tctagaggat cccgtcgttt tacaacgtcg 4200
tgactgggaa aaccctggcg ttacccaact taatcgccct gcagcacatc cccctttcgc 4260
cagctggcgt aatagcgaag aggccgcac cgatcgccct tcccaacagt tgcgcagcct 4320
gaatggcgaa tggcgctttg cctggtttcc ggcaccagaa gcggtgccgg aaagctggct 4380
ggagtgcgat ctctctgagg ccgatactgt cgtcgtcccc tcaaactggc agatgcacgg 4440
ttacgatgcg cccatctaca ccaacgtgac ctatcccatt acggtcaatc cgccgtttgt 4500
tcccacggag aatccgcagg gttgttactc gctcacattt aatgttgatg aaagctggct 4560
acaggaaggc cagacgcgaa ttatttttga tggcgtaac tcggcgtttc atctgtggtg 4620
caacggggcg tgggtcgggtt acggccagga cagtcgtttg ccgtctgaat ttgacctgag 4680
cgcattttta cgcgcgggag aaaaccgcct cgcggtgatg gtgctgcgct ggagtgcagg 4740
cagttatctg gaagatcagg atatgtggcg gatgagcggc attttccgtg acgtctcggt 4800
gctgcataaa ccgactacac aaatcagcga tttccatggt gccactcgct ttaatgatga 4860
tttcagccgc gctgtactgg aggctgaagt tcagatgtgc ggcgagttgc gtgactacct 4920
acgggtaaca gtttctttat ggcaggggtga aacgcaggtc gccagcggca ccgcgccttt 4980
cggcggtgaa attatcgatg agcgtggtgg ttatgccgat cgcgtcacac tacgtctgaa 5040
cgtcgaaaac ccgaaactgt ggagcgccga aatcccgaat ctctatcgtg cgggtggtga 5100
actgcacacc gccgacggca cgctgattga agcagaagcc tgcgatgtcg gtttccgcga 5160
ggtgcggatt gaaaatggtc tgctgctgct gaacggcaag ccgttgctga ttcgaggcgt 5220
taaccgtcac gagcatcatc ctctgcatgg tcaggtcatg gatgagcaga cgatggtgca 5280
ggatatcctg ctgatgaagc agaacaactt taacgccgtg cgctgttcgc attatccgaa 5340
ccatccgctg tggtagacgc tgtgcgaccg ctacggcctg tatgtggtgg atgaagccaa 5400
tattgaaacc cacggcatgg tgccaatgaa tcgtctgacc gatgatccgc gctggctacc 5460
ggcgatgagc gaacgcgtaa cgcgaaatgg gcagcgcgat cgtaatcacc cgagtgtgat 5520
catctggtcg ctggggaatg aatcaggcca cggcgctaata cagcgcgc tgtatcgctg 5580
gatcaaatct gtcgatcctt cccgcccgtt gcagtatgaa ggcggcggag ccgacaccac 5640
ggccaccgat attatttgcc cgatgtacgc gcgcgtggat gaagaccagc ccttcccggc 5700
tgtgccgaaa tgggtccatca aaaaatggct ttcgctacct ggagagacgc gcccgctgat 5760
cctttgcgaa tacgcccacg cgatgggtaa cagtcttggc ggtttcgcta aatactggca 5820
ggcgtttcgt cagtatcccc gtttacaggg cggcttcgtc tgggactggg tggatcagtc 5880
gctgattaaa tatgatgaaa acggcaaccc gtggtcggct tacggcgggtg attttgcgca 5940
tacgccgaac gatcgccagt tctgtatgaa cggctctggtc tttgccgacc gcacgccgca 6000

tccagcgctg acggaagcaa aacaccagca gcagtttttc cagttccggtt tatccgggca	6060
aaccatcgaa gtgaccagcg aatacctggt cgcgcatagc gataacgagc tcctgcactg	6120
gatggtggcg ctggatggta agccgctggc aagcggtgaa gtgcctctgg atgtcgctcc	6180
acaaggtaaa cagttgattg aactgcctga actaccgcag ccggagagcg ccgggcaact	6240
ctggctcaca gtacgcgtag tgcaaccgaa cgcgaccgca tggtcagaag ccgggcacat	6300
cagcgctggt cagcagtggt gtctggcgga aaacctcagt gtgacgctcc ccgccgctc	6360
ccacgccatc ccgcatctga ccaccagcga aatggatttt tgcacgagc tgggtaataa	6420
gcgttggaac tttaaccgcc agtcaggctt tctttcacag atgtggattg gcgataaaaa	6480
acaactgctg acgccgctgc gcgatcagtt caccgcgtgca ccgctggata acgacattgg	6540
cgtaagtga ggcacccgca ttgaccctaa cgcctgggtc gaacgctgga agggcgcggg	6600
ccattaccag gccgaagcag cgttggttga gtgcacggca gatacacttg ctgatgcggt	6660
gctgattacg accgctcacg cgtggcagca tcaggggaaa accttattta tcagccggaa	6720
aacctaccgg attgatggta gtgggtcaaat ggcgattacc gttgatgttg aagtggcgag	6780
cgataaccg catccggcgc ggattggcct gaactgccag ctggcgagc tagcagagcg	6840
ggtaaaactg ctcggttag ggccgcaaga aaactatccc gaccgcctta ctgccgctg	6900
ttttgaccgc tgggatctgc cattgtcaga catgtatacc ccgtacgtct tcccagcgca	6960
aaacggtctg cgctgcggga cgcgcgaatt gaattatggc ccacaccagt ggcgcggcga	7020
cttccagttc aacatcagcc gctacagtca acagcaactg atggaaacca gccatcgcca	7080
tctgctgcac gcggaagaag gcacatggct gaatatcgac ggtttccata tggggattgg	7140
tggcgacgac tcctggagcc cgtcagtatc ggcggaattc cagctgagcg ccggtcgcta	7200
ccattaccag ttggtctggt gtcaggggat ccccgggct gcagccaata tgggatcggc	7260
cattgaacaa gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga ggctattcgg	7320
ctatgactgg gcacaacaga caatcggctg ctctgatgcc gccgtgttcc ggctgtcagc	7380
gcaggggcgc ccggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca	7440
ggacgaggca gcgcggctat cgtggctggc cacgacgggc gttccttgct cagctgtgct	7500
cgacgttgct actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc cggggcagga	7560
tctcctgtca tctcaccttg ctctgccga gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg	7620
gcggctgcat acgcttgatc cggctacctg cccattcgac caccaagcga aacatcgcat	7680
cgagcgagca cgtactcgga tggaagccgg tcttgtcgat caggatgatc tggacgaaga	7740
gcatcagggg ctcgccag ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgcgca tgcccagcg	7800
cgaggatctc gtcgtgacct atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg tggaatatgg	7860

ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat 7920
 agcgttggt acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg accgcttcct 7980
 cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgattc gcagcgcac gccttctatc gccttcttga 8040
 cgagttcttc tgagcgggac tctgggggtc gaaatgaccg accaagcgac gccaacctg 8100
 ccatcacgag atttcgattc caccgcccgc ttctatgaaa ggttgggctt cggaatcggt 8160
 ttccgggacg ccggctggat gatcctccag cgcggggac tcatgctgga gttcttcgcc 8220
 cccccccgg atctaagctc tagataagta atgatcataa tcagccatat cacatctgta 8280
 gaggttttac ttgctttaa aaacctcca cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg 8340
 aatgcaattg ttgttgtaa cttgtttatt gcagcttata atggttacia ataaagcaat 8400
 agcatcacia atttcacaaa taaagcattt ttttactgc attctagttg tggtttgtcc 8460
 aaactcatca atgtatctta tcatgtctgg atccgggggt accgagctcg aattcgtaat 8520
 catgtcatag ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg 8580
 agccggaagc ataaagtga aagcctgggg tgcctaata gtgagctaac tcacattaat 8640
 tgcgttgccg tcaactgccc ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg 8700
 aatcgcccaa cgcgcgggga gagcggttt gcgtattggg cgctcttcg cttcctcgct 8760
 cactgactcg ctgcgctcg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc 8820
 ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg 8880
 ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg 8940
 cccccctgac 8950

5 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 11
 cagccttgag cctctggagc 20

15 <210> 12
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 12
 ctaccctgag aagacgaccc g 21

25 <210> 13
 <211> 21
 <212> ADN

	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
5	<400> 13		
	ctaccctgag aagacgaccc g	21	
10	<210> 14		
	<211> 30		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 14		
	ggacaaatca aggttacaca gaaaaaagtc	30	
20	<210> 15		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
25	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 15		
	cagccttgag cctctggagc	20	
30	<210> 16		
	<211> 4520		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
35	<220>		
	<223> vector de trampa génica U3Cre		
40	<400> 16		
	aatgaaagac cccacctgta ggtttggcaa gctagcatgc ccaagaagaa gaggaaggtg	60	
	tccaattttac tgaccgtaca ccaaaatttg cctgcattac cggtcgatgc aacgagtgat	120	
	gaggttcgca agaacctgat ggacatgttc agggatcgcc aggcgttttc tgagcatacc	180	
	tggaaaaatgc ttctgtccgt ttgccggtcg tgggcggcat ggtgcaagtt gaataaccgg	240	
	aaatgggtttc cgcgagaacc tgaagatggt cgcgattatc ttctatatct tcaggcgcgc	300	
	ggtctggcag taaaaactat ccagcaacat ttgggccagc taaacatgct tcatcgtcgg	360	
	tccgggctgc caccaccaag tgacagcaat gctgtttcac tggttatgcg gcggatccga	420	
	aaagaaaacg ttgatgccgg tgaacgtgca aaacaggctc tagcgttcga acgcactgat	480	
	ttcgaccagg ttcgttcact catggaaaat agcgatcgct gccaggatat acgtaatctg	540	

gcatttctgg ggattgctta taacaccctg ttacgtatag ccgaaattgc caggatcagg	600
gttaaagata tctcacgtac tgacgggtgg agaattgttaa tccatattgg cagaacgaaa	660
acgctgggta gcaccgcagg tgtagagaag gcacttagcc tgggggtaac taaactggtc	720
gagcgatgga tttccgtctc tgggtgtagct gatgatccga ataactacct gttttgccgg	780
gtcagaaaaa atgggtgttg cgcgccatct gccaccagcc agctatcaac tcgcgccctg	840
gaagggattt ttgaagcaac tcatcgattg atttacggcg ctaaggatga ctctgggtcag	900
agatacctgg cctgggtctgg acacagtgcc cgtgtcggag ccgcgcgaga tatggcccgc	960
gctggagttt caataccgga gatcatgcaa gctgggtggct ggaccaatgt aaatattgtc	1020
atgaactata tccgtaacct ggatagttaa acagggggcaa tgggtgcgcct gctggaagat	1080
ggcgattagg ctagcttaag taacgccatt ttgcaaggca tggaaaaata cataactgag	1140
aatagagaag ttcagatcaa ggtcaggaac agatggaaca gctagagaac catcagatgt	1200
ttccagggtg cccaaggac ctgaaatgac cctgtgcctt atttgaacta accaatcagt	1260
tcgcttctcg cttctgttcg cgcgcttctg ctccccgagc tcaataaaag agcccacaac	1320
ccctcactcg gggcgccagt cctccgattg actgagtcgc ccgggtaccc gtgtatccaa	1380
taaaccctct tgcagttgca tccgacttgt ggtctcgctg ttccttggga gggctctctc	1440
tgagtgattg actaccgctc agcgggggtc tttcatttgg gggctcgtcc gggatcggga	1500
gacccctgcc cagggaccac cgaccacca ccgggaggta agctggccag caacttatct	1560
gtgtctgtcc gattgtctag tgtctatgac tgattttatg cgctgcgtc ggtactagtt	1620
agctaactag ctctgtatct ggcggacccg tgggtggaact gacgagttcg gaacaccgg	1680
ccgcaaccct gggagacgtc ccagggactt cgggggccgt ttttgtggcc cgacctgagt	1740
ccaaaaatcc cgatcgtttt ggactctttg gtgcaccccc ctagaggag ggatatgtgg	1800
ttctggtagg agacgagaac ctaaaacagt tccgcctcc gtctgaattt ttgctttcgg	1860
tttgggaccg aagccgcgcc gcgcgtcttg tctgctgcag catcgttctg tgtgtctct	1920
gtctgactgt gtttctgtat ttgtctgaga atatgggcca gactgttacc actcccttaa	1980
gtttgacctt aggtcactgg aaagatgtcg agcggatcgc tcacaaccag tcggtagatg	2040
tcaagaagag acgttgggtt accttctgct ctgcagaatg gccaaccttt aacgtcggat	2100
ggccgcgaga cggcaccttt aaccgagacc tcatcaccca ggttaagatc aaggtctttt	2160
cacctggccc gcatggacac ccagaccagg tcccctacat cgtgacctgg gaagccttgg	2220
cttttgaccc cctccctgg gtcaagccct ttgtacaccc taagcctccg cctcctcttc	2280
ctccatccgc cccgtctctc ccccttgaac ctctcgttc gaccccgct cgatcctccc	2340
tttatccagc cctcactcct tctctaggcg ccaaacctaa acctcaagtt ctttctgaca	2400
gtggggggcc gctcatcgac ctacttacag aagaccccc gccttatagg gacccaagac	2460

caccccccttc	cgacagggac	ggaaatggtg	gagaagcgcac	ccctgcggga	gaggcaccgg	2520
accctcccc	aattgcatct	cgcctacgtg	ggagacggga	gccccctgtg	gccgactcca	2580
ctacctcgca	ggcattcccc	ctccgcgcag	gaggaaacgg	acagcttcaa	tactggccgt	2640
tctcctcttc	tgacctttac	aactggaaaa	ataataaccc	ttctttttct	gaagatccag	2700
gtaaaactgac	agctctgata	gagtctgttc	tcatacccca	tcagcccacc	tgggacgact	2760
gtcagcagct	gttggggact	ctgctgaccg	gagaagaaaa	acaacgggtg	ctcttagagg	2820
ctagaaaggc	ggtgcggggc	gatgatgggc	gccccactca	actgcccaat	gaagtccgatg	2880
ccgcttttcc	cctcgaggga	tccatcgtag	tccaatttgt	taaagacagg	atatcagtgg	2940
tccaggctct	agttttgact	caacaatatc	accagctgaa	gcctatagag	tacgagccat	3000
agataaaata	aaagatttta	tttagtctcc	agaaaaagg	gggaatgaaa	gacccacct	3060
gtaggtttgg	caagctagca	tgcccaagaa	gaagaggaag	gtgtccaatt	tactgaccgt	3120
acaccaaagt	ttgcctgcat	taccggtcga	tgcaacgagt	gatgagggtc	gcaagaacct	3180
gatggacatg	ttcagggtac	gccaggcggt	ttctgagcat	acctggaaaa	tgcttctgtc	3240
cgtttgccgg	tcgtgggagg	catggtgcaa	gttgaataac	cggaaatggt	ttccgcgaga	3300
acctgaagat	gttcgcgatt	atcttctata	tcttcaggcg	cgcggtctgg	cagtaaaaac	3360
tatccagcaa	catttgggcc	agctaaacat	gcttcacgtg	cggtcggggc	tgccacgacc	3420
aagtgcagc	aatgctgttt	cactggttat	gcggcggtac	cgaaaagaaa	acgttgatgc	3480
cgggtgaacgt	gcaaaacagg	ctctagcggt	cgaacgcact	gatttcgacc	aggttcgttc	3540
actcatggaa	aatagcgatc	gctgccagga	tatacgtaat	ctggcatttc	tggggattgc	3600
ttataacacc	ctgttacgta	tagccgaagt	tgccaggatc	agggttaaag	atatctcacg	3660
tactgacggt	gggagaatgt	taatccatat	tggcagaacg	aaaacgctgg	ttagcaccgc	3720
aggtgtagag	aaggcactta	gcctgggggt	aactaaactg	gtcgcgcatg	ggatttccgt	3780
ctctggtgta	gctgatgata	cgaataacta	cctgttttgc	cgggtcagaa	aaaatggtgt	3840
tgccgcgcca	tctgccacca	gccagctatc	aactcgcgcc	ctggaaggga	tttttgaagc	3900
aactcatcga	ttgatttacg	gcgctaagga	tgactctggt	cagagatacc	tggcctggtc	3960
tggaacacgt	gcccgtgtcg	gagccgcgcg	agatatggcc	cgcgctggag	tttcaatacc	4020
ggagatcatg	caagctggtg	gctggaccaa	tgtaaatatt	gtcatgaact	atatccgtaa	4080
cctggatagt	gaaacagggg	caatggtgcg	cctgctggaa	gatggcgatt	aggctagctt	4140
aagtaacgcc	attttgcaag	gcatggaaaa	atacataact	gagaatagag	aagttcagat	4200
caaggtcagg	aacagatgga	acagctagag	aaccatcaga	tgtttccagg	gtgccccaa	4260
gacctgaaat	gacctgtgac	cttatttgaa	ctaaccaatc	agttcgcttc	tcgcttctgt	4320

tcgcgcgctt ctgctccccg agctcaataa aagagcccac aaccctcac tcggggcgcc 4380
 agtcctccga ttgactgagt cgcccggtta cccgtgtatc caataaaccc tcttgagtt 4440
 gcatccgact tgtggtctcg ctgttccttg ggagggtctc ctctgagtga ttgactaccc 4500
 gtcagcgggg gtctttcatt 4520

5 <210> 17
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 17
 ccaatctgc ttcttgctg agc 23

15 <210> 18
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 18
 ggctcatgct tgaatgttc ag 22

25 <210> 19
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> cebador

<400> 19
 ccaatctgc ttcttgctg agc 23

35 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> cebador

<400> 20
 atcatgcaag ctggtggctg 20

45 <210> 21
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> cebador

55 <400> 21
 ctaccctgag aagacgaccc g 21

	<210> 22	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 22	
10	ggacaaatca aggttacaca gaaaaaagtc	30
	<210> 23	
	<211> 21	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
20	<400> 23	
	ctaccctgag aagacgaccc g	21
	<210> 24	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
30	<400> 24	
	cagccttgag cctctggagc	20

REIVINDICACIONES

1. Un modelo animal de roedor que no expresa una o más sestrinas funcionales o que expresa niveles de traducción reducidos al menos el 50% de una o más sestrinas, y que no expresa proteína de unión al factor de crecimiento transformante β latente 4 (ltbp4) o que expresa niveles de traducción reducidos al menos el 50% de ltbp4.
- 5 2. El modelo animal de roedor de la reivindicación 1, en el que
 - (i) el genoma del roedor comprende una interrupción homocigota o heterocigota de un gen de sestrina, seleccionándose preferentemente el gen de sestrina interrumpido de sestrina 1, sestrina 2 y sestrina 3, y siendo más preferentemente sestrina 2; y/o
 - (ii) el genoma del roedor comprende una interrupción homocigota o heterocigota del gen de ltbp4.
- 10 3. El modelo animal de roedor de la reivindicación 2, en el que la interrupción se genera por una mutación, y preferentemente dicha mutación
 - (i) es una mutación por inserción, delección o sustitución; y/o
 - (ii) se genera por direccionamiento génico, atrapamiento génico o mutagénesis química; y/o
 - (iii) se ha producido en un exón, intrón, región reguladora o sitio de corte y empalme de los genes de sestrina y ltbp4; y/o
 - (iv) da origen a la expresión de un gen indicador; y/o
 - (v) se ha producido en el 9º intrón del gen de sestrina 2; y/o
 - (vi) se ha producido en el 5º intrón del gen de ltbp4.
- 15 4. El modelo de animal roedor de la reivindicación 2 ó 3, en el que
 - (i) el gen de sestrina 2 se interrumpe en el 9º intrón por inserción de un vector de trampa de genes, preferentemente pT1bgeo (SEC ID N°: 10); y/o
 - (ii) el gen de ltbp4 se interrumpe en el 5º intrón por inserción de un vector de trampa de genes, preferentemente U3Cre (SEC ID N°: 16).
- 20 5. El modelo animal de roedor de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que
 - (i) dicho roedor es un ratón o rata; y/o
 - (ii) dicho roedor muestra enfisema pulmonar y cáncer, preferentemente el cáncer es un cáncer de colon.
- 25 6. Un modelo animal de roedor que no expresa una o más sestrinas funcionales o que expresa niveles de traducción reducidos al menos el 50% de una o más sestrinas, siendo preferentemente dicho modelo animal de roedor como se define en las reivindicaciones 1 a 5.
- 30 7. Un cultivo celular o tisular aislado de los modelos animales de roedor de las reivindicaciones 1 a 6, en el que los niveles de expresión en la célula o en las células del tejido, de las proteínas sestrina y ltbp4 son como se define en las reivindicaciones 1 a 6.
8. El cultivo celular o tisular de la reivindicación 7, en el que el cultivo celular o tisular es de pulmón o colon.
- 35 9. Un procedimiento para preparar el modelo animal de roedor de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende interrumpir el gen de sestrina y/o ltbp4 en una célula germinal de un roedor de partida.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la célula germinal es una célula ES.
11. Un procedimiento para seleccionar un agente para tratar un síntoma que aparece en el modelo animal de roedor de la reivindicación 1, que comprende:
 - (i) aplicar uno o más agentes a ensayar a dicho modelo animal de roedor,
 - (ii) determinar si uno o más síntomas que aparecen en dicho modelo animal de roedor han cambiado como resultado de la aplicación de dicho agente o agentes.
- 40 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el síntoma se selecciona de un grupo que consiste en cáncer y enfisema pulmonar.
13. Un procedimiento de selección de un agente que interfiere con la producción de ROS y la señalización de TGF- β , que comprende:
 - (i) aplicar uno o más agentes a ensayar al cultivo celular o tisular de la reivindicación 7,
 - (ii) determinar si los niveles de ROS celulares y la señalización de TGF- β han cambiado como resultado de la aplicación de dicho agente o agentes.
- 45 14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que el cultivo celular o tisular es de pulmón o colon.

15. Un procedimiento para analizar si el cáncer y/o enfisema pulmonar está causado por una expresión proteica o génica de Itbp4 y sestrina o un nivel de expresión diferencial o por un defecto en el gen de Itbp4 y sestrina, que comprende:

- 5 (i) caracterizar la expresión proteica o génica de Itbp4 y sestrina o el nivel de expresión o el estado alélico del gen de Itbp4 y sestrina de un individuo que tiene cáncer o enfisema pulmonar,
- (ii) caracterizar la expresión proteica o génica de Itbp4 y sestrina o el nivel de expresión o el estado alélico del gen de Itbp4 y sestrina de un individuo de control, indicando una diferencia en la expresión proteica o génica de Itbp4 y sestrina o el nivel de expresión o el estado alélico del gen de Itbp4 y sestrina que el cáncer y/o el enfisema pulmonar y/o la cardiomiopatía está relacionada con una expresión proteica o génica de Itbp4 y sestrina o un nivel de expresión diferencial o por un defecto en los genes de Itbp4 y sestrina.

16. El procedimiento de la reivindicación 15, en el que

- (i) la expresión de Itbp4 y sestrina o el nivel de expresión se detecta por RT-PCR, análisis de Northern, análisis de micromatrices o anticuerpos dirigidos contra las proteínas Itbp4 y sestrina; y/o
- 15 (ii) la expresión génica de Itbp4 y sestrina o el nivel de expresión se detecta por RT-PCR, análisis de Northern, análisis de micromatrices o anticuerpos dirigidos contra las proteínas Itbp4 y sestrina; y/o
- (iii) el estado alélico del gen de Itbp4 y sestrina se detecta por exploración de mutaciones.

```

sestrina 1      MRLAAASNEAYASLAVSELLSCHQC CGGD-RGQDEELGIRIPLGLHGSPS 49
sestrina 2      MNRGGSSASASAN-----YLLCTNCRKV-LRKDK--RIRVSQPLTRGPS 41
sestrina 3      MIVADSECHSEIKG-----YLPFTRGGVAGPETREEHREGQARRGSRGPS 45
                  * . . : * . : . : ***

sestrina 1      RFIPEKEMLOVGSEDAQMHALFADSFAALGRLDNITLVMVFHPQYLESFL 99
sestrina 2      AFIPEKEVVQANTADERTN-FLVEEYSTSGRLDNITQVMSLHTQYLESFL 90
sestrina 3      AFI PVEEILREGAESLEQH-LGLEALMSSGRVDNLAVVMGLHPDYLSSEFW 94
                  *** :*::: . . : : : : *::*: : * :*::**.*

sestrina 1      KTQHLYLLQMDGPLPLPHRYHYIGIMAAARHQCSYLVNLHVSDFLHVGGDPK 149
sestrina 2      RSQFYMLRMDGPLPLPDRHYIAIMAAARHQCSYLINMHVDEFLKTGGIAE 140
sestrina 3      RLHYLLLHTDGPLASSWRHYIAIMAAARHQCSYLVGSHMTEFLQTGGDPE 144
                  : . . :* : **** . ****.*****.*****. :* :*::**.* .:

sestrina 1      WLNGLENAPQKLQNLGELNKVLAHRPWLITKEHIEGLLKAEHSWSLAEL 199
sestrina 2      WLNGLEYVPQRLRLNLEINKLLAHRPWLITKEHIQKLVKTGENNWSLPEL 190
sestrina 3      WLLGLHRAPEKLRKLSEVNKLLAHRPWLITKEHIQALLKTGEHSWSLAEL 194
                  ** *. . :*:::*. :*::*:*****. :*:: * :*::**.*

sestrina 1      VHAVVLLTHYSLASFTFGCGISPEIHCDGGHTFRPPSVSNYCICDITNG 249
sestrina 2      VHAVVLLAHYHALASFVFGGINPERDPGIANGFRLISVSSFCVCDLAN- 239
sestrina 3      IQALVLLTHCHSLASFVFGGILPEGDAEGSPASQAPSPP-----SEQ 237
                  :*::*::* * :*::*::*::* * . . : * . : :

sestrina 1      NHSVDEMQVNSAGNASVSDFSFEVEALMEKMRQLQECREEEE-ASQEEMA 298
sestrina 2      DNSIENTSLAGS-NFGIVDSLGELEALMERMKRLQEDREDDE-TTREEMT 287
sestrina 3      GTPPSGDPLNNSGGFEAAR---DVEALMERMRQLQESLLRDEGASQEEME 284
                  . . . : . . :*::*::*:*::*::* :* :*::*::*

sestrina 1      SRFEMEKRESMFVFSDD-----DDEVTPARDVSRHFEDTSYGYKD 338
sestrina 2      TRFEKEKKESLFVVPGETLHAFPHSDFEDDVIVTADVSRYIEDPSFGYED 337
sestrina 3      NRFELEKSESLLVTPSAD-----ILEPSHPDILCFVEDPAFGYED 325
                  .*** ** *::* . . : * : .***. :*::*

sestrina 1      FSRHG-MHVPTFRVQDYCWEDHGYSLVNRLYPDVGQLIDEKFHIPYNLT 387
sestrina 2      FARRGEEHLPTFRAQDYTWENHGFSLVNRLYSIDIGLLDEKFRMVYNLT 387
sestrina 3      FTRRGTOAPPTFRAQDYTWEDHGYSLIQRLYPEGGQLLDEKFQVACSLTY 375
                  *::* * ****.*** *::*::*::*::* :* :*::*::* :***

sestrina 1      NTMAMHKDVTSMRLRAIWNYYIHCMTFGIRYDDYDYGAINQLLDRSFKVYI 437
sestrina 2      NTMATHEDVDTTLRRALFNYYVHCMTFGIRYDDYDYGAINQLLERSLKVYI 437
sestrina 3      NTIAMHSGVDTSMLRRAIWNYYIHCMTFGIRYDDYDYGAINQLLERNLKIYI 425
                  **:* *..***: ****. :*::*::*::*::*::*::*::*::*::*::*

sestrina 1      KTVVCTPEKVTKRMYDSFWRQFKHSEKVVHVNLLLEARMQAELLYALRAI 487
sestrina 2      KTVTCYPERTTKRMYDSYWRQFTHSEKVVHVNLLLEARMQAELLYALRAI 487
sestrina 3      KTVACYPEKTTRMYNLFWRHFRHSEKVVHVNLLLEARMQAELLYALRAI 475
                  ***.* *::*::*::* :*::* *****.***** *****

sestrina 1      TRYMT 492
sestrina 2      TRHLT 492
sestrina 3      TRYMT 480
                  ****

```

Fig.1

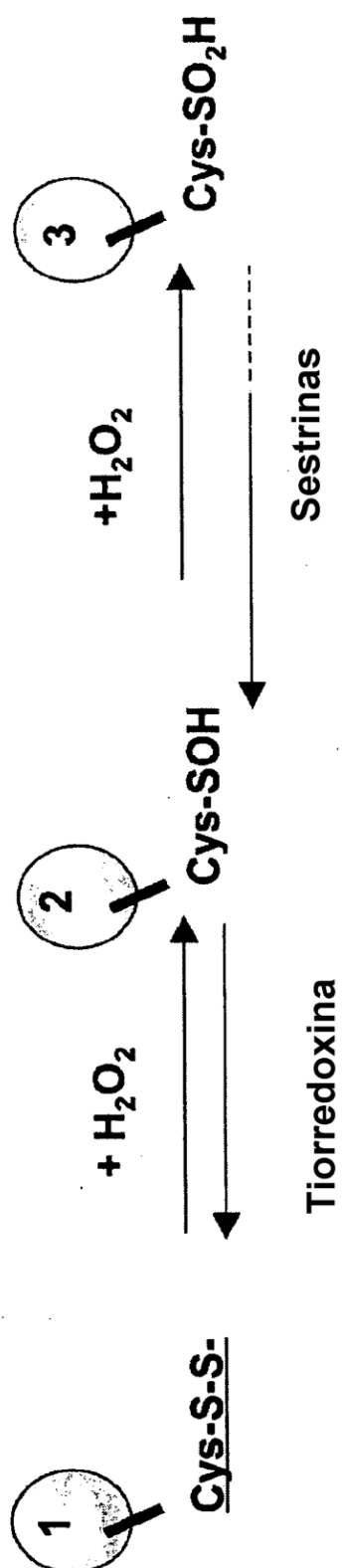


Fig.2

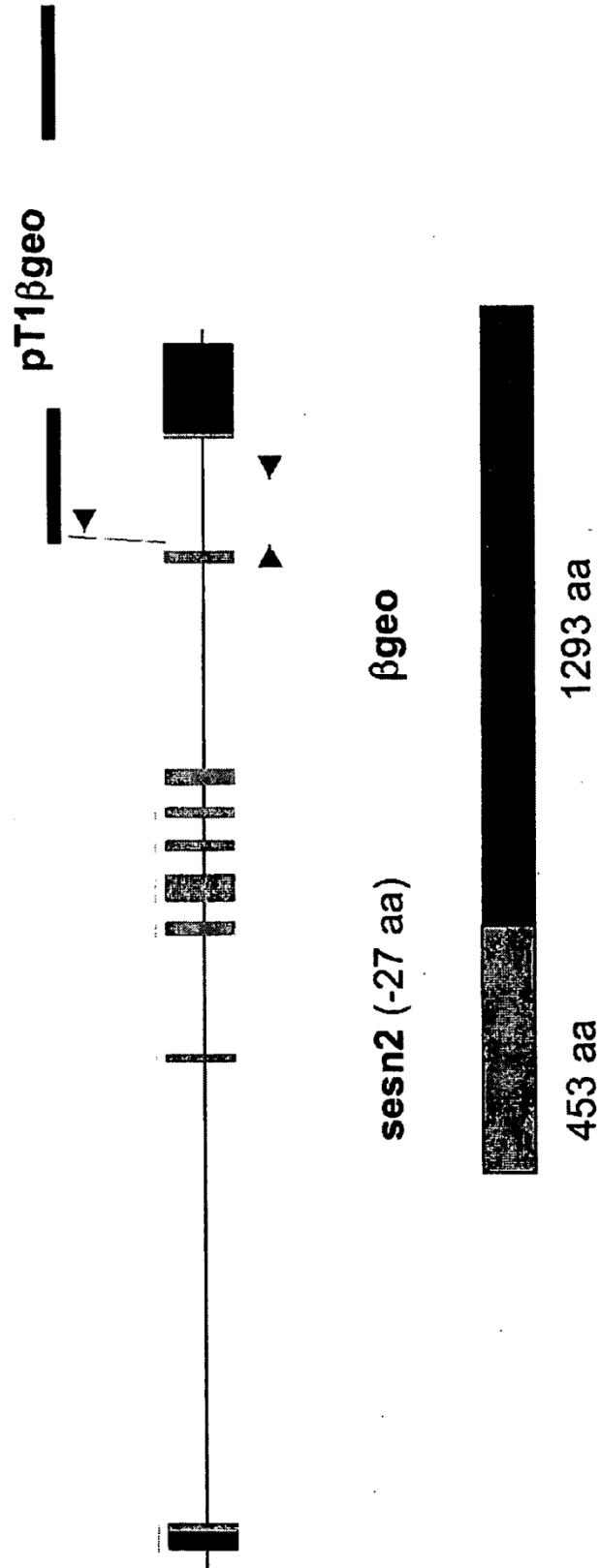
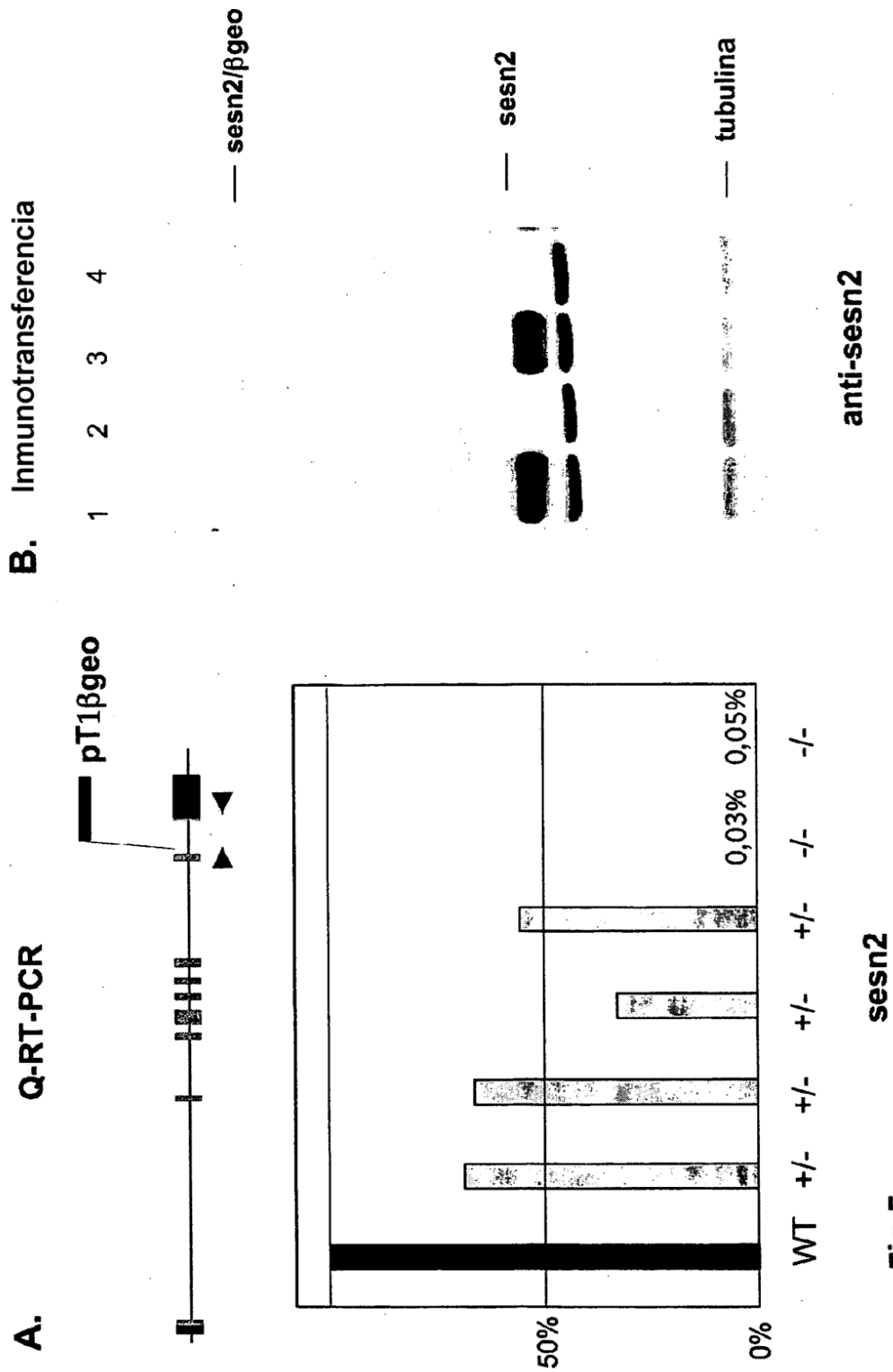


Fig. 3



Fig.4



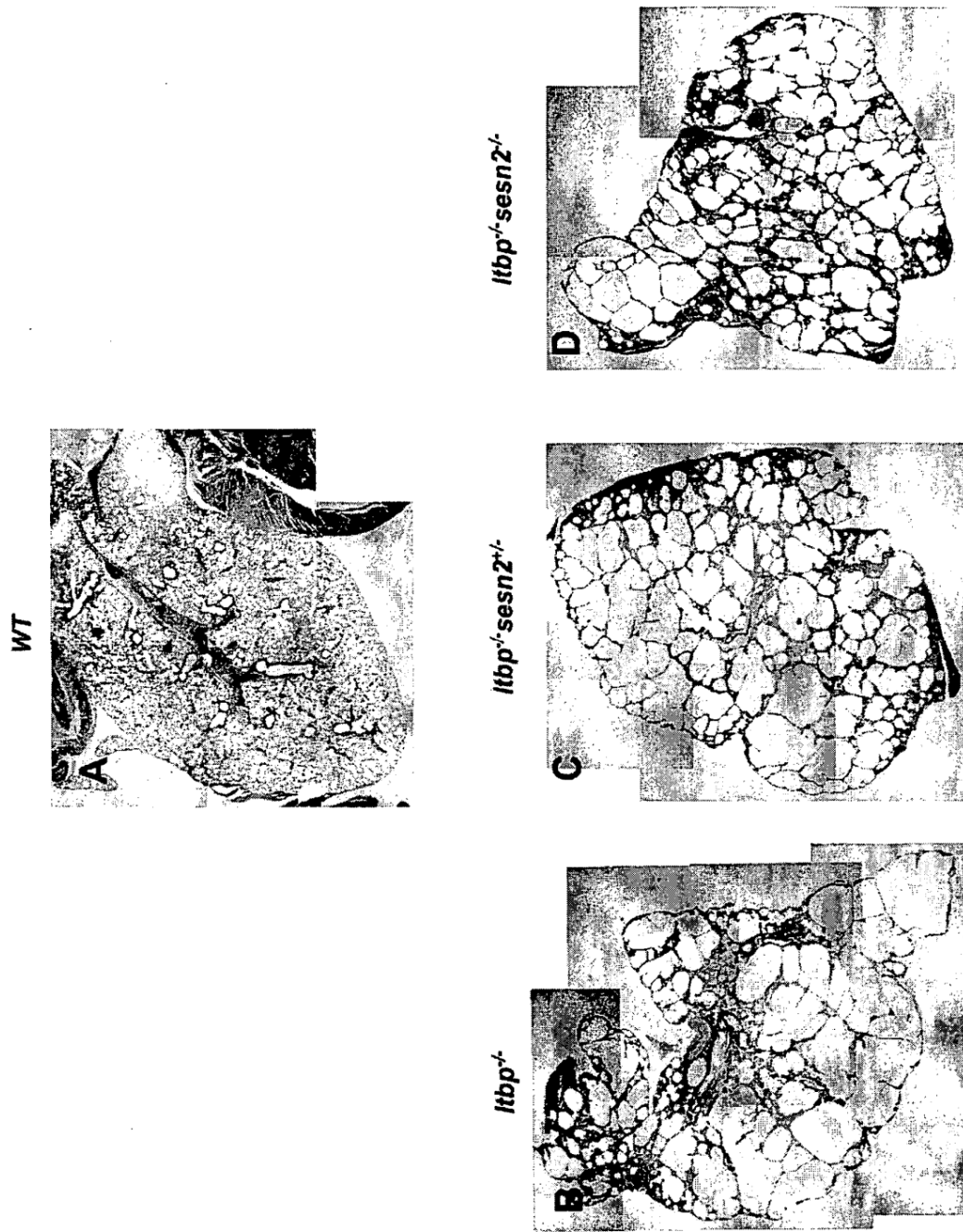


Fig.6

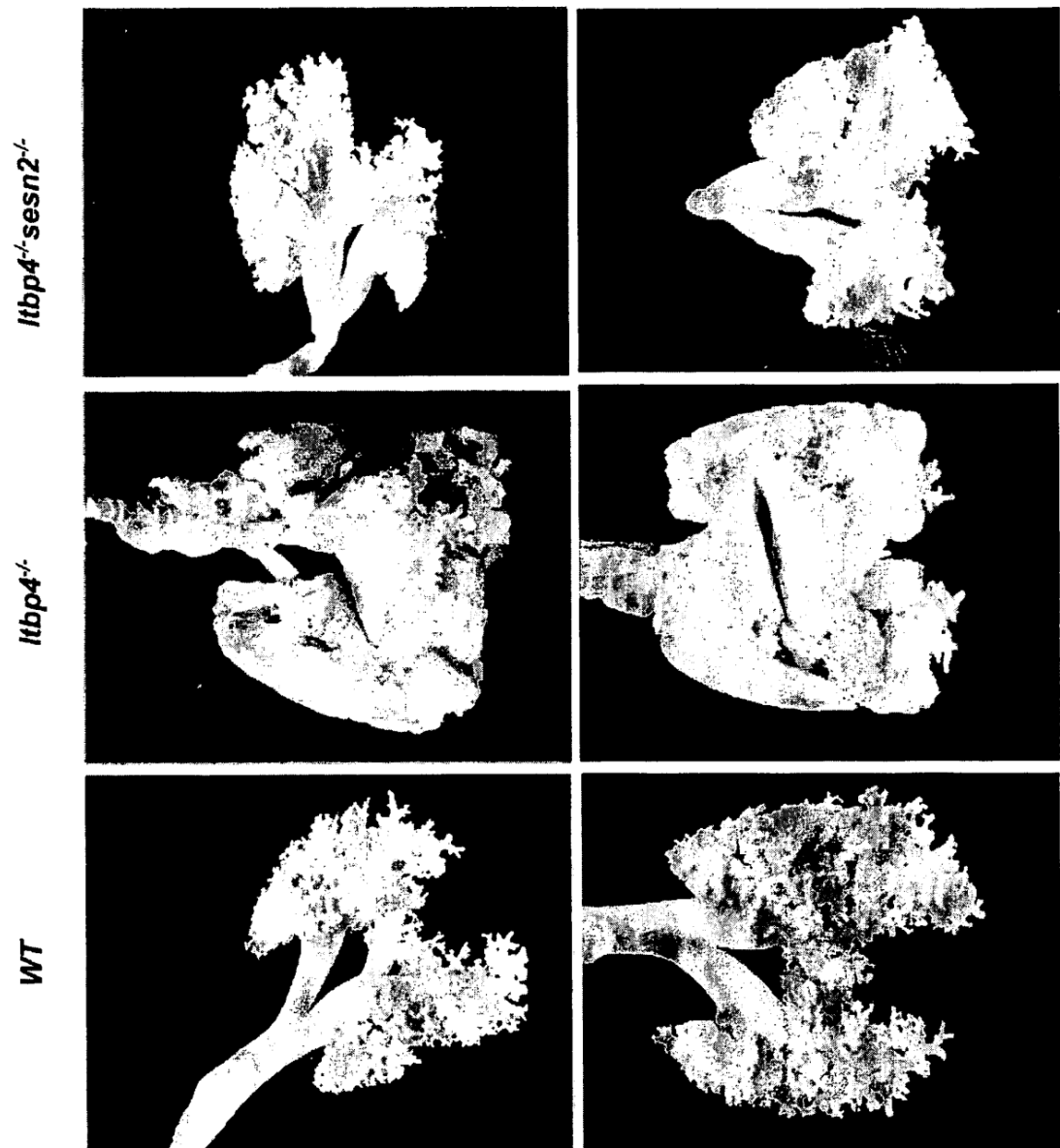


Fig.7

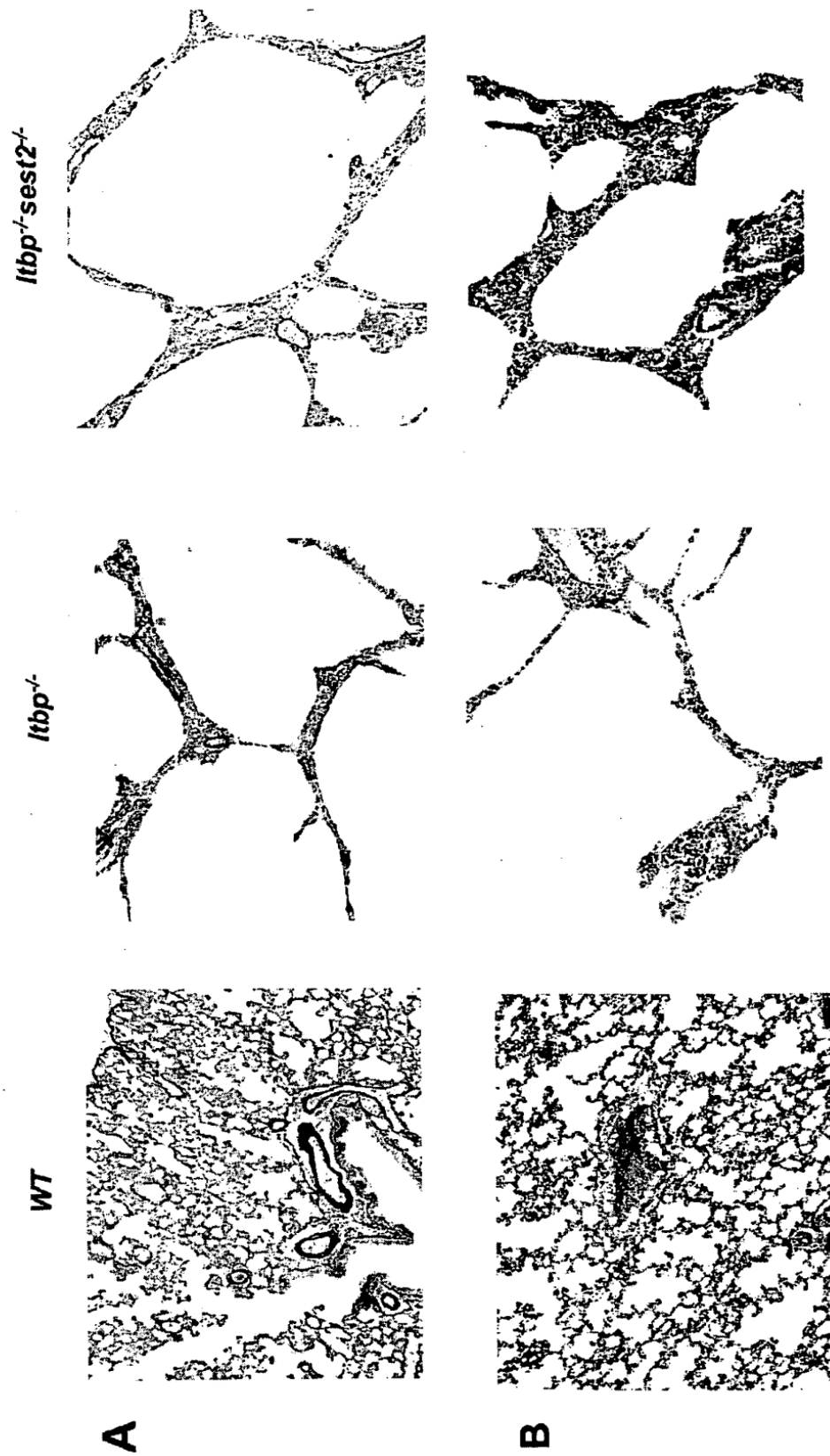
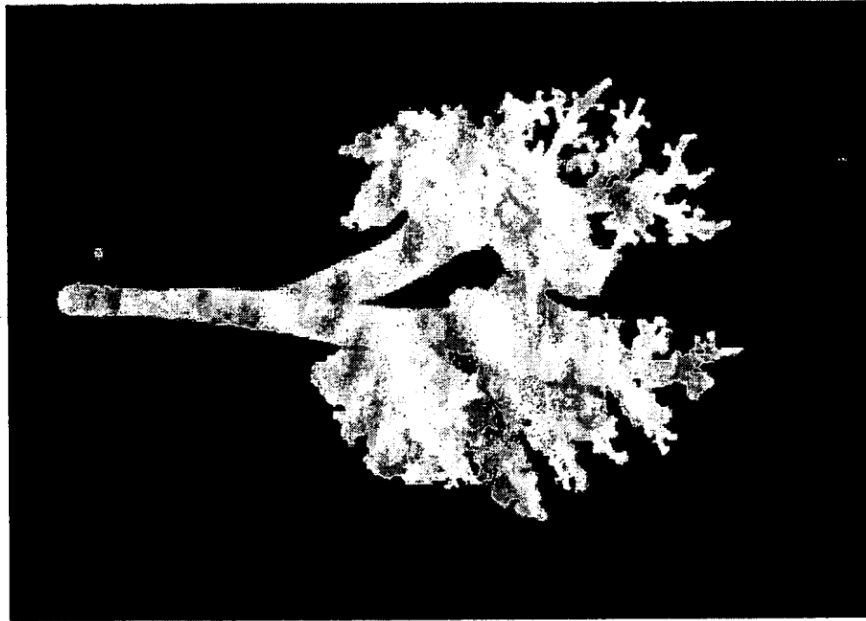


Fig.8

Itbp4^{-/-}Sesn2^{+/+}



Itbp4^{-/-}

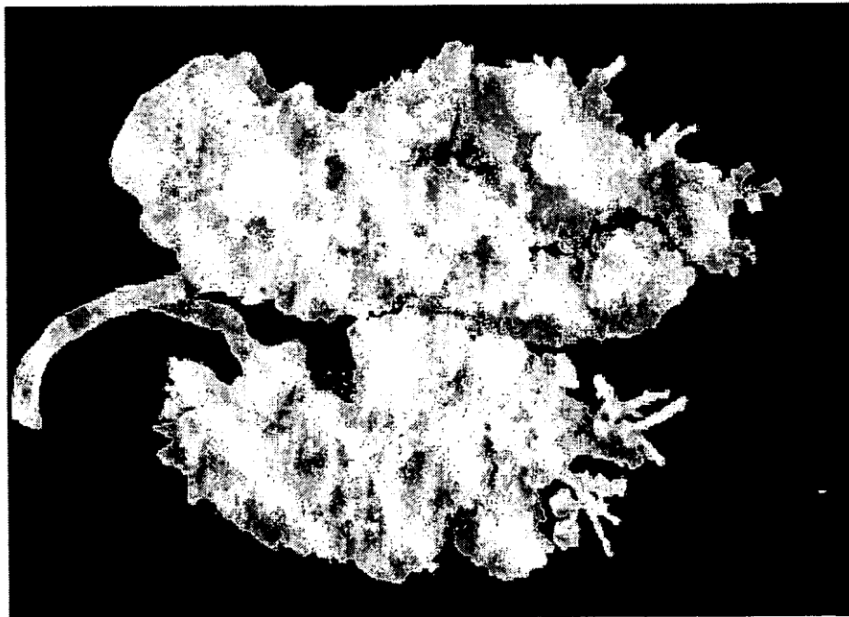


Fig.9

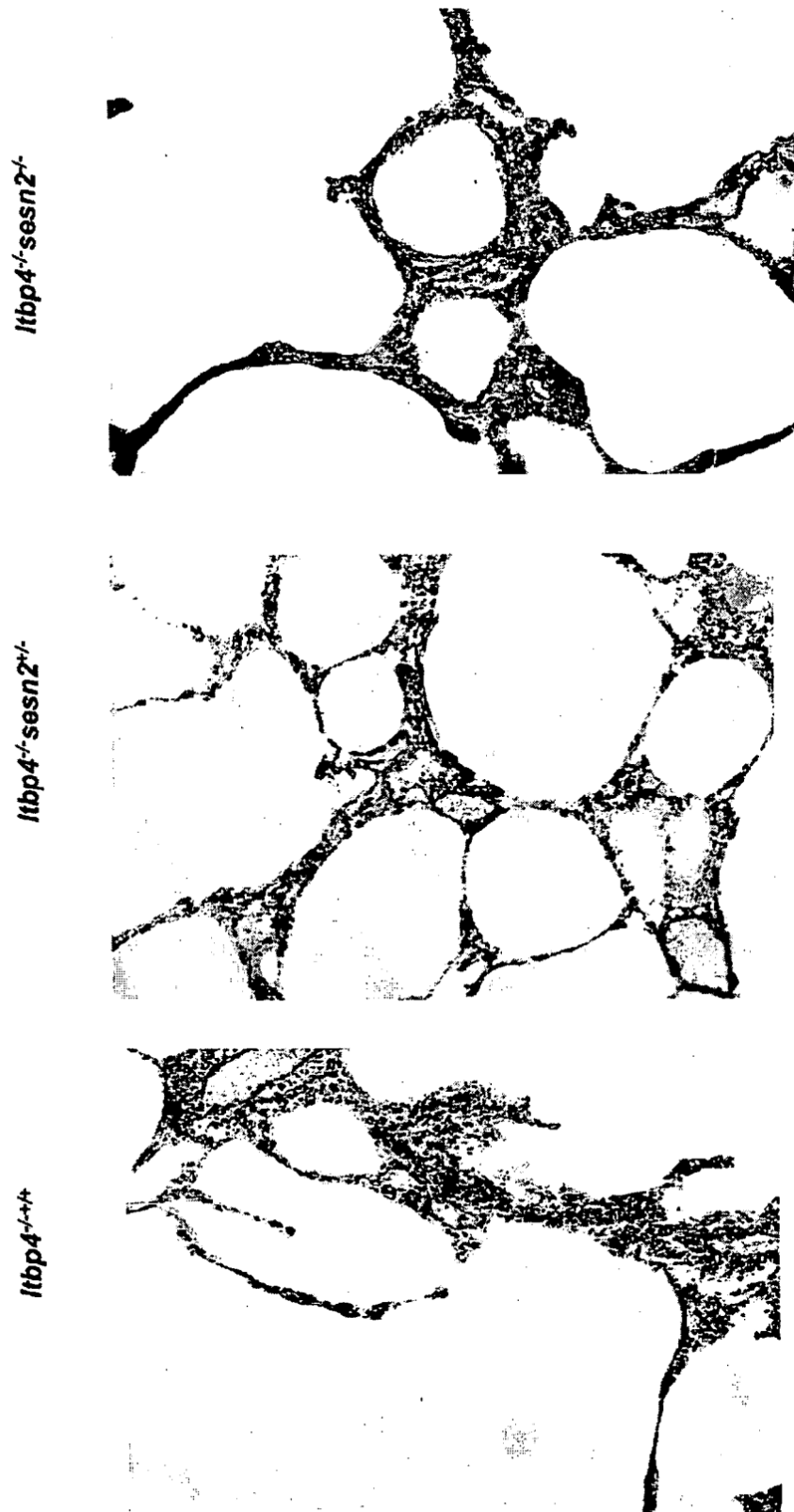


Fig.10

Itbp4^{-/-}sesn^{-/-}



Itbp4^{-/-}sesn^{+/+}

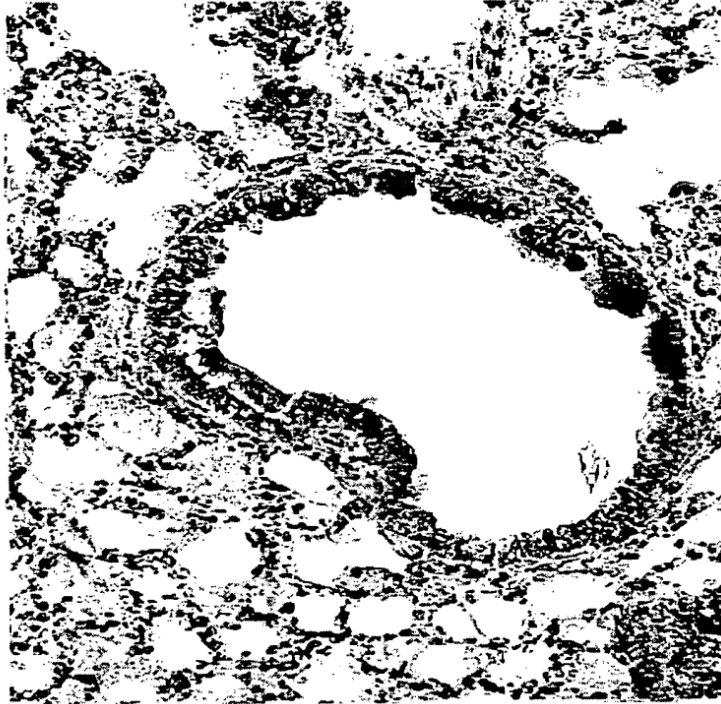


Fig.11



Fig.12

sesn2^{-/-}



WT

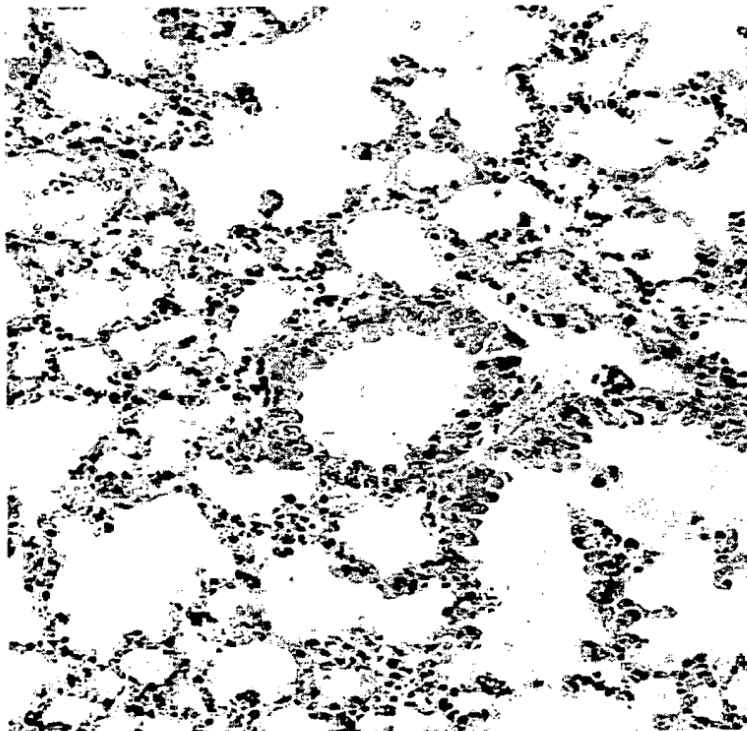


Fig.13

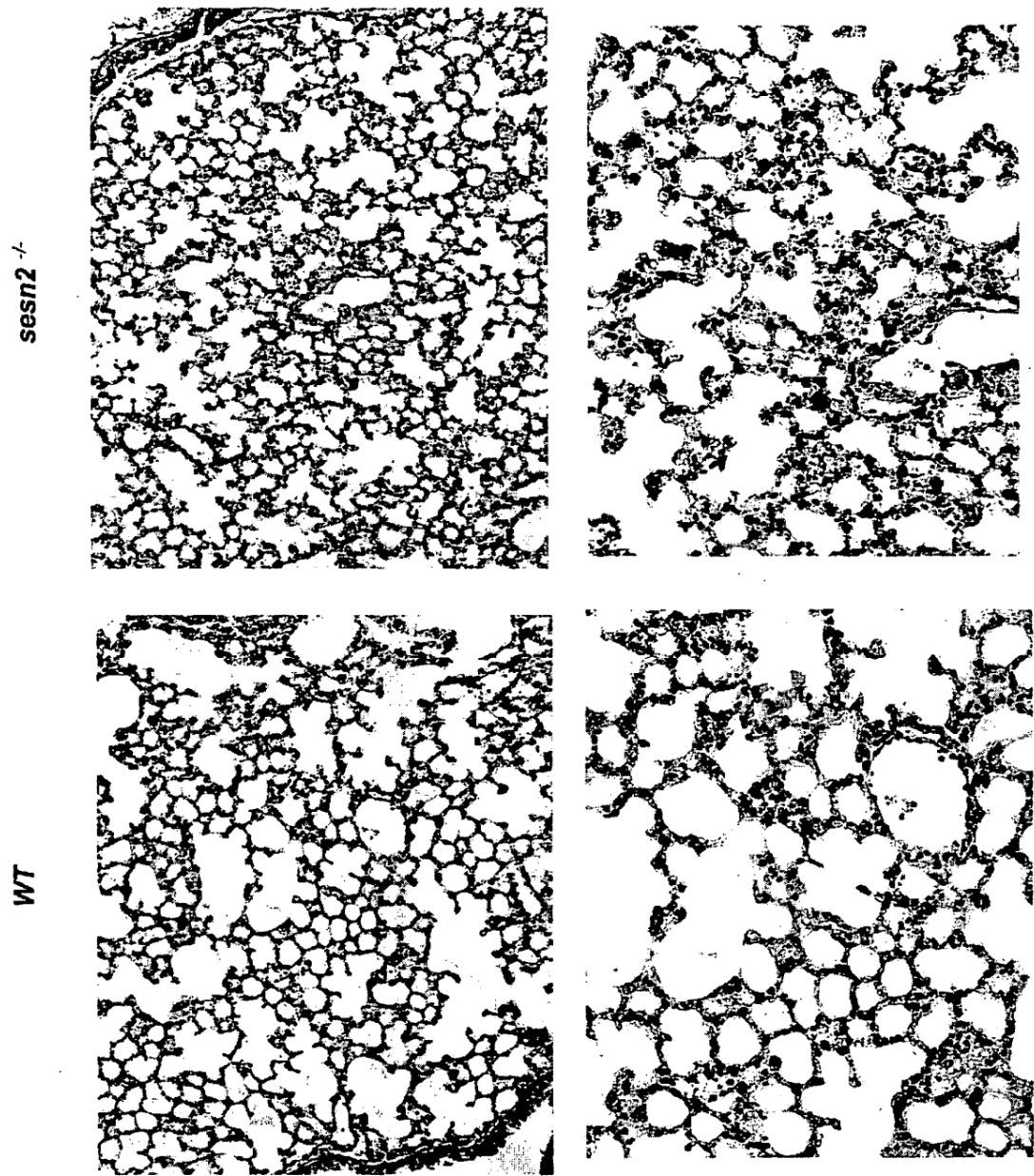


Fig.14

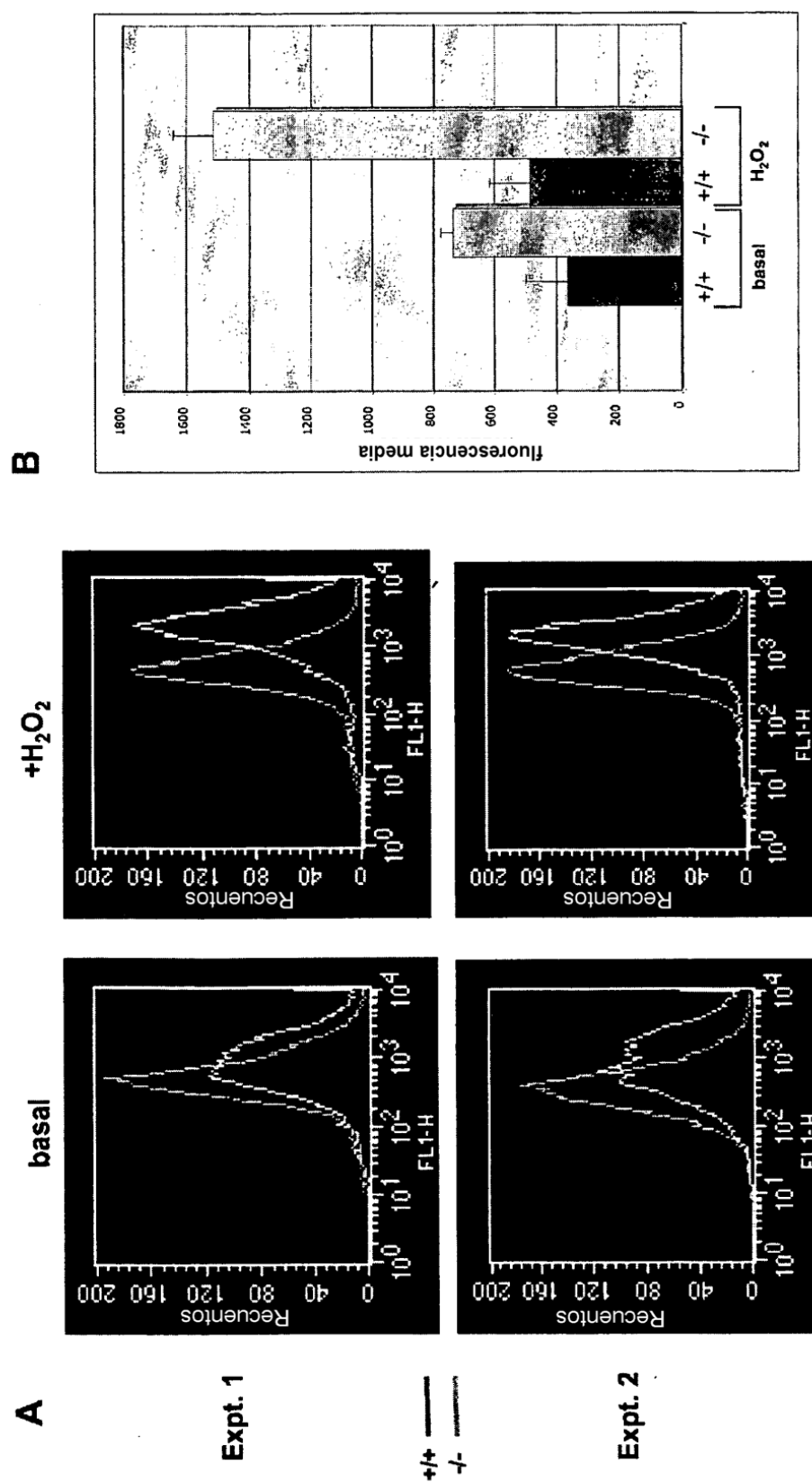


Fig.15