

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 015**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 15/877 (2010.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2008 E 08715609 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015 EP 2134847**

54 Título: **Modelo de aterosclerosis en cerdos**

30 Prioridad:

07.03.2007 DK 200700348

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

30.09.2015

73 Titular/es:

**AARHUS UNIVERSITET (100.0%)
NORDRE RINGGADE 1
8000 ARHUS C, DK**

72 Inventor/es:

**FOG, JACOB BENTZON;
SØRENSEN, CHARLOTTE BRANDT;
KRAGH, PETER MICHAEL;
MIKKELSEN, JACOB GIEHM;
FALK, ERLING;
BOLUND, LARS AXEL y
CORYDON, THOMAS JUHL**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

Observaciones :

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

ES 2 547 015 T3

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

DESCRIPCIÓN

Modelo de aterosclerosis en cerdos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere un cerdo de tamaño miniatura genéticamente modificado como un modelo para estudiar la aterosclerosis, en la que el modelo de cerdo de tamaño miniatura expresa al menos un fenotipo asociado con dicha enfermedad. La invención se refiere además a procedimientos mediante los que se obtiene el cerdo de tamaño miniatura genéticamente modificado. Además, se describen procedimientos para evaluar la respuesta de un tratamiento terapéutico de la aterosclerosis, para cribar la eficacia de una composición farmacéutica, y un procedimiento para el tratamiento de un ser humano que padece de aterosclerosis.

10 **Antecedentes de la invención**

Animales transgénicos, no humanos, pueden ser utilizados para comprender la acción de un único gen o genes en el contexto del animal completo y los fenómenos interrelacionados de la activación, expresión e interacción del gen. La tecnología ha llevado también a la obtención de modelos para varias enfermedades en humanos y otros animales que contribuye significativamente a una mejor comprensión de los mecanismos genéticos y de los genes asociados con enfermedades específicas.

15 Tradicionalmente, se han utilizado animales más pequeños tal como ratones como modelos de enfermedades para las enfermedades humanas y se ha encontrado que son adecuados como modelos para ciertas enfermedades. Sin embargo, su valor como modelos animales para muchas enfermedades humanas es bastante limitado debido a diferencias en los ratones comparados con los humanos. Los animales transgénicos más grandes son mucho más adecuados que los ratones para el estudio de muchos de los resultados y tratamientos de la mayoría de las enfermedades humanas debido a su mayor similitud con los humanos en muchos aspectos. Particularmente, se cree que los cerdos son valiosos como modelos de enfermedades para las enfermedades humanas.

20 La aterosclerosis es, con mucho, la causa más frecuente de arteriopatía coronaria (angina de pecho, infarto de miocardio y muerte súbita), de arteriopatía carótida (accidente cerebrovascular), y de arteriopatía periférica. La aterosclerosis se conoce como el "endurecimiento de las arterias" que es causado por la formación de numerosas placas dentro de las arterias.

25 Es una enfermedad inflamatoria crónica, que se nutre de altos niveles de plasma de lipoproteínas ricas en colesterol, que llevan al desarrollo de placas ateroscleróticas de células inflamatorias, desechos y células del músculo liso en arterias¹ de tamaño grande y mediano. Estas lesiones raramente presentan síntomas por sí mismas. El proceso mecánico en el que las placas se abren reventando, conocido como rupturas de la placa, causa las consecuencias devastadoras de la aterosclerosis. Mediante este proceso, el núcleo trombogénico de la placa es expuesto al sistema hemostático de la sangre en circulación y esto puede provocar un trombo agudo superpuesto limitante del flujo.

30 En la mayoría de casos de aterosclerosis el componente genético es complejo, pero en algunos casos la herencia de la enfermedad es monogénica. Estos casos se deben principalmente a mutaciones en los genes que codifican las proteínas implicadas en el tráfico de lipoproteínas, y las más graves en humanos son causadas por mutaciones nulas del homocigoto en el receptor de LDL (hipercolesterolemia familiar del homocigoto). Aunque el proceso de la enfermedad en la deficiencia del receptor LDL del homocigoto es enormemente agresivo conduciendo a una aterosclerosis coronaria grave en la infancia, se considera que la enfermedad no es cualitativamente diferente de lo visto en la aterosclerosis de desarrollo más lento. Por ello, las causas monogénicas de la aterosclerosis pueden utilizarse como herramientas para modelizar la aterosclerosis y las complicaciones ateroscleróticas en modelos animales genéticamente modificados.

35 Ratones deficientes en apolipoproteína E y en receptor de LDL con grave hipercolesterolemia y rápido desarrollo de la aterosclerosis se crearon a principios de la década de 1990 por recombinación homóloga en células^{6,7} madre embrionarias. Estos modelos de ratón han contribuido a comprender muchos aspectos del desarrollo de la placa, pero se consideran limitados como modelos para la aterosclerosis humana porque carecen de aterosclerosis coronaria medible y no desarrollan la mayoría de las temidas complicaciones de la aterosclerosis, es decir, la ruptura de la placa aterosclerótica y la trombosis superpuesta. Además, debido a su pequeño tamaño, estos animales no han ayudado a la investigación por bioimágenes de la aterosclerosis y en la intervención coronaria percutánea.

40 Las similitudes en la estructura cardiovascular y en la distribución de las arterias coronarias con los humanos hacen del cerdo una especie interesante para explorar la función y las enfermedades cardiovasculares. En dietas convencionales (~3 % de grasa, peso/peso), los cerdos tienen bajos niveles de colesterol en plasma (~2 mmol/l), pero muchas razas de cerdos son susceptibles de hipercolesterolemia y aterosclerosis moderada cuando son alimentados con una dieta alta en grasa saturada y colesterol, incluidos los cerdos⁹ de granja de tamaño miniatura Yucatán⁸ y Yorkshire. Los cerdos de tamaño miniatura Yucatán tienen particular interés como modelos de la aterosclerosis humana porque su peso de adulto es comparable con el de los humanos (60-80 kg para los machos y 50-70 kg para las hembras¹⁰) y por ello el equipo para obtener imágenes y la intervención coronaria percutánea

puede utilizarse directamente.

La mayoría de lesiones declaradas hasta la fecha han sido descritas en una progenie de grandes cerdos de granja identificados en Wisconsin que albergan una mutación de sentido erróneo de un único nucleótido en el gen receptor para LDL que reduce la afinidad del receptor con sus ligandos¹¹. Una colonia de estos cerdos es actualmente mantenida en Francia por el profesor Ludovic Drouet, INRA, Jouy en Josas. Los cerdos desarrollan aterosclerosis en las arterias coronarias con muchos aspectos de la aterosclerosis humana incluidas las rupturas de la placa y la trombosis superpuesta. Sin embargo, la hipercolesterolemia es moderada en una dieta normal de un cerdo (colesterol total 5-8 mM) y la aterosclerosis se desarrolla sólo lentamente a lo largo de varios años. Para cuando estos cerdos han desarrollado aterosclerosis son, con mucho, demasiado grandes para la mayoría de los fines científicos.

Aunque en décadas pasadas se han logrado avances considerables en la terapia farmacológica anti-aterosclerótica, la aterosclerosis sigue siendo una de las principales causas de muerte y discapacidad grave en Dinamarca y en el resto del mundo². Hay al menos tres partes para una explicación de esto.

En primer lugar, el enfoque convencional del factor de riesgo basado en la población recomendado en las directivas oficiales es incapaz de identificar aquellos que necesitan tratamiento a nivel individual³. Por ello, aunque los autores de la invención tienen acceso a un tratamiento preventivo eficaz se ven incapaces de identificar aquellos a los que tratar. Este problema podría resolverse mediante imágenes diagnósticas de la aterosclerosis, que está llegando a ser teóricamente posible con la llegada de la nueva tecnología^{4,5} de obtención de imágenes de alta resolución. Sin embargo, para desarrollar agentes trazadores/de contraste y secuencias de imágenes que sean capaces de visualizar placas ateroscleróticas y actividad de enfermedad aterosclerótica, los autores de la invención necesitan un modelo animal de la enfermedad de tamaño humano que pueda ser examinado en escáneres con TC, RM y TEP en el paciente.

En segundo lugar, la terapia anti-aterosclerótica es eficaz en la prevención de la aterosclerosis a largo plazo, pero existe una carencia de terapia médica que sea eficaz en disminuir rápidamente el riesgo de complicaciones trombóticas en personas que han consolidado una aterosclerosis grave. P. ej., en aquellas personas que han identificado por sí mismos presentar síntomas de aterosclerosis y en las que se promueve el máximo tratamiento, todavía pueden tener lugar futuros acontecimientos. En la actualidad, el principal obstáculo para desarrollar tal medicina es la carencia de un modelo animal en el que tengan lugar la ruptura de la placa y la trombosis arterial.

En tercer lugar, el mejor tratamiento para acontecimientos coronarios en la actualidad es principalmente la intervención coronaria percutánea con la colocación de un estent, pero estos procedimientos están sujetos a complicaciones incluidas la trombosis del estent y la restenosis intra-estent. La mayor parte de la investigación dentro de esta importante área se lleva a cabo en arterias coronarias no afectadas del cerdo, pero este enfoque tiene limitaciones obvias.

Por estas razones, un modelo de cerdo de tamaño humano con una grave aterosclerosis similar a la humana, incluidas las rupturas de la placa y las complicaciones trombóticas, es más necesario que nunca.

Aunque los genes responsables de la aterosclerosis hereditaria o involucrados en el desarrollo de la enfermedad han sido identificados en humanos esto no significa que animales transgénicos para tales mutaciones presenten un fenotipo comparable con el de la enfermedad humana. Sin embargo, la presente invención ha mostrado sorprendentemente que los modelos de cerdo de tamaño miniatura genéticamente modificados de acuerdo con la presente invención presentan el fenotipo de la aterosclerosis.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un modelo de cerdo de tamaño miniatura genéticamente modificado que permite el estudio de la aterosclerosis.

Por ello, un aspecto de la presente invención se refiere a un cerdo de tamaño miniatura genéticamente modificado A como un modelo para estudiar la aterosclerosis, en el que el modelo de cerdo de tamaño miniatura expresa al menos un fenotipo asociado con la aterosclerosis y comprende al menos una mutación en el

i. gen ApoE endógeno y/o

ii. gen receptor del LDL endógeno,

en la que al menos dicho fenotipo es hipercolesterolemia. el cerdo de tamaño miniatura.

Las realizaciones de la presente invención comprenden, cerdos de tamaño miniatura seleccionados, por ejemplo, del grupo constituido por Goettingen, Yucatán, Bama Xiang Zhu, Wuzhishan y Xi Shuang Banna, incluida cualquier combinación de los mismos. Sin embargo, otra realización se refiere a cerdos que no son un cerdo de tamaño miniatura, tal como la especie *Sus domesticus*, por ejemplo donde el cerdo de tamaño miniatura se selecciona del grupo constituido por Landrace, Yorkshire, Hampshire, Duroc, Chinese Meishan, Berkshire y Piêtrain, incluida

cualquier combinación de los mismos. En una realización preferida el cerdo de tamaño miniatura es un cerdo de tamaño miniatura Yucatán.

Realizaciones de la presente invención comprenden el cerdo de tamaño miniatura modificado, en las que el cerdo de tamaño miniatura comprende al menos una mutación en un gen ApoE y/o LDL o parte del mismo, producto de la transcripción y/o de la traducción o parte del mismo. En otra realización el cerdo de tamaño miniatura modificado comprende al menos una mutación en un gen ApoE endógeno o parte del mismo, producto de la transcripción y/o de la traducción o parte del mismo. En otra realización el cerdo de tamaño miniatura modificado comprende al menos una mutación en un gen LDL endógeno o parte del mismo, producto de la transcripción y/o de la traducción o parte del mismo. En otra realización más, se introduce al menos una mutación en el gen ApoE o LDL endógeno porcino por recombinación homóloga o alternativamente por integración aleatoria. En otra realización más, se introduce al menos una mutación en el gen ApoE o LDL endógeno porcino, producto de la transcripción y/o de la traducción o parte del mismo por ARNpi de dicho cerdo de tamaño miniatura.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un blastocisto porcino genéticamente modificado derivado del modelo de cerdo de tamaño miniatura genéticamente modificado como se divulga en el presente documento.

Un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un embrión porcino genéticamente modificado derivado del modelo de cerdo de tamaño miniatura genéticamente modificado como se divulga en el presente documento.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un feto porcino genéticamente modificado derivado del modelo de cerdo de tamaño miniatura genéticamente modificado como se divulga en el presente documento.

Un quinto aspecto de la presente invención se refiere a una célula donante porcina genéticamente modificada derivada del modelo de cerdo de tamaño miniatura genéticamente modificado como se divulga. el cerdo de tamaño miniatura Realizaciones adicionales de los aspectos segundo y tercero comprenden una o más de las características definidas anteriormente, en las que las etapas iv) y vi) se realizan de forma secuencial o simultánea, y comprendiendo las realizaciones una o más de las características, en las que el embrión es cultivado in vitro. Un embrión de este tipo puede ser cultivado en un cultivo secuencial. El embrión, por ejemplo en el estadio de blastocisto, es criopreservado antes de transferir a un mamífero anfitrión.

En los procedimientos de la presente invención, las realizaciones de la presente invención abarcan cerdos de tamaño miniatura seleccionados, por ejemplo, del grupo constituido por Goettingen, Yucatán, Bama Xiang Zhu, Wuzhishan y Xi Shuang Banna, incluida cualquier combinación de los mismos. el cerdo de tamaño miniatura.

Un aspecto adicional de la presente invención concierne a un procedimiento para evaluar el efecto de un tratamiento terapéutico de la aterosclerosis, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de

- i) proporcionar el modelo de cerdo de tamaño miniatura de acuerdo con la reivindicación 1,
- ii) evaluar el efecto observado en dicho modelo de cerdo de tamaño miniatura tratado con dicha composición farmacéutica. el cerdo de tamaño miniatura dicho cerdo de tamaño miniatura.

En una realización, el procedimiento comprende además una etapa de asesoramiento sobre el tratamiento médico basado en los efectos observados anteriormente mencionados.

Un aspecto adicional más de la presente invención se refiere a un procedimiento para cribar la eficacia de una composición farmacéutica, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de

- i) proporcionar el modelo de cerdo de tamaño miniatura de acuerdo con la reivindicación 1,
- ii) expresar en dicho modelo de cerdo de tamaño miniatura dicho determinante genético y emplear dicho fenotipo para dicha enfermedad,
- iii) evaluar el efecto, si lo hay, sobre dicho modelo de cerdo de tamaño miniatura tratado con dicha composición farmacéutica. el cerdo de tamaño miniaturadicho cerdo de tamaño miniaturadicho cerdo de tamaño miniaturael cerdo de tamaño miniatura.

Descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el número de clones resistentes después de la cotransfección de pSBT-HCRapoE-hAAT-PCSK9-bpA con pCMV-mSB (Izquierda) y pCMV-HSB3 (Derecha).

La Figura 2 muestra la expresión transitoria de pSBT-HCRapoE-hAAT-PCSK9-BpA en células HepG2 seguido de tinción inmunocitoquímica para PCSK9-FLAG utilizando un anticuerpo anti-FLAG y estreptavidina conjugada con Alexa-594 (fluorescencia roja). A. Células HepG2 de control no transfectadas. B. Células HepG2 transfectadas con pSBT-HCRapoE-hAAT-PCSK9-BpA. C. Transfección transitoria del plásmido pEGFP-N1 (Invitrogen) que expresa la proteína fluorescente verde potenciada (eGFP) para indicar la eficiencia de la transfección.

5 La Figura 3 muestra el plásmido pSBT/cHS4.H1p.PGK-puro.U6p.cHS4 basado en el transposón Sleeping Beauty para la expresión estable del ARNhc. Los ARNhc (ARN de horquilla corta) pueden ser expresados bajo el promotor U6 o H1, o ambos. Los casetes de expresión están flanqueados por secuencias aisladoras cHS4 (Chung J.H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 1997; 94(2):575-580) para proteger los casetes de expresión del silenciamiento por los efectos de posición después de la integración genómica.

La Figura 4 muestra la eficiencia con la expresión disminuida del ARNhc dirigido hacia las dianas T1 a T10 del nucleótido 19 en los ARN de fusión del receptor LDL de luciferasa Renilla. El T8 y el T9 se comportan mejor en la prueba de cribado.

10 La Figura 5 muestra la tecnología bifásica de la presente invención en la que un vector SB integrador, que transporta un gen reportero y un gen marcador selectivo, sirve como un reportero para la expresión génica continua y, como consecuencia, como una diana para la inserción génica. En una segunda etapa de modificación este vector puede servir como una diana para la inserción de uno o más casetes de expresión génica en un locus bien caracterizado.

La Figura 6 muestra una representación esquemática de pSBT/RSV-GFIP.

15 La Figura 7 muestra la transposición de vectores SB en fibroblastos porcinos. Se empleó un transposón estándar que codifica un gen (SBT/PGK-puro) con resistencia a la puromicina y se detectaron niveles variables de la transposición, dando como resultado aproximadamente 75 colonias resistentes al fármaco en cultivos de fibroblastos cotransfectados con pSBT/PGK-puro y pCMV-SB, menos de 3 colonias aparecieron después de la transfección con pSBT/PGK-puro y pCMV-mSB, la última codificando una versión inactiva de la transposasa. Curiosamente, se obtuvo una media de casi 140 colonias utilizando la variante HSB3 de transposasa hiperactiva, que indica que HSB3 también en células porcinas intermedia mayores niveles de transposición comparados con la transposasa SB original.

20 La Figura 8 muestra la eficiente inserción de un vector SB marcado FRT en clones de células fibroblastos de cerdo marcadas con SB que contenían un sitio diana de recombinación Flp para la inserción génica específica del sitio fueron cotransfectados el plásmido pSBT/loxP.SV40-lopP257 con pCMV-mSB, pCMV-SB, y pCMV-HSB3, respectivamente. El HSB3 mostró de nuevo la mayor actividad, dando como resultado aproximadamente 30 colonias resistentes al fármaco después de la transfección de fibroblastos 3×10^4 .

25 La Figura 9 muestra un análisis del clon por microscopía de fluorescencia de colonias resistentes a la puromicina aisladas y expandidas que demuestra la expresión eficiente del FRTeGFP.

30 Figura 10. (a) Trisección de ovocitos; (b) Pareados de fragmentos fibroblasto-ovocito para la primera fusión; (c) embriones reconstruidos con tripletes (obsérvese la elongación bajo la corriente AC); (d) fusión de los tripletes. Barra de escala = 50 μm .

35 Figura 11. (a) Ovocitos madurados in vitro después de la digestión parcial de la zona. (b) Ovocitos desgrasados después de la centrifugación. (c) Bisección de ovocitos desgrasados. (d) Pareados de fragmentos fibroblasto-ovocito para la primera fusión. (e) Embriones reconstruidos en estadios de cuatro células desarrolladas a partir de ovocitos desgrasados. (f) Embriones reconstruidos en el estadio de cuatro células desarrollados a partir de ovocitos intactos. (g) Blastocistos re-expandidos a partir de embriones desgrasados después de calentamiento. (h) Tinción Hoechst e iluminación UV de blastocistos re-expandidos a partir de embriones desgrasados después de calentamiento. La barra representa 100 μm .

40 Figura 12. Bisección en enucleación químicamente asistida. Obsérvese el cono de extrusión o cuerpo polar conectado a la parte más pequeña (carioplasto putativo). Imagen estereomicroscópica. La barra representa 50 μm .

Figura 13. Tinción Hoechst e iluminación UV de la ausencia y presencia de cromatina. Luz UV, imagen microscópica fluorescente invertida. La barra representa 50 μm . (a) La ausencia de cromatina en citoplastos putativos (b) La presencia de cromatina en carioplastos putativos.

45 Figura 14. Imagen estereomicroscópica de los blastocistos el Día 7 producida con enucleación artesanal químicamente asistida (CAHE). La barra representa 50 μm .

Figura 15. Tinción Hoechst e iluminación UV de blastocisto desarrollado después de enucleación artesanal químicamente asistida (CAHE). La barra representa 50 μm .

Descripción detallada de la invención

50 La presente invención concierne a un modelo de cerdo de tamaño miniatura genéticamente modificado, blastocistos, células donantes y/o fetos para estudiar la aterosclerosis en la que el modelo de cerdo de tamaño miniatura expresa al menos un fenotipo asociado con la aterosclerosis.

Se comprenderá que la invención no comprende procesos para modificar la identidad genética de cerdos que es probable que les causen sufrimiento sin ningún beneficio médico sustancial para el hombre o el animal, o los animales resultante de tales procesos.

La presente invención también se refiere a embriones de cerdo de tamaño miniatura genéticamente modificados obtenibles por los procedimientos descritos en el presente documento.

Los procedimientos para producir el modelo de cerdo de tamaño miniatura para estudiar la aterosclerosis descritos en el presente documento no abarcan una etapa quirúrgica realizada sobre el cerdo de tamaño miniatura.

- 5 El término "endógeno" se utiliza en el presente documento para especificar un gen particular presente de forma natural en el genoma de una célula diana particular (por ejemplo las células de un cerdo).

La expresión "determinante genético" se usa en el presente documento para referirse a una "molécula de polinucleótido" o "ácido nucleico" de una sola cadena o de doble cadena que comprende un gen estructural de interés. El "determinante genético" codifica una proteína no producida normalmente en cantidades apreciables en las células diana. Por ello, los "determinantes genéticos" incluyen ácidos nucleicos que no se encuentran normalmente en el genoma de la célula diana. Los "determinantes genéticos" también incluyen ácidos nucleicos que se encuentran normalmente dentro del genoma de la célula diana, pero están en una forma que permite la expresión de proteínas que no se expresan normalmente en las células diana en cantidades apreciables. Alternativamente, los "determinantes genéticos" pueden codificar una forma variante o mutante a partir de una proteína que aparece de forma natural.

El término "polinucleótido" y la expresión "ácido nucleico" se usan de forma intercambiable, y, cuando se usa en singular o en plural, se refiere generalmente a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Por ello, por ejemplo, los polinucleótidos como los definidos en el presente documento incluyen, sin limitación, ADN y ARN de una sola cadena o de doble cadena, ADN que incluye zonas de una sola cadena o de doble cadena, ARN de una sola cadena o de doble cadena, y ARN que incluye zonas de una cadena o de doble cadena, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser de una sola cadena o, más típicamente, de doble cadena o incluyen zonas de una sola cadena y zonas de doble cadena. Además, el término "polinucleótido" como se usa en el presente documento se refiere a zonas de cadena triple que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Las cadenas en tales zonas pueden ser de la misma molécula o de diferentes moléculas. Todas las zonas pueden incluir una o más de las moléculas, pero más típicamente afectan a sólo una zona de alguna de las moléculas. Una de las moléculas de una zona de triple hélice es a menudo un oligonucleótido. El término "polinucleótido" incluye específicamente los ADNc. El término incluye los ADN (incluidos los ADNc) y los ARN que contienen una o más bases modificadas. Por ello, los ADN o los ARN con cadenas principales modificadas por estabilidad o por otras razones son "polinucleótidos" como ese término está previsto en el presente documento. Además, los ADN o ARN que comprenden bases inusuales, tal como inosina, o bases modificadas, tal como bases tritriadas, se incluyen dentro del término "polinucleótidos" como se define en el presente documento. En general, el término "polinucleótido" recoge todas las formas químicamente, enzimáticamente y/o metabólicamente modificadas de polinucleótidos no modificados, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, incluidas células simples y complejas.

- 35 El término cerdo "transgénico" y la expresión cerdo "genéticamente modificado" se usan con idéntico significado en el presente documento.

La presente invención se refiere a un modelo de cerdo de tamaño miniatura modificado para estudiar la aterosclerosis, en la que el modelo de cerdo de tamaño miniatura expresa al menos un fenotipo asociado con la aterosclerosis.

40 Cerdos

La presente invención se refiere a un cerdo de tamaño miniatura modificado como un modelo para estudiar la aterosclerosis, en el que el modelo de cerdo de tamaño miniatura expresa al menos un fenotipo asociado con la aterosclerosis. El cerdo de tamaño miniatura de la presente invención pueden ser cualquier cerdo.

- 45 El cerdo de tamaño miniatura está en términos evolutivos muy cerca de los humanos si lo comparamos, por ejemplo, con los roedores. Es más, el cerdo de tamaño miniatura se ha utilizado ampliamente en la investigación biomédica debido a las similitudes entre la fisiología humana y la porcina (Douglas, 1972; Book & Bustad, 1974).

El cerdo de tamaño miniatura se selecciona preferiblemente del grupo constituido por Goettingen, Yucatán, Bama Xiang Zhu, Wuzhishan y Xi Shuang Banna. Por ello, la presente invención se refiere a cualquiera de Goettingen, Yucatán, Bama Xiang Zhu, Wuzhishan y Xi Shuang Banna de forma separada, o en cualquier combinación. En una realización preferida de la invención se emplea el cerdo de tamaño miniatura Yucatán.

El cerdo de tamaño miniatura Goettingen (Göttingen) pesa aproximadamente 30 kg. Sin embargo, la alternativa al cerdo de tamaño miniatura Goettingen es el cerdo de tamaño miniatura Yucatán. Realizaciones preferidas de la presente invención comprenden el cerdo de tamaño miniatura Goettingen, o el cerdo de tamaño miniatura Yucatán.

Genéticamente modificados

- 55 Las modificaciones genéticas son introducidas en la célula somática antes de la transferencia nuclear de la célula.

Sin embargo, la modificación genética puede en otra realización ser introducida durante el proceso de la transferencia nuclear de la célula, por ejemplo por adición de transgenes en diferentes etapas del procedimiento de clonación artesanal (HMC) que encontrará entonces su camino hacia el genoma del embrión.

5 Las modificaciones genéticas comprenden la integración aleatoria de un gen causante de una enfermedad, el gen mutado, en el genoma de la célula somática. También puede ser la integración aleatoria de un gen normal no mutado lo que causará una enfermedad cuando se exprese en un tejido específico o en un nivel de expresión específico.

10 Sin embargo, la invención se refiere también a cerdos de tamaño miniatura modificados, embriones, células donantes, blastocistos y/o fetos obtenidos por transferencia del ARNm y/o de la proteína de los genes divulgados en el presente documento. Por ello, la modificación del cerdo de tamaño miniatura está en una realización que no conduce a la integración de un transgen en el genoma del cerdo de tamaño miniatura, embrión, blastocisto y/o feto.

15 El gen o transgen introducido, el producto de la transcripción y/o de la traducción o parte del mismo pueden provenir de cualquier especie, incluidas las bacterias, el cerdo, el ser humano, el ratón, la rata, la levadura, los invertebrados o las plantas. Las secuencias reguladoras del transgen pueden llevar a una expresión omnipresente o inducible o específica del tejido y/o del tiempo y puede provenir también de cualquier especie incluidas el cerdo, el ser humano, el ratón, la rata, la levadura, los invertebrados o las plantas.

20 De manera importante, la modificación genética en la célula somática puede ser dirigida a una zona específica en el genoma porcino por recombinación homóloga de una construcción dirigida o por procedimientos de corrección génica. Esto podía ser la inactivación (p. ej., el noqueado) de genes específicos que causarán una enfermedad o fenotipo.

25 La recombinación homóloga tiene lugar entre dos moléculas de ADN homólogo. También se denomina entrecruzamiento de ADN. Por recombinación homóloga, un segmento ADN puede reemplazar otro segmento de ADN con una secuencia similar. El proceso implica rotura y reunión entre las zonas homólogas de ADN, que es mediada mediante enzimas especializadas. La técnica permite reemplazar un alelo con una construcción de ingeniería sin afectar a ningún otro locus en el genoma. Usando recombinación homóloga es posible dirigir la inserción de un transgen a un locus conocido específico del genoma de las células anfitrión. Conociendo la secuencia ADN del locus diana, es posible reemplazar cualquier gen con una construcción de ADN genéticamente modificada, reemplazando o suprimiendo de ese modo la secuencia diana. La técnica comprende descubrir y aislar el gen normal y después determinar su función reemplazándola in vivo con una copia defectuosa. Este procedimiento se conoce como "noqueado génico", que permite dirigir un gen específico aprovechándose de la recombinación homóloga. Las copias clonadas del gen diana son alteradas para hacerlas no funcionales y son después introducidas en células ES donde se recombinan con el gen homólogo en el genoma de la célula, reemplazando el gen normal con una copia no funcional.

35 La recombinación homóloga puede ser aprovechada de manera similar para generar genes de fusión o la inserción de mutaciones puntuales en una estrategia de "activación", en la que un vector diana, que comprende un exón relevante del locus diana fusionado con la secuencia de ADNc de la pareja de fusión-translocación cromosómica, es transfectada en células madre embrionarias, por lo que la secuencia recombinante se fusiona con un gen endógeno para generar la fusión de un gen.

40 Otra técnica aplicable que aprovecha el fenómeno denominado interferencia de ARN (ARNi), en que ARN de pequeña interferencia de 21 nucleótidos (ARNpi) puede provocar una eficaz degradación de los ARN específicos. La interferencia de ARN constituye un nuevo nivel de regulación génica en células eucariotas. Se basa en el hecho de que la presencia de ARN de doble cadena en una célula elimina la expresión de un gen de la misma secuencia, mientras que la expresión de otros genes no relacionados se deja inalterada. El ARNpi estimula la maquinaria celular para trocear otro ARN de una sola cadena que tiene la misma secuencia que el ARNpi. En una realización preferida de la presente invención, los ARNpi son dirigidos hacia ApoE porcina y/o LDL porcina. En una realización, el ARNpi puede ser seleccionado a partir de secuencias de ARNpi, descritas en el presente documento.

45 Las modificaciones genéticas introducidas en el genoma porcino antes o durante el procedimiento de HMC pueden ser también modificaciones epigenéticas (p. ej., metilación de ADN o metilación o acetilación/desacetilación de histonas) al incubar células somáticas, ovocitos o embriones reconstruidos de la HMC con componentes químicos tal como tricostatina o compuestos con un efecto similar.

50 La presente invención se refiere a un cerdo de tamaño miniatura, blastocisto, embrión, feto y/o célula donante modificados que comprenden un determinante genético en forma de al menos una mutación en el gen ApoE endógeno, y por ello porcino, y/o al menos una mutación en un gen LDL endógeno, y por ello porcino, de forma separada o en combinación como se describe en detalle en el presente documento.

55 La presente invención también se refiere a embriones, blastocistos y/o fetos porcinos derivados de un cerdo de tamaño miniatura modificado que expresa al menos un fenotipo asociado con la aterosclerosis.

Está dentro del alcance de la presente invención que el cerdo de tamaño miniatura, blastocisto, embrión, feto y/o

célula donante modificados comprenden al menos una mutación, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 15 mutaciones en el gen ApoE y/o en el gen LDL.

5 En una realización de la presente invención el cerdo de tamaño miniatura modificado de acuerdo con la presente invención es mutado en el gen ApoE o parte del mismo, en el producto de la transcripción y/o de la traducción o parte del mismo (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:2) y/o en el gen LDL o parte del mismo, producto de la transcripción y/o de la traducción o parte del mismo (SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:4)). Los genes son mutados así que la función del gen es interrumpida. Se comprende que una mutación y/o una función interrumpida del gen dará como resultado una reducción de la cantidad de producto de la transcripción o parte del mismo y/o producto de la traducción o parte del mismo de dicho gen comparada con la cantidad de producto de la transcripción y/o de la traducción del gen en cuestión, en el presente documento el gen ApoE y/o el gen LDL.

Sin embargo, en otra realización el cerdo de tamaño miniatura transgénico es transgénico por una combinación de mutaciones, por ejemplo al menos una mutación en el gen ApoE endógeno porcino y/o al menos una mutación en el gen LDL endógeno porcino.

15 Las mutaciones introducidas en el gen ApoE endógeno porcino y/o en el gen LDL endógeno porcino o parte del mismo pueden ser introducidas por cualquier procedimiento conocido por la persona experta en la técnica. En una realización, se introduce, al menos, una mutación mediante el noqueado a través de recombinación homóloga. Sin embargo, en otra realización preferida, al menos una mutación está en la forma de una disminución en la cantidad de producto de la transcripción y/o de la traducción o parte del mismo del gen ApoE endógeno y/o del LDL endógeno comparada con la cantidad de producto de la transcripción y/o de la traducción o parte del mismo de un gen ApoE y/o un gen LDL silvestres. Un procedimiento preferido para disminuir la cantidad de ApoE y/o LDL producto de la transcripción y/o de la traducción o parte del mismo es mediante el uso de los ARN pequeños de interferencia (ARNpi) dirigidos contra los productos transcripcionales o partes del mismo del gen ApoE y/o del gen LDL. En una realización preferida, el producto de la transcripción o parte del mismo del gen LDL es dirigido. Dianas no limitantes de los ARN pequeños de interferencia con expresión disminuida de los receptores LDL se muestran en la Tabla 1. Cada una de las dianas se pueden escoger de forma separada, o en cualquier combinación. En una realización preferida la diana es T8. En otra realización la diana preferida es T9.

Tabla 1.

Dianas de los ANRhc dirigidos al receptor de LDL con expresión disminuida		
	Primera base en la secuencia AF065990 del ADNc del cerdo	Secuencia
T1	763	tgtaaagcggcgagtga
T2	889	tccatatctgcaatgacc
T3	1150	accctggaccgtagtgagt
T4	1308	tgacaccattattggcgaa
T5	1309	gacaccattattggcgaag
T6	1439	agactcttccaagagaa
T7	1553	tgaacggagtggacgtcta
T8	1814	tcacaggctcggacataca
T9	858	CCAACGAGTGTCTGGACAA
T10	1109	CCTACCTCTTCTTCACCAA

30 Una o más mutaciones del gen ApoE y/o LDL pueden estar en la zona codificante del gen ApoE y/o LDL, sin embargo, una o más mutaciones del gen ApoE y/o LDL pueden ser también determinadas en al menos una secuencia reguladora del gen ApoE y/o LDL. Por secuencia reguladora se pretende indicar secuencias que regulan

5 el proceso de la transcripción y de la traducción, por ejemplo, promotores, potenciadores, secuencias que afectan a la poliadenilación, inicio de la traducción o de la transcripción, y corte y empalme de productos transcripcionales. Los promotores y potenciadores que controlan la transcripción de genes que codifican proteínas están compuestos de múltiples elementos genéticos. La maquinaria celular es capaz de reunir e integrar la información reguladora transmitida por cada elemento, permitiendo que genes diferentes desarrollen distintos, a menudo complejos, patrones de regulación transcripcional. Los genes ApoE y/o LDL pueden, alternativamente, ser mutados en uno o más de sus exones.

10 En una realización, el gen ApoE endógeno porcino del cerdo de tamaño miniatura, embrión, blastocisto, célula donante y/o feto de la presente invención genéticamente modificados es mutado en uno o más de sus exones, interrumpiendo así la función génica de la ApoE. Por ello, puede ser mutado cualquier exón 1, exón 2, exón 3, o exón 4 del gen ApoE porcino. El exón 1 está situado en el nucleótido 832-857 del gen ApoE porcino, el exón 2 en el nucleótido 1663-1728, el exón 3 en los nucleótidos 2473-2662, el exón 4 en los nucleótidos 3037-3879 del gen ApoE porcino. En una realización preferida, uno o más exones de la ApoE y/o de la LDL es mutado interrumpiendo el exón debido a la inserción de una construcción de nucleótidos por recombinación homóloga y tecnología de noqueado.

15 Es más, se comprende que el cerdo de tamaño miniatura, embrión, blastocisto, célula donante y/o feto de la presente invención genéticamente modificados comprende el producto de la transcripción o parte del mismo y/o el producto de la traducción o parte del mismo de los genes ApoE y/o LDL porcinos como se ha descrito anteriormente.

20 En la mayoría de los casos de aterosclerosis, el componente genético es complejo, pero en algunos casos la herencia de la enfermedad es monogénica. Estos casos son principalmente causados por mutaciones en genes que codifican proteínas implicadas en el tráfico de lipoproteínas, y los más graves en humanos son causados por mutaciones que afectan a la lipoproteína mediada por el receptor de LDL (hipercolesterolemia familiar dominante recesiva y autosómica).

Identidad de secuencias

25 En el presente documento se usan equivalentes y variantes funcionales de forma intercambiable. En una realización preferida de la invención, se proporcionan también variantes del gen del receptor de LDL y/o de la apolipoproteína A. Si son polipéptidos, las variantes se determinan en base a su grado de identidad o su homología con una secuencia predeterminada de aminoácidos, siendo dicha secuencia predeterminada de aminoácidos productos de los genes del receptor de LDL y/o de la apolipoproteína A como se describe en el presente documento, o, si la variante es un fragmento, un fragmento de cualquiera de las secuencias de aminoácidos anteriormente mencionadas, respectivamente.

30 En consecuencia, las variantes tienen, preferiblemente, al menos una identidad de secuencias del 91 %, por ejemplo al menos una identidad de secuencias del 91 %, tal como al menos una identidad de secuencias del 92 %, por ejemplo al menos una identidad de secuencias del 93 %, tal como al menos una identidad de secuencias del 94 %, por ejemplo al menos una identidad de secuencias del 95 %, tal como al menos una identidad de secuencias del 96 %, por ejemplo al menos una identidad de secuencias del 97 %, tal como al menos una identidad de secuencias del 98 %, por ejemplo una identidad de secuencias del 99 % con la secuencia predeterminada.

Las siguientes expresiones se usan para describir las relaciones de las secuencias entre dos o más polinucleótidos: "secuencia predeterminada", "ventana de comparación", "identidad de secuencias", "porcentaje de identidad de secuencias" e "identidad sustancial".

40 Una "secuencia predeterminada" es una secuencia definida usada como una base para una comparación de secuencias; una secuencia predeterminada puede ser un subconjunto de una secuencia mayor, por ejemplo, como un segmento de una secuencia de un ADN o gen en toda su longitud dada en un listado de secuencias, tal como una secuencia polinucleotídica de los genes del receptor de LDL y/o de la apolipoproteína A como se describe en el presente documento o pueden comprender una secuencia de ADN o de gen completa. Generalmente, una secuencia predeterminada tiene al menos 20 nucleótidos de longitud, frecuentemente al menos 25 nucleótidos de longitud, y a menudo al menos 50 nucleótidos de longitud.

50 Como dos polinucleótidos pueden cada uno (1) comprender una secuencia (es decir, una parte de la secuencia polinucleotídica completa) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) pueden comprender además una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos se llevan a cabo típicamente comparando secuencias de los dos polinucleótidos sobre una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencias. Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento conceptual de al menos 20 posiciones de nucleótidos contiguos en la que una secuencia polinucleotídica puede ser comparada con una secuencia predeterminada de al menos 20 nucleótidos contiguos y en la que la parte de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, huecos) de 20 por ciento o menos comparado con la secuencia predeterminada (que no comprende adiciones ni supresiones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias.

El alineamiento óptimo de las secuencias para alinear un ventana de comparación puede ser conducido por el

algoritmo de la homología local de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482, por el algoritmo de la homología de alineamiento de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, mediante la investigación del procedimiento de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 2444, mediante aplicaciones por ordenador de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o por inspección, y se selecciona el mejor alineamiento (es decir, dando como resultado el más elevado porcentaje de homología sobre la ventana de comparación) generado por los diversos procedimientos.

La expresión "identidad de secuencias" significa que dos secuencias polinucleotídicas son idénticas (es decir, en una base nucleótido-a-nucleótido) sobre la ventana de comparación. La expresión "porcentaje de identidad de secuencias" se calcula comparando dos secuencias óptimamente alineadas sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntica (p. ej., A, T, C, G, U, o I) aparece en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencias. La expresión "identidad sustancial" como se usa en el presente documento indica una característica de una secuencia polinucleotídica, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos una identidad de secuencias del 85 por ciento, preferiblemente, al menos una identidad de secuencias del 90 al 95 por ciento, más normalmente al menos una identidad de secuencias del 99 por ciento comparado con una secuencia predeterminada sobre una ventana de comparación de al menos posiciones de 20 nucleótidos, frecuentemente sobre una ventana de al menos 25-50 nucleótidos, en la que el porcentaje de identidad de secuencias se calcula comparando la secuencia predeterminada con la secuencia polinucleotídica que puede incluir supresiones o adiciones cuyo total es 20 por ciento o menos de la secuencia predeterminada sobre la ventana de comparación. La secuencia predeterminada puede ser un subconjunto de una secuencia mayor, por ejemplo, como un segmento de la secuencia polinucleotídica del gen receptor de LDL y/o apolipoproteína A de longitud completa, ilustrada en el presente documento.

La identidad de secuencias se determina en una realización utilizando fragmentos de secuencia de ApoE porcino o humano, o péptidos de LDL porcino o humano, péptidos PCSK9 porcino o humano que comprenden al menos 25 aminoácidos contiguos y que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, tal como 85 %, por ejemplo 90 %, tal como 95 %, por ejemplo 96 %, tal como 97 %, por ejemplo 98 %, tal como 99 % idéntica a los aminoácidos descritos en el presente documento, en la que la identidad en tanto por ciento se determina con el algoritmo GAP, BESTFIT o FASTA en la Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, utilizando pesos de huecos por defecto.

Sustituciones de aminoácidos conservativas:

Las sustituciones dentro de los grupos de aminoácidos, mostrados más abajo, se consideran sustituciones de aminoácidos conservativas. Las sustituciones entre los diferentes grupos de aminoácidos se consideran sustituciones de aminoácidos no conservativas.

P, A, G, S, T (neutra, débilmente hidrófoba)

Q, N, E, D, B, Z (hidrófila, aminoácido)

H, K, R (hidrófila, básica)

40 F, Y, W (hidrófoba, aromática)

L, I, V, M (hidrófoba)

C (formación de entrelazamientos)

Mediante la expresión "productos de la transcripción o de la traducción" se pretende indicar en el presente documento productos de la transcripción del gen, tal como un transcrito de ARN, por ejemplo un transcrito de ARN sin proceso de corte y empalme, un transcrito de ARNm y dichos productos de corte y empalme del transcrito de ARNm, y productos de la traducción del gen, tal como polipéptido o polipéptidos traducidos de cualquiera de los transcritos de ARNm del gen y varios productos del procesado posterior a la traducción de dichos polipéptidos, tal como los productos del procesado proteolítico posterior a la traducción del polipéptido o polipéptidos o productos de varias modificaciones posteriores a la traducción de dicho polipéptido o polipéptidos.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "producto de la transcripción del gen" se refiere a una molécula de ARN premensajero, pre-ARNm, que contiene la misma información de secuencia (si bien, los nucleótidos U reemplazan a los nucleótidos T) que el gen, o la molécula de ARN mensajero maduro, ARNm, que era producida debido a corte y empalme del pre-RNA, y es un molde para la traducción de información genética del gen en una proteína.

55

Fenotipos

5 Son muchos los fenotipos asociados con la aterosclerosis. Se comprende que el modelo de cerdo de tamaño miniatura de la presente invención expresa al menos un fenotipo asociado con la aterosclerosis, tal como tres, por ejemplo cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 fenotipos asociados con la aterosclerosis. Ejemplos no limitantes de dichos fenotipos son hipercolesterolemia, acumulación de grasa, colesterol y otras sustancias en las paredes de las arterias, formación de placa, estenosis, obstrucción del flujo sanguíneo, ruptura de la placa, infarto, y/o claudicación.

10 Al menos un fenotipo asociado con la aterosclerosis es la hipercolesterolemia. La hipercolesterolemia es un aumento en la cantidad de colesterol comparado con un nivel estándar en el cerdo de tamaño miniatura observado antes del comienzo de un aumento en la cantidad de colesterol o comparado con un nivel estándar determinado de una población de cerdos. La cantidad de colesterol se mide, preferiblemente, en el plasma de los cerdos. Un aumento en colesterol en plasma es al menos 10 % comparado con un nivel estándar, tal como al menos 15 %, por ejemplo 20 %, tal como 25 %, por ejemplo 30 %, tal como al menos 35 %, por ejemplo al menos 40 %, tal como al menos 45 %, por ejemplo al menos 50 %, tal como al menos 55 %, por ejemplo al menos 60 %, tal como al menos 65 %, por ejemplo al menos 70 %, tal como al menos 75 %, por ejemplo al menos 80 %, tal como al menos 85 %, por ejemplo al menos 90 %, tal como al menos 95 %, por ejemplo al menos 100 %, tal como al menos 110 %, por ejemplo al menos 120 %, tal como al menos 150 %, por ejemplo al menos 175 %, tal como al menos 200 %, por ejemplo al menos 250 %, tal como al menos 300 %, por ejemplo al menos 350 %, tal como al menos 400 %, por ejemplo al menos 450 %, tal como al menos 500 comparados con un nivel estándar.

20 Por ello, un aumento de un 10 % en hipercolesterolemia en un cerdo que tiene un nivel estándar de 2 mmol/l corresponde a una cantidad de colesterol de 2,2 mmol/l.

25 Los fenotipos asociados con la aterosclerosis comprenden la acumulación de grasa, colesterol y otras sustancias en las paredes de las arterias y forman placas. Finalmente, los depósitos de placa pueden hacer las arterias menos flexibles. El endurecimiento de la arteria puede dar como resultado una disminución en el flujo sanguíneo (estenosis) e incluso la obstrucción del flujo sanguíneo. Como consecuencia, un insuficiente suministro de sangre a los órganos. La arteria puede compensar el estrechamiento de la arteria mediante el alargamiento de la arteria que si es excesivo lleva a la formación de un aneurisma. Si disminuye el flujo sanguíneo en las arterias que llevan al corazón, puede aparecer dolor torácico. También pueden romperse placas (ruptura de placa), dando lugar a piezas de material que se mueven a través de la arteria, dando lugar a la formación de un trombo que ralentizará o detendrá el flujo sanguíneo, llevando a la muerte de los tejidos afectados por la detención del flujo sanguíneo, también conocido como infarto. Esta es una causa común del ataque al corazón y del accidente cerebrovascular. Alrededor de los depósitos de placa también pueden formarse coágulos de sangre. Los coágulos bloquean el flujo sanguíneo. Si el coágulo llega al corazón, a los pulmones o al cerebro, puede causar un accidente cerebrovascular, un ataque al corazón o un embolismo pulmonar.

35 También, la claudicación debida a insuficiente suministro de sangre a las piernas, típicamente debido a una combinación tanto de estenosis como de aneurisma de segmentos estrechados por coágulos es una realización de los fenotipos asociados con la aterosclerosis. Otro fenotipo de cerdo de tamaño miniatura genéticamente modificado es la hipercolesterolemia en la que se observan sistemáticamente altos niveles de lipoproteína de baja densidad (LDL) comparado con los niveles normales, que conducen a la aterosclerosis prematura de las arterias coronarias. Típicamente en los hombres afectados, el ataque al corazón ocurre en sus 40 a 50. En humanos, la hipercolesterolemia está a menudo en la forma de hipercolesterolemia familiar que es principalmente debido a mutaciones en genes que codifican proteínas implicadas en el tráfico de las lipoproteínas, causado por mutaciones nulas del homocigoto en el receptor de LDL.

45 Existe un número de pruebas que ayudan en la diagnosis de la aterosclerosis que son conocidas por la persona experta en la técnica tal como una prueba de esfuerzo cardíaco que es una prueba médica realizada para evaluar la circulación de la sangre arterial hacia el miocardio (músculo del corazón) durante el ejercicio físico, comparado con la circulación de la sangre en reposo. También se usa ultrasonido de baja intensidad para detectar la velocidad del flujo sanguíneo en las arterias conocido como estudio Doppler, arteriografía por resonancia magnética, escaneo CT, arteriografía utilizando rayos X y para diagnosticar la aterosclerosis se usan colorante especial para ver dentro de las arterias, ultrasonido intravascular y/o escaneo dúplex ultrasónico.

50 Procedimientos para producir un modelo de cerdo de tamaño miniatura para estudiar la aterosclerosis

La presente invención proporciona procedimientos mejorados para la clonación de cerdos por transferencia nuclear que se refiere a la introducción de un complemento completo de ADN nuclear de una célula a una célula enucleada. El cerdo de tamaño miniatura genéticamente modificado de la presente invención puede ser obtenido utilizando cualquier técnica en la que se transfiera material genético modificado, producto de la transcripción y/o de la traducción o parte del mismo desde en la célula donante hasta una célula anfitriona, tal como un ovocito enucleado. Existe un número de técnicas tal como la introducción de material genético desde una célula somática genéticamente modificada hasta un ovocito enucleado, por ejemplo, mediante microinyección o por transferencia nuclear

En la clonación, la transferencia del núcleo de una célula (cuerpo) somática o célula somática en una célula huevo (ovocito) al que se ha quitado su propio núcleo (desnucleado o enucleado) se denomina transferencia nuclear de célula somática. El nuevo individuo se desarrollará a partir de este embrión reconstruido y será genéticamente idéntico al donante de la célula somática.

- 5 El modelo de cerdo de tamaño miniatura, embrión porcino, blastocisto y/o feto modificado obtenible por transferencia nuclear de célula somática que comprende las etapas de a) establecer al menos un ovocito que tiene al menos una parte de una zona pelúcida modificada, b) separar el ovocito en al menos dos partes obteniendo al menos un citoplasto, c) establecer una célula donante o núcleo de célula que tenga propiedades genéticas deseadas, d) fusionar al menos un citoplasto con la célula donante o núcleo de célula rodeado por membrana, e) obtener un
10 embrión reconstruido, f) activar el embrión reconstruido para formar un embrión; y g) transferir dicho embrión cultivado a un mamífero anfitrión de manera que el embrión se desarrolle en un feto genéticamente modificado, en el que dicho embrión genéticamente modificado obtenible por transferencia nuclear comprende las etapas a) a e) y/o f), en el que dicho blastocisto genéticamente modificado obtenible por transferencia nuclear comprende las etapas a) a e) y/o f), en el que dicho feto genéticamente modificado obtenible por transferencia nuclear comprende las etapas a) a g).

El ovocito de b) puede, en otra realización, ser separado en al menos tres partes obteniendo al menos dos citoplastos. Se comprende que la célula donante o el núcleo de célula de c) alberga determinantes genéticos para aterosclerosis, por ejemplo en la forma del gen ApoE humano o porcino modificado o parte del mismo y/o gen LDL humano o porcino modificado o parte del mismo. El mamífero anfitrión de g) es, en una realización, un cerdo, preferiblemente, un cerdo de tamaño miniatura Yucatán.

Ovocito

El término "ovocito" de acuerdo con la presente invención quiere decir una célula reproductora hembra inmadura, la que no ha completado el proceso de maduración para formar un óvulo (gameto). En la presente invención un ovocito enucleado es la célula receptora en el proceso de transferencia nuclear.

- 25 Los ovocitos de acuerdo con la presente invención son aislados de oviductos y/u ovarios de un mamífero. Normalmente, los ovocitos son recuperados de los cerdos muertos, aunque pueden ser aislados también de oviductos y/u ovarios de cerdos vivos. En una realización, los ovocitos son aislados por procedimientos de recuperación oviductal o por métodos de recuperación transvaginal. En una realización preferida, los ovocitos son aislados por aspiración. Los ovocitos son típicamente madurados en un variedad de medios conocidos por una
30 persona experta en la técnica antes de la enucleación. Los ovocitos también pueden ser aislados a partir de los ovarios de un animal recientemente sacrificado o cuando el ovario ha sido congelado y/o descongelado. Preferiblemente, se emplean ovocitos recién aislados de los oviductos.

Los ovocitos o citoplastos pueden ser también criopreservados antes de usar. Aunque se comprenderá por los expertos en la técnica que los preferidos son los ovocitos recién aislados y madurados, también se comprenderá que es posible criopreservar los ovocitos después de la recolección o después de maduración. Si se utilizan ovocitos criopreservados después deben ser inicialmente descongelados antes de colocar los ovocitos en el medio de la maduración. Los procedimientos de la descongelación de materiales criopreservados de manera que sean activos después del proceso de la descongelación son bien conocidos por aquellos de experiencia normal en la técnica. Sin embargo, en general, la criopreservación de ovocitos y citoplastos es un procedimiento muy exigente, y es especialmente difícil en los cerdos, debido a la fragilidad general anteriormente mencionada de los ovocitos y citoplastos de cerdo, y debido al alto contenido de lípidos que los hace muy sensibles a lesiones por frío (es decir, lesiones que aparecen entre +15 y +5°C durante el procedimiento de enfriamiento y calentamiento).

En otra realización, ovocitos maduros (metafase II) que han sido madurados in vivo, pueden ser recolectados y empleados en los procedimientos de transferencia nuclear divulgados en el presente documento. Esencialmente, los ovocitos maduros de la metafase II son recolectados quirúrgicamente a partir bien de cerdos no superovulados o bien superovulados 35 a 48 horas pasado el comienzo del estro o pasada la inyección de gonadotropina coriónica humana (hCG) u hormona similar.

Si los ovocitos han sido cultivados in vitro, las células cúmulo que están rodeando los ovocitos in vivo pueden tener acumulados que pueden ser retirados para proporcionar ovocitos que están en un estadio más adecuado de maduración para la enucleación. Las células cúmulo pueden ser retiradas pipeteando o mediante vórtex, por ejemplo, en presencia de hialuronidasa en el intervalo de 0,1 a 5 %, tal como en el intervalo de 0,2 a 5 % de hialuronidasa, por ejemplo en el intervalo de 0,5 a 5 % de hialuronidasa, tal como en el intervalo de 0,2 a 3 % de hialuronidasa, por ejemplo en el intervalo de 0,5 a 3 % de hialuronidasa, tal como en el intervalo de 0,5 a 2 % de hialuronidasa, por ejemplo en el intervalo de 0,5 a 1 % de hialuronidasa, tal como 0,5 % de hialuronidasa.

- 55 La primera etapa en los procedimientos preferidos supone el aislamiento de un ovocito receptor de un cerdo de tamaño miniatura adecuado. A este respecto, el ovocito pueden ser obtenido de cualquier fuente de cerdo de tamaño miniatura y en cualquier estadio de maduración.

Se ha informado que el estadio de maduración del ovocito de enucleación y la transferencia nuclear tiene

importancia en el éxito de los métodos de transferencia nuclear. Los ovocitos inmaduros (profase I) de los ovarios de cerdo son a menudo recolectados por aspiración. Con el fin de emplear técnicas tal como ingeniería genética, transferencia nuclear y clonación, los ovocitos recolectados de este tipo son preferiblemente, madurados in vitro antes de que las células ovocito puedan ser usadas como células receptoras para la transferencia nuclear.

- 5 Preferiblemente, la clonación con éxito del embrión de cerdo utiliza el ovocito en el estadio de la metafase II como ovocito receptor porque se cree que en este estadio de maduración el ovocito puede ser o está suficientemente activado para tratar el núcleo introducido como si fuera un espermatozoides fertilizante. Sin embargo, la presente invención se refiere a cualquier estadio de maduración del ovocito que sea adecuado para llevar a cabo la transferencia nuclear de la célula somática, embriones, blastocistos y/o cerdos transgénicos obtenibles por el procedimiento de transferencia nuclear de célula somática de la presente invención.

La maduración in vitro de ovocitos normalmente tiene lugar en un medio de maduración hasta que el ovocito ha alcanzado la etapa de metafase II o ha extruido el primer cuerpo polar. El tiempo que emplea un ovocito inmaduro en alcanzar la maduración se denomina período de maduración.

- 15 En una realización preferida de la presente invención, el ovocito es de una cerda adulta o de una cerda joven, preferiblemente, de una cerda adulta.

El donante (célula somática o núcleo de célula somática) y el receptor (citoplasto) involucrados en el procedimiento de transferencia nuclear de la célula de acuerdo con la presente invención es un cerdo. Así mismo, los embriones reconstruidos pueden ser implantados en un cerdo de acuerdo con la presente invención. Los diferentes cerdos adecuados como donante, receptor o madre adoptiva se describen en otra parte en el presente documento.

- 20 El cerdo donante de acuerdo con la presente invención puede ser hembra o macho. La edad del cerdo de tamaño miniatura puede ser cualquier edad tal como adulto o, por ejemplo, feto.

Embrión

- 25 De acuerdo con la presente invención, un embrión reconstruido (es decir, un embrión de una sola célula) contiene el material genético de la célula donante. Posteriormente, el embrión reconstruido se divide progresivamente en un embrión multicelular después del comienzo de la mitosis. In vitro, el comienzo de la mitosis es típicamente inducido por activación como se describe en el presente documento.

En la presente invención, el término "embrión" se refiere también a los embriones reconstruidos que son embriones formados después del proceso de transferencia nuclear después del comienzo de la mitosis por activación. Los embriones reconstruidos se cultivan in vitro.

- 30 Cuando el embrión contiene aproximadamente 12-16 células se denomina "mórula". Posteriormente, el embrión se divide adicionalmente y se forman muchas células, y una cavidad cística llena de fluido dentro de su centro, la cavidad blastocele. En este estadio, el embrión se denomina "blastocisto". El estadio de desarrollo del ovocito "fertilizado" en el momento es fácil de implantar; formado a partir de la mórula y consiste en una masa celular interna, una cavidad interna y una capa externa de células denominadas células del trofoectodermo.

- 35 El blastocisto de acuerdo con la presente invención puede ser implantado en el útero de un mamífero anfitrión y continúa creciendo hasta feto y después hasta animal.

- 40 En los procedimientos proporcionados en el presente documento para obtener un mamífero no humano genéticamente modificado o transgénico, para la clonación de un mamífero no humano, para el cultivo de un embrión reconstruido, y/o para la criopreservación de un embrión de cerdo, el embrión puede ser cultivado in vitro. El embrión puede, por ejemplo, ser cultivado en cultivo secuencial. Se comprenderá que el embrión puede ser un embrión normal o un embrión reconstruido como los definidos en otra parte en el presente documento.

- 45 La presente invención se refiere, por ello, a un embrión porcino modificado, blastocisto y/o feto derivados del modelo de cerdo de tamaño miniatura genéticamente modificado como se divulga en el presente documento y/o el embrión porcino modificado comprende al menos un gen ApoE humano modificado o parte del mismo y/o el gen LDL humano y/o el gen ApoE porcino y/o el gen LDL porcino.

Se comprende que el embrión porcino modificado, blastocisto y/o feto derivados del modelo de cerdo de tamaño miniatura modificado para estudiar la aterosclerosis, que expresa al menos un fenotipo asociado con la aterosclerosis pueden haber sido el resultado del cruce de, por ejemplo, un cerdo transgénico para al menos una mutación de la ApoE y un cerdo transgénico para al menos una mutación de la LDL.

- 50 Citoplasto

Un ovocito o un parte de un ovocito del que se ha retirado el núcleo.

Célula donante

Mediante la expresión "célula donante" de la presente invención se pretende indicar célula somática y/o células derivadas de la línea germinal.

5 Mediante la expresión "célula somática" de la presente invención se pretende indicar cualquier célula (cuerpo) de un animal en cualquier estadio del desarrollo. Por ejemplo, las células somáticas pueden provenir de tejido fetal o adulto. Células somáticas especialmente preferidas son las de origen fetal. Sin embargo, también pueden usarse células de una línea germinal. De acuerdo con la presente invención una célula donante es una célula somática. En otra realización de la presente invención, la célula donante es una célula derivada de una línea de células germinales.

10 En una realización preferida de la presente invención, la célula donante alberga propiedades genéticas deseadas. Sin embargo, la célula donante puede albergar propiedades genéticas deseadas que han sido adquiridas por manipulación genética como se describe en otra parte en el presente documento.

15 Las células somáticas se seleccionan del grupo constituido por células epiteliales, células neuronales, células epidérmicas, queratinocitos, células hematopoyéticas, melanocitos, condrocitos, linfocitos (linfocitos B y T), eritrocitos, macrófagos, monocitos, células mononucleares, fibroblastos, células musculares cardíacas, y otras células musculares.

Estas pueden obtenerse de diferentes órganos, p. ej., piel, pulmón, páncreas, hígado, estómago, intestino, corazón, órganos reproductores, vejilla, riñón, uretra y otros órganos urinarios.

20 Los cerdos de tamaño miniatura a partir de los cuales se pueden derivar las células somáticas se describen en otra parte en el presente documento. Una realización preferida de la invención es el empleo de células somáticas que provienen de la misma especie que el ovocito receptor (citoplasto).

Preferiblemente, las células somáticas son células fibroblastos ya que pueden obtenerse tanto de los fetos en desarrollo como de los animales adultos en grandes cantidades. Los fibroblastos pueden además reproducirse fácilmente in vitro. Lo más preferiblemente, las células somáticas son fibroblastos de origen fetal cultivados in vitro.

25 En una realización preferida, las células somáticas son modificadas genéticamente. Todavía en una realización más preferida de la presente invención, las células somáticas son, preferiblemente, de origen fetal o, por ejemplo, de adultos.

30 La presente invención se refiere, por ello, a una célula donante porcina modificada derivada del modelo de cerdo de tamaño miniatura genéticamente modificado como se divulga en el presente documento y/o el embrión porcino modificado comprende al menos un gen ApoE humano modificado y/o el gen LDL humano y/o el gen ApoE porcino y/o el gen LDL porcino, producto de la transcripción y/o de la traducción o parte del mismo.

35 Se comprende que la célula donante porcina modificada del modelo de cerdo de tamaño miniatura modificado para estudiar la aterosclerosis, que expresa al menos un fenotipo asociado con la aterosclerosis puede haber sido el resultado del cruce de, por ejemplo, un cerdo transgénico para al menos una mutación de la ApoE y un cerdo transgénico para al menos una mutación de la LDL.

Tipo de modificación genética

40 Las células donantes pueden ser modificadas genéticamente por cualquier procedimiento estándar conocido en la técnica. La modificación genética puede ser una modificación del ADN genómico por supresión, inserción, duplicación y/u otras formas de mutación, incluida la mutación puntual. La modificación puede hacerse en secuencias codificantes y/o en secuencias no codificantes. Las construcciones de ADN para la inserción pueden albergar un gen de interés y/o secuencias reguladoras tal como promotores, aisladores, potenciadores, represores o sitios de entrada al ribosoma.

45 En algunas realizaciones, en el genoma sólo se introduce una modificación genética. En otras realizaciones, sin embargo, el genoma puede ser modificado en más de un sitio. Técnicas adecuadas para modificación genética de células de mamífero, tal como fibroblastos, incluyen técnicas tal como adición génica por recombinación no homóloga, sustitución génica por recombinación homóloga y corrección génica. Esto puede incluir el empleo de inserción retroviral, transferencia de transposón y/o técnicas cromosómicas artificiales. La recombinación ADN no homólogo puede, p. ej., llevarse a cabo como se describe en Kragh et al. (2004) *Reprod. Fert. Dev.* 16:290 o en Kragh et al. (2004) *Reprod. Fert. Dev.* 16:315, la transferencia del gen basado en el transposón puede llevarse a cabo como se describe en Izsvak et al. (1997) *célula* 91:501. La sustitución génica por recombinación homóloga puede, p. ej., implicar las técnicas descritas por Uranow et al. (2005) *Nature* 435:646. Las técnicas para la edición génica se han descrito en Andersen et al. (2002) *J. Mol. Med.* 80:770, Liu et al (2002) *Gene Ther.* 9:118 y Sørensen et al. (2005) *J. Mol. Med.* 83:39.

En una realización preferida, la célula donante es genéticamente modificada por integración aleatoria, recombinación

homóloga de los genes divulgados en el presente documento en el genoma de la célula donante.

En una realización preferida de la presente invención, la célula donante es genéticamente modificada (como se describe en una solicitud de patente en tramitación junto con la presente). La célula donante o el núcleo transportan un genoma marcado con SB que contiene un sitio diana de recombinación Flp para la inserción o integración del gen específico para el sitio. El genoma marcado con SB resulta de la integración de un vector diana recombinante que comprende una construcción de un trasposón de ADN y un casete de gen bicistrónico que comprende (i) un sitio de recombinación FRT y (ii) un gen de selección controlado por IRES. La construcción de un trasposón de ADN puede ser cualquier construcción en la que esté presente cualquier trasposón de ADN. En la presente invención, la construcción del trasposón de ADN es el vector trasposón de ADN Sleeping Beauty (SB). El sitio de recombinación FRT puede estar incorporado en la secuencia codificante de un gen de selección que permite detectar si ha tenido lugar una transposición. El gen de selección de la presente invención no se limita a ningún gen de selección particular. En realizaciones preferidas el gen de selección son genes que confieren resistencia a los antibióticos o a los fármacos, tal como los genes con resistencia a la puromicina, tetraciclina, estreptomycinina o higromicina, o el gen de la proteína verde fluorescente potenciado (eGFP), genes de la proteína roja fluorescente o similares.

El sitio de recombinación FRT puede, por ello, ser incorporado en una variante de la fusión accionada por el promotor SV40 del gen de selección. Sin embargo, de acuerdo con la presente invención, puede usarse cualquier promotor adecuado para conferir la expresión de un gen de selección. Ejemplos no limitantes de tales promotores son CMV (citomegalovirus) o promotor PGK.

El gen de selección controlado por IRES no se limita de forma similar a ningún gen de selección particular. En realizaciones preferidas, el gen de selección son genes que confieren resistencia a los antibióticos o fármacos, tal como genes con resistencia a puromicina, tetraciclina, estreptomycinina o higromicina, o el gen de la proteína verde fluorescente potenciado (eGFP), genes de la proteína roja fluorescente o similares.

La construcción del vector recombinante pueden también comprender al menos un sitio para la recombinasa Cre. Al menos un sitio de la recombinasa Cre puede estar situado como se divulga en los ejemplos en el presente documento.

La célula donante o el núcleo pueden también provenir de un cerdo de tamaño miniatura genéticamente modificado que comprende al menos un sitio para la integración de al menos un transgen. Una realización preferida es una célula donante o un núcleo en la forma de un fibroblasto, tal como un fibroblasto primario.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para producir una célula porcina que comprende un genoma marcado con SB que contiene un sitio diana de recombinación Flp para la inserción del gen específico del sitio. El procedimiento comprende las etapas de:

a) proporcionar una célula de mamífero, b) transfectar la célula de a) con un plásmido que expresa una transposasa y un vector diana recombinante que comprende una construcción de trasposón de ADN y un casete de gen bicistrónico que comprende (i) un sitio de recombinación FRT y (ii) un gen de selección controlado por IRES, c) seleccionar células marcadas con SB.

Como se ha descrito en otra parte en el presente documento la célula de mamífero puede ser cualquier célula. En una realización en la que la célula porcina va a ser usada posteriormente para obtener un cerdo de tamaño miniatura genéticamente modificado por transferencia nuclear de acuerdo con el protocolo artesanal como se ha descrito en el presente documento, la célula porcina es, en una realización preferida, un fibroblasto y, lo más preferido, un fibroblasto primario porcino.

Se comprende que un transgen deseado puede integrarse directamente en el, al menos, un sitio para la integración presente en el genoma de la célula. Sin embargo, la célula en la que el genoma transporta al menos un sitio para la integración se usa, en otra realización, como una célula donante para la producción de un cerdo de tamaño miniatura genéticamente modificado, por ejemplo, mediante microinyección de la célula donante o del núcleo de la misma en un ovocito o mediante, por ejemplo, transferencia nuclear somática. En una realización preferida, la célula donante o el núcleo de la misma se usan para la obtención de un cerdo de tamaño miniatura genéticamente modificado por transferencia nuclear somática utilizando el procedimiento como se ha descrito en otra parte en el presente documento.

El transgen o gen de interés que se integrará en las células dirigidas de la presente invención no se limita a ningún gen particular. En una realización, el gen que se integrará es un gen causante de una enfermedad que da como resultado la formación de un cerdo de tamaño miniatura genéticamente modificado que presenta un fenotipo de interés. De acuerdo con la presente invención, el gen de interés que se integrará en la célula porcina es Apolipoproteína E (ApoE) y/o receptor de LDL.

La integración del transgen en al menos un sitio para la integración presente en el genoma del célula se emplea para transfección en la célula del ADN plasmídico que contiene el gen de interés y también sitios FRT, y un plásmido que expresa la Flp recombinasa usada para apoyar la integración en los sitios FRT.

Enucleación

El procedimiento de enucleación de un ovocito se puede seleccionar del grupo de procedimientos constituidos por aspiración, eliminación física, uso de fluorocromos específicos de ADN, exposición a la luz ultravioleta y/o enucleación químicamente asistida. En una realización, la presente invención se refiere al uso de fluorocromos específicos de ADN.

La enucleación puede, sin embargo, realizarse por exposición a la luz ultravioleta. En una realización particular, la enucleación es químicamente asistida antes de la eliminación física del núcleo. La enucleación químicamente asistida utilizando, por ejemplo, agentes antineoplásicos, tal como demecolcina (N-desacetil-N-metil-1-colquicina), y/o por ejemplo etopósido o agentes relacionados puede ser realizada antes de la modificación enzimática de la zona pelúcida. La enucleación químicamente asistida comprende cultivar COC madurados en el medio de maduración como se describe en otra parte en el presente documento complementado con demecolcina durante un período de tiempo particular. En el intervalo de 0,1 µg/ml a 10 µg/ml de demecolcina, tal como 0,2 µg/ml a 10 µg/ml, por ejemplo 0,3 µg/ml a 10 µg/ml, tal como 0,25 µg/ml a 5 µg/ml, por ejemplo 0,3 µg/ml a 1 µg/ml, tal como 0,25 µg/ml a 0,5 µg/ml, por ejemplo 0,4 µg/ml de demecolcina pueden ser complementados con el medio de maduración. De forma similar, el medio de maduración puede ser complementado con etopósido, por ejemplo, en el intervalo de 0,1 µg/ml a 10 µg/ml de etopósido, tal como 0,2 µg/ml a 10 µg/ml, por ejemplo 0,3 µg/ml a 10 µg/ml, tal como 0,25 µg/ml a 5 µg/ml, por ejemplo 0,3 µg/ml a 1 µg/ml, tal como 0,25 µg/ml a 0,5 µg/ml, por ejemplo 0,4 µg/ml de etopósido pueden ser complementados con el medio de maduración. El tiempo para el cultivo de los COC en presencia de agentes antineoplásicos varía desde 10 min a 5 horas, tal como 30 minutos a 5 horas, por ejemplo 10 minutos a 2 horas, tal como 30 min a 2 horas, por ejemplo 10 min a 1,5 horas, tal como 20 min a 3 horas, por ejemplo 10 min a 3 horas, tal como 30 min a 1,5 horas, por ejemplo 45 min.

En una realización particular, la enucleación químicamente asistida se realiza utilizando 0,45 µg/ml de demecolcina y/o etopósido añadido al medio de maduración durante 45 min.

En una realización particular, se prefiere que la enucleación sea mediante eliminación física del núcleo. La eliminación física puede ser por separación, por ejemplo, por bisección del ovocito en dos mitades (dos partes), una que contiene el núcleo y la mitad del ovocito enucleado, conocido como citoplasto, que retira la mitad nucleada del ovocito y que selecciona el citoplasto resultante en procedimientos adicionales de la invención. Alternativamente, la separación es por trisección, dando como resultado tres partes de las que dos partes son citoplastos. En otra realización, el ovocito puede ser separado en cuatro partes, dando como resultado la producción de tres citoplastos. El ovocito puede incluso ser separado en cinco partes por eliminación física, dando como resultado cuatro citoplastos. De forma similar, el ovocito pueden ser separado en seis partes, por ejemplo siete partes, tal como ocho partes, por ejemplo nueve partes, tal como diez o más partes.

La separación física del ovocito y posterior eliminación de la parte del ovocito que transporta el núcleo puede lograrse mediante el uso de una cuchilla microquirúrgica.

Los ovocitos pueden ser cribados para identificar qué ovocitos han sido enucleados con éxito. Las partes del ovocito que albergan ADN nuclear pueden ser identificados mediante tinción con fluorocromo Hoechst, cuyo procedimiento de tinción es conocido por una persona experta en la técnica. Las partes del ovocito que albergan ADN nuclear son desechadas y los ovocitos enucleados (citoplastos) son seleccionados para procedimientos adicionales.

Zona pelúcida

La zona pelúcida es una capa o envoltura no celular, gruesa, transparente, de espesor uniforme que rodea un ovocito

Generalmente, se considera que una zona pelúcida intacta es importante en la transferencia nuclear de la célula debido a varios parámetros. Un parámetro es mantener el cuerpo polar cerca de la placa metafase del ovocito con el fin de indicar el sitio apropiado para la enucleación. Otro parámetro se refiere al mantenimiento de la célula donante cerca del citoplasto ovocito antes y durante la fusión. También, se cree que la zona confiere protección a la célula donante y al citoplasto durante la fusión. Finalmente, se cree que el desarrollo del embrión después de la reconstitución y de la activación es apoyado por la zona pelúcida.

La modificación de, al menos, una parte de la zona pelúcida puede ser realizada por varios procedimientos. Por ejemplo, puede utilizarse la manipulación física para modificar la zona. Pero también puede emplearse el tratamiento químico con agentes tal como las soluciones ácidas (solución ácida de Tyrode). Un ejemplo de agentes químicos que se pueden emplear en la presente invención es el de las soluciones ácidas, por ejemplo Tyrode. En una realización particular de la invención, la zona pelúcida es modificada por digestión enzimática. Tal digestión enzimática puede ser realizada por enzimas que comprenden, por ejemplo, tripsina. Alternativamente, puede usarse una proteasa específica, tal como pronasa.

En una realización preferida, la digestión enzimática da como resultado, al menos, una digestión parcial de una parte de la zona pelúcida que, en una realización preferida de la presente invención quiere decir que al menos una parte de la zona pelúcida está siendo eliminada, o que la zona pelúcida es parcialmente eliminada. En el presente contexto,

la zona pelúcida no se elimina completamente.

De acuerdo con una realización especialmente preferida de la presente invención, la parte parcialmente digerida de la zona pelúcida se caracteriza porque la zona pelúcida es todavía visible y por el hecho de que el ovocito no ha llegado a deformarse.

- 5 La digestión parcial puede lograrse por exposición a una proteasa. En otra realización de la presente invención, la digestión parcial puede realizarse mediante el uso de una pronasa. En otra realización más, la digestión parcial puede lograrse por un combinación de una proteasa y una pronasa.

10 En una realización preferida, la concentración de pronasa está en el intervalo de 0,1 mg/ml a 10 mg/ml, tal como 0,5 mg/ml a 10 mg/ml, por ejemplo 1 mg/ml a 10 mg/ml, tal como 1,5 mg/ml a 10 mg/ml, por ejemplo 2 mg/ml a 10 mg/ml, tal como 2,5 mg/ml a 10 mg/ml, por ejemplo 2,75 mg/ml a 10 mg/ml, tal como 3 mg/ml a 10 mg/ml, por ejemplo 3,25 mg/ml a 10 mg/ml, tal como 3,3 mg/ml a 10 mg/ml, por ejemplo 3,5 mg/ml a 10 mg/ml.

15 Una realización preferida es una concentración de pronasa en el intervalo de 2 mg/ml a 5 mg/ml, tal como 2,25 mg/ml a 5 mg/ml, por ejemplo 2,5 mg/ml a 5 mg/ml, tal como 2,75 mg/ml a 5 mg/ml, por ejemplo 2,8 mg/ml a 5 mg/ml, tal como 2,9 mg/ml a 5 mg/ml, por ejemplo 3 mg/ml a 5 mg/ml, tal como 3,1 mg/ml a 5 mg/ml, por ejemplo 3,2 mg/ml a 5 mg/ml, tal como 3,3 mg/ml a 5 mg/ml.

Una realización particular de la presente invención es una concentración de pronasa en el intervalo de 1 mg/ml a 4 mg/ml, por ejemplo 1 mg/ml a 3,9 mg/ml, tal como 1 mg/ml a 3,8 mg/ml, por ejemplo 1 mg/ml a 3,7 mg/ml, tal como 1 mg/ml a 3,6 mg/ml, por ejemplo 1 mg/ml a 3,5 mg/ml, tal como 1 mg/ml a 3,4 mg/ml, por ejemplo 1 mg/ml a 3,3 mg/ml.

- 20 En una realización preferida, la concentración de pronasa está en el intervalo de 2,5 mg/ml a 3,5 mg/ml, tal como 2,75 mg/ml a 3,5 mg/ml, por ejemplo 3 mg/ml a 3,5 mg/ml. En una realización especial la concentración de pronasa es de 3,3 mg/ml.

25 Es evidente para la persona experta que la pronasa debe estar disuelta en un medio apropiado, un medio preferido de acuerdo con la presente invención es T33 (medio de TCM 199 tamponado con Hepes que contiene 33 % de suero bovino (como se describió anteriormente - Vajta, et al., 2003).

El tiempo de incubación del ovocito en la solución de pronasa está en el intervalo de 1 segundo a 30 segundos, tal como 2 segundos a 30 segundos, por ejemplo 3 segundos a 30 segundos, tal como 4 segundos a 30 segundos, tal como 5 segundos a 30 segundos.

- 30 En otra realización de la presente invención, el tiempo de incubación está en el intervalo de 2 segundos a 15 segundos, tal como 2 segundos a 14 segundos, por ejemplo 2 segundos a 13 segundos, tal como 2 segundos a 12 segundos, por ejemplo 2 segundos a 11 segundos, tal como 2 segundos a 10 segundos, por ejemplo 2 segundos a 9 segundos, tal como 2 segundos a 8 segundos, por ejemplo 2 segundos a 7 segundos, tal como 2 segundos a 6 segundos, por ejemplo 2 segundos a 5 segundos.

35 En una realización particular de la presente invención, el tiempo de incubación está en el intervalo de 3 segundos a 10 segundos, tal como 3 segundos a 9 segundos, por ejemplo 4 segundos a 10 segundos, tal como 3 segundos a 8 segundos, por ejemplo 4 segundos a 9 segundos, tal como 3 segundos a 7 segundos, por ejemplo 4 segundos a 8 segundos, tal como 3 segundos a 6 segundos, por ejemplo 4 segundos a 7 segundos, tal como 3 segundos a 5 segundos, por ejemplo 4 segundos a 6 segundos, tal como 4 segundos a 5 segundos. Un tiempo de incubación especialmente preferido es el de 5 segundos.

- 40 En una realización preferida de la presente invención, el ovocito es tratado durante 5 segundos en una solución de pronasa de 3,3 mg/ml a 39 °C.

Embrión reconstruido

45 Mediante la expresión "embrión reconstruido" se pretende indicar la célula que se forma por la inserción de la célula donante o del núcleo de la célula donante en el ovocito enucleado que corresponde a un cigoto (durante la fertilización normal). Sin embargo, la expresión "embrión reconstruido" es también denominada "célula reconstituida". En la presente invención, la célula donante es una célula somática. Sin embargo, la célula donante puede derivarse también de una célula de una línea germinal.

Fusión

50 La transferencia de una célula donante o de un núcleo rodeado por una membrana desde una célula donante hasta, al menos, el citoplasto se realiza, de acuerdo con la presente invención, por fusión. En las situaciones descritas a continuación la expresión "célula donante" se refiere también a un núcleo de una célula donante rodeado por una membrana. La fusión puede lograrse por varios procedimientos.

La fusión puede ser entre una célula donante y al menos un citoplasto, tal como entre una célula donante y al menos

- 5 dos citoplastos, por ejemplo entre una célula donante y al menos dos citoplastos, tal como entre una célula donante y al menos tres citoplastos, tal como entre una célula donante y, al menos, cuatro citoplastos, por ejemplo entre una célula donante y, al menos, cinco citoplastos, tal como entre una célula donante y al menos seis citoplastos, por ejemplo entre una célula donante y al menos siete citoplastos, tal como entre una célula donante y al menos ocho citoplastos.
- La fusión puede ser realizada de acuerdo con las combinaciones listadas anteriormente de forma simultánea o secuencial. En una realización de la presente invención, la fusión se realiza de forma simultánea. En otra realización, la fusión de al menos un citoplasto y una célula donante se realiza de forma secuencial.
- 10 Por ejemplo, la fusión puede lograrse por fusión química, en la que una célula donante y, al menos, un citoplasto se exponen a agentes promotores de la fusión tal como por ejemplo proteínas, glicoproteínas o carbohidratos o una combinación de los mismos. Se conocen diversos agentes promotores de la fusión, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), tripsina, dimetilsulfóxido (DMSO), lectinas, aglutinina, virus, y virus Sendai. Preferiblemente, se usa fitohemaglutinina (PHA). Sin embargo, pueden usarse manitol y/o poli(alcohol vinílico).
- 15 Alternativamente, la fusión puede realizarse por inducción con corriente continua (CC) a través del plano de fusión. A menudo se emplea corriente alterna (CA) para alinear las células donante y receptora. La electrofusión produce un pulso de electricidad suficientemente alto que es transitoriamente capaz de romper las membranas del citoplasto y de la célula donante y volver a formar las membranas posteriormente. Como resultado, se abrirán pequeños canales entre la célula donante y la célula receptora. En los casos en los que las membranas de la célula donante y de la célula receptora se conectan los pequeños canales aumentarán gradualmente y, finalmente, las dos células se fundirán en una sola célula.
- 20 La alineación de al menos un citoplasto y la célula donante puede ser realizada utilizando corriente alterna en el intervalo de 0,06 a 0,5 kV/cm, tal como 0,1 a 0,4 kV/cm, por ejemplo 0,15 a 0,3 kV/cm. En una realización preferida la alineación de al menos un citoplasto y la célula donante puede ser realizada utilizando corriente alterna de 0,2 kV/cm.
- 25 La fusión puede ser inducida por la aplicación de corriente continua a través del plano de fusión de al menos un citoplasto y la célula donante. La corriente continua en el intervalo de 0,5 a 5 kV/cm, tal como 0,75 a 5 kV/cm, por ejemplo 1 a 5 kV/cm, tal como 1,5 a 5 kV/cm, por ejemplo 2 a 5 kV/cm. Otra realización preferida de la presente invención es la aplicación de corriente continua en el intervalo de 0,5 a 2 kV/cm. En una realización preferida adicional la corriente continua pueden ser 2 kV/cm.
- 30 La corriente continua puede aplicarse preferiblemente en el intervalo de 1-15 microsegundos, tal como 5 a 15 microsegundos, por ejemplo 5 a 10 microsegundos. Una realización particular pueden ser 9 microsegundos.
- En una realización especialmente preferida, la fusión con corriente continua puede ser utilizando un corriente continua de 2 kV/cm durante 9 microsegundos.
- La electrofusión y la fusión química también pueden, sin embargo, combinarse.
- 35 Típicamente, la electrofusión se realiza en cámaras de fusión como es conocido por la persona experta.
- La fusión se puede realizar en al menos una etapa, así como en dos etapas, por ejemplo tres etapas, así como en cuatro etapas, por ejemplo en cinco etapas, así como en seis etapas, por ejemplo en siete etapas, así como en ocho etapas.
- 40 La fusión se puede realizar en, por ejemplo, en una primera etapa en la que al menos un citoplasto se fusiona con la célula donante. Una segunda etapa de fusión puede comprender la fusión del par fusionado (citoplasto-célula donante, embrión reconstruido) con al menos un citoplasto, así como al menos dos citoplastos, por ejemplo tres citoplastos, así como cuatro citoplastos, por ejemplo cinco citoplastos, así como seis citoplastos, por ejemplo siete citoplastos, así como ocho citoplastos. La segunda etapa de fusión con la fusión de al menos un citoplasto y el par fusionado puede realizarse de forma secuencial o simultánea. En una realización, al menos dos citoplastos son fusionados con el par fusionado de forma simultánea. En otra realización, al menos dos citoplastos son fusionados con el par fusionado de forma secuencial.
- 45 En una realización de la invención, la segunda etapa de fusión pueden también ser una etapa de activación en la que el embrión reconstruido es activado para entrar en mitosis. Como se ha descrito en otra parte en el presente documento.
- 50 Activación
- En una realización preferida el embrión reconstruido puede dejarse reposar antes de la activación durante un período de tiempo con el fin de permitir que el núcleo de la célula donante restaure su genoma y adquiera toda la potencia en los nuevos alrededores del citoplasto enucleado. El embrión reconstruido puede, por ejemplo, reposar durante una hora antes de la activación.

Preferiblemente, el embrión reconstruido puede ser activado con el fin de inducir la mitosis. Los procedimientos para la activación pueden seleccionarse, preferiblemente, del grupo constituido por pulso eléctrico, choque químicamente inducido, niveles intracelulares crecientes de cationes divalentes o reducir la fosforilación. Para la activación pueden preferirse una combinación de los procedimientos.

- 5 En una realización particular de la invención, la activación y la segunda etapa de la fusión pueden realizarse de forma simultánea. Sin embargo, la activación del embrión reconstruido y al menos una etapa adicional de fusión entre el embrión reconstruido y al menos un citoplasto pueden realizarse de forma secuencial.

- 10 Reduciendo la fosforilación de proteínas celulares en el embrión reconstruido por procedimientos conocidos tal como por ejemplo por la adición de inhibidores de quinasa se puede activar el embrión reconstruido. Una realización preferida puede implicar el uso de agentes que inhiben la síntesis de proteínas, por ejemplo cicloheximida. Una realización preferida adicional puede ser utilizar agentes que inhiben la formación del cuerpo en huso, por ejemplo citocalasina B.

- 15 En una realización de la invención, los niveles intracelulares de cationes divalentes pueden incrementarse. Cationes divalentes tal como , por ejemplo, calcio pueden estar comprendidos en el medio de activación. Preferiblemente, los cationes pueden introducirse en el embrión reconstruido, particularmente después de someter el embrión reconstruido a un pulso eléctrico. En una realización preferida, el pulso eléctrico puede causar la introducción de calcio en el embrión reconstruido.

- 20 La aplicación de un pulso eléctrico utilizando corriente continua puede ser una etapa de activación. Sin embargo, en una realización preferida el pulso eléctrico aplicado para la activación puede servir también como una etapa adicional de la fusión.

- 25 Antes de aplicar un pulso eléctrico utilizando corriente continua al menos un citoplasto y al menos un embrión reconstruido pueden ser alineados mediante la aplicación de corriente alterna. La corriente alterna puede estar en el intervalo de 0,06 a 0,5 kV/cm, tal como 0,1 a 0,4 kV/cm, por ejemplo 0,15 a 0,3 kV/cm. En una realización preferida la alineación de al menos un citoplasto y la célula donante puede ser realizada utilizando corriente alterna de 0,2 kV/cm.

- La activación puede ser inducida por la aplicación de corriente continua a través del plano de fusión de al menos un citoplasto y la célula donante. La corriente continua en el intervalo de 0,2 a 5 kV/cm, tal como 0,4 a 5 kV/cm, por ejemplo 0,5 a 5 kV/cm. Otra realización preferida de la presente invención es la aplicación de corriente continua en el intervalo de 0,5 a 2 kV/cm. En una realización preferida adicional la corriente continua puede ser de 0,7 kV/cm.

- 30 La corriente continua puede, preferiblemente, aplicarse en el intervalo de 10 a 200 microsegundos, tal como 25 a 150 microsegundos, por ejemplo 50 a 100 microsegundos. Una realización particular pueden ser 80 microsegundos.

En una realización especialmente preferida, la fusión con corriente continua puede ser utilizando una corriente continua de 0,7 kV/cm durante 80 microsegundos.

- 35 Una realización especialmente preferida de activación de acuerdo con la presente invención puede ser utilizar un pulso eléctrico en combinación con someter el embrión reconstruido a agentes que inhiben la síntesis de proteínas, a formación de cuerpo en huso, y a cationes divalentes.

La activación puede ser realizada por cualquier combinación de los procedimientos descritos anteriormente.

Cultivo de embriones in vitro

- 40 Un aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de cultivo de embriones in vitro, en el cual la tasa de blastocisto aumentó a 25,3 %. Por ello, un procedimiento de cultivo de un embrión reconstruido está dentro del alcance de la presente invención, comprendiendo las etapas de a) establecer al menos un ovocito que tiene al menos una parte de zona pelúcida, b) separar el ovocito en al menos dos partes obteniendo un ovocito que tiene un núcleo y al menos un citoplasto, c) establecer una célula donante o el núcleo de la célula que tenga las propiedades genéticas deseadas, d) fusionar al menos un citoplasto con la célula donante o el núcleo celular rodeado por la membrana, e) obtener el embrión reconstruido, f) activar el embrión reconstruido para formar un embrión, y e) cultivar dicho embrión.

Otro aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de transferencia nuclear de la célula en el que se incluye una etapa de cultivo del embrión.

- 50 En una realización preferida en relación con los procedimientos descritos en el presente documento, los embriones se cultivan en un conjunto secuencial de medios. Preferiblemente, los blastocistos se desarrollan en medio tradicional tal como, por ejemplo, NCSU37 o un medio equivalente como es conocido por una persona experta en la técnica, en el que la glucosa se elimina y es sustituida por otros agentes. Un agente puede ser piruvato. Otro agente puede ser lactato. Los agentes también se pueden combinar y sustituir la glucosa en el medio tradicional.

Los embriones se pueden cultivar en el medio sustituido como se ha descrito anteriormente desde el Día 0 hasta el

Día 3, tal como desde el Día 0 hasta el Día 2.

5 La concentración de piruvato puede variar desde 0,05 a 1 mM, tal como 0,1 a 1 mM, por ejemplo 0,125 a 1 mM, tal como 0,15 a 1 mM. Sin embargo, la concentración de piruvato sódico puede también variar desde 0,05 mM a 0,9 mM, tal como 0,05 a 0,8 mM, por ejemplo 0,05 a 0,7 mM, tal como 0,05 a 0,6 mM, por ejemplo 0,05 a 0,5 mM, tal como 0,05 a 0,4 mM, por ejemplo 0,05 a 0,3 mM, tal como 0,05 a 0,2 mM. Preferiblemente, la concentración varía entre 0,05 y 0,17 mM. Una concentración preferida de lactato sódico es 0,17 mM.

10 La concentración de lactato puede variar desde 0,5 mM a 10 mM, tal como 0,75 a 10 mM, por ejemplo 1 a 10 mM, tal como 1,5 a 10 mM, tal como 1,75 a 10 mM, por ejemplo 2 a 10 mM, tal como 2,5 a 10 mM. Sin embargo, la concentración de lactato sódico puede también variar desde 0,5 mM a 9 mM, tal como 0,5 a 8 mM, por ejemplo 0,5 a 7 mM, tal como 0,5 a 6 mM, por ejemplo 0,5 a 5 mM, tal como 0,5 a 4 mM, por ejemplo 0,5 a 3 mM. Preferiblemente, la concentración varía entre 1 y 5 mM, tal como 2 a 4 mM, por ejemplo 2 a 3 mM. Una concentración preferida de lactato sódico es 2,73 mM.

15 Después del medio de incubación inicial sin glucosa la glucosa sustituye de nuevo a piruvato y lactato. Los embriones se pueden cultivar en el medio que contiene glucosa desde el Día 4 hasta el Día 3, preferiblemente desde el Día 3 hasta el Día 7. La concentración de glucosa puede variar desde 1 a 10 mM, tal como 2 a 10 mM, por ejemplo 3 a 10 mM, tal como 4 a 10 mM, por ejemplo 5 a 10 mM. Sin embargo la concentración de glucosa puede variar también desde 1 a 9 mM, tal como 2 a 8 mM, por ejemplo 3 a 7 mM, tal como 4-6 mM. Una concentración preferida de glucosa de acuerdo con la presente invención es de 5,5 mM de glucosa.

Donación de órganos o tejidos

20 En una realización, los animales de la invención pueden usarse como una fuente de donación de órganos o tejidos para humanos u otros animales, bien animales de la misma especie o bien animal de otras especies. La transferencia entre especies normalmente se denomina xenotransplante. Órganos completos que pueden ser transplantados incluyen corazón, riñón, hígado, páncreas o pulmón. Alternativamente, partes de órganos, tal como tejidos de órganos específicos pueden ser transplantados o transferidos a humanos u otros animales. En una
25 realización adicional más, una célula individual o una población de células individuales de un animal de la invención pueden ser transferidas a un ser humano u otro animal con fines terapéuticos.

Criopreservación

30 El término "criopreservación" como se usa en el presente documento puede referirse a la vitrificación de un ovocito, citoplasto, una célula, embrión, o cerdo de la invención. Las temperaturas empleadas en la criopreservación son preferiblemente, inferiores a -80 grados C, y más preferiblemente, de temperaturas inferiores a -196 grados C. Los ovocitos, células y embriones de la invención pueden ser criopreservados durante un período indefinido de tiempo. Se sabe que los materiales biológicos pueden ser criopreservados durante más de cincuenta años.

35 Está dentro del alcance de la presente invención qué embriones pueden ser criopreservados antes de transferir a un cerdo anfitrión cuando se emplean procedimientos para obtener un mamífero no humano a través de ingeniería genética o transgénico. Tal criopreservación antes de la transferencia puede estar en el estadio de blastocito del desarrollo del embrión. La vitrificación es una forma de criopreservación donde las células vivas son enfriadas rápidamente de manera que el fluido de la célula no se conforma en hielo. Por ello, la vitrificación se refiere al proceso de enfriamiento en el que células o tejidos totales son preservados por enfriamiento a bajas temperaturas bajo cero, tal como (típicamente) -80 °C o -196 °C

40 En particular, la invención se refiere a la vitrificación de un ovocito, sin embargo, la invención también se refiere a la vitrificación de embriones, preferiblemente, embriones en el estadio de blastocito. En una realización, el embrión es cultivado hasta el estadio de blastocisto antes de la vitrificación. Especialmente, están abarcados por la presente invención los embriones de cerdo. También están abarcados por la presente invención los citoplastos vitrificados, ya que son células.

45 Todavía otro aspecto de la invención se refiere a la criopreservación de un embrión de cerdo derivado por un procedimiento de transferencia nuclear de la célula como se describe en el presente documento que comprende una etapa de vitrificar un embrión de cerdo. Un aspecto adicional de la invención se refiere a embriones de cerdo obtenidos u obtenibles por los procedimientos proporcionados en el presente documento.

Mitocondria

50 Las células del tejido de los mamíferos no humanos y/o de los embriones no humanos genéticamente modificados obtenibles por la presente invención pueden albergar mitocondria de diferentes fuentes maternas. En una realización preferida, los mamíferos no humanos y/o los embriones no humanos pueden albergar mitocondria de sólo una fuente materna. Sin embargo, en otra realización preferida los mamíferos no humanos y/o los embriones no humanos pueden albergar mitocondria de al menos dos fuentes maternas, tal como tres fuentes maternas, por
55 ejemplo cuatro fuentes maternas, tal como cinco fuentes maternas, por ejemplo seis fuentes maternas, tal como siete fuentes maternas, por ejemplo ocho fuentes maternas, tal como nueve fuentes maternas, por ejemplo diez

fuentes maternas. La probabilidad de tener un número específico de fuentes maternas puede calcularse basado en los tipos de mitocondria observados.

Evaluación del tratamiento y procedimientos de diagnóstico

5 La presente invención ofrece un procedimiento para cribar la eficacia de una composición farmacéutica, en la que el procedimiento comprende las etapas de i) proporcionar el modelo de cerdo de tamaño miniatura de la presente invención, ii) expresar en dicho modelo de cerdo de tamaño miniatura el determinante genético y utilizar dicho fenotipo para dicha enfermedad, iii) administrar al modelo de cerdo de tamaño miniatura una composición farmacéutica cuya eficacia va a ser evaluada, y v) evaluar el efecto, en su caso, de la composición farmacéutica sobre el genotipo utilizado por el determinante genético cuando se expresa en el modelo de cerdo de tamaño miniatura. En una realización preferida, los ensayos preclínicos de fármacos que tienen como diana la estabilidad de la placa y la trombosis superpuesta está dentro del alcance de la presente invención.

15 Es más, dentro del alcance de la presente invención está un procedimiento para evaluar la respuesta de un tratamiento terapéutico de la aterosclerosis, en el que el procedimiento comprende las etapas de i) proporcionar el modelo de cerdo de tamaño miniatura de la presente invención, ii) tratar dicho modelo de cerdo de tamaño miniatura con una composición farmacéutica que utilice un efecto sobre dicho fenotipo, y iii) evaluar el efecto observado. Basado en la evaluación se puede recomendar el tratamiento basado en los efectos observados.

20 Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para el tratamiento de un ser humano que padece aterosclerosis, en el que el procedimiento comprende las etapas iniciales de i) proporcionar el modelo de cerdo de tamaño miniatura de la presente invención, ii) expresar en dicho modelo de cerdo de tamaño miniatura el determinante genético y utilizar dicho fenotipo para dicha enfermedad, iii) administrar a dicho modelo de cerdo de tamaño miniatura una composición farmacéutica cuya eficacia va a ser evaluada, y iv) evaluar el efecto observado, y v) tratar dicho ser humano que padece aterosclerosis basada en los efectos observados en el modelo de cerdo de tamaño miniatura. En una realización preferida, el tratamiento comprende tratar un ser humano que padece de hipercolesterolemia familiar.

25 Se comprende por tanto que el modelo de cerdo de tamaño miniatura de acuerdo con la presente invención pueden también recibir medicamentos para enfermedades distintas de la aterosclerosis con el fin de probar el efecto combinado de un fármaco para aterosclerosis y otro fármacos administrados al cerdo de tamaño miniatura.

30 Es más, el modelo de cerdo de tamaño miniatura de la presente invención también permite el desarrollo de tecnología de bioimágenes para la diagnosis de la aterosclerosis. Por ello, la presente invención ofrece un procedimiento para evaluar una tecnología de bioimágenes para la diagnosis de la aterosclerosis, en el que el procedimiento comprende las etapas de i) proporcionar el modelo de cerdo de tamaño miniatura de la presente invención, ii) expresar en dicho modelo de cerdo de tamaño miniatura el determinante genético y utilizar dicho fenotipo para dicha enfermedad, iii) obtención de bioimágenes del modelo de cerdo de tamaño miniatura, y iv) evaluar el resultado, en su caso, de la tecnología de bioimágenes del genotipo utilizado por el determinante genético cuando se expresa en el modelo de cerdo de tamaño miniatura.

El cerdo de tamaño miniatura genéticamente modificado de la presente invención puede emplearse también para mejorar las terapias basadas en catéteres.

Ejemplos

Metabolismo de la lipoproteína en los cerdos

40 El metabolismo de la lipoproteína en cerdos está razonablemente bien descrita. La distribución y composición de lipoproteínas en plasma en el cerdo son similares a las de los humanos, y la LDL es la principal lipoproteína que transporta colesterol en ambas especies¹². Como los humanos, todas las partículas VLDL secretadas por el hígado contienen la forma larga no corregida de apoB100 más que la forma apoB48 truncada, que es dominante en los ratones¹³.

45 Las lipoproteínas que contienen apolipoproteína B son aclaradas por captación hepática mediante 1) el receptor de LDL que enlaza con apolipoproteína E en las partículas IDL y con apolipoproteína B100 en las partículas LDL¹⁴, y 2) la proteína relacionada con el receptor de LDL (LRP) que enlaza con apolipoproteína E en los restantes¹⁵ quilomicrones que contienen apoB48. La importancia relativa de estas vías de paso varía entre especies. En los ratones, la deficiencia de apolipoproteína E tienen un fenotipo aterosclerótico más grave que la deficiencia del receptor de LDL, mientras que lo opuesto es cierto en humanos. El impacto de la deficiencia de apoE y de receptor de LDL en el metabolismo de los lípidos en cerdos no se conoce.

Ejemplo 1

Producción de cerdos noqueados ApoE

Cerdo noqueado en ApoE por recombinación homóloga

5 Se ha secuenciado^{11,16} el gen apolipoproteína E del cerdo de tamaño miniatura (GeneBank acceso nº U70240). Una construcción de vector dirigido que contiene el gen y la secuencia codificante aguas abajo se crean con un casete de gen con resistencia a la neomicina sin promotor insertado en uno de los exones para interrumpir la función génica. El vector dirigido es linealizado y transfectado en fibroblastos fetales Yucatán, aislados de biopsias de orejas de Yucatán recién nacidos. Los plásmidos que codifican nucleasas con dedos de cinc construidas para reconocer y cortar un sitio en la secuencia genómica dirigida pueden usarse para aumentar la eficiencia de la recombinación homóloga. Los fibroblastos se cultivan en presencia de G418. Los clones resistentes son cribados para recombinación homóloga por PCR. Los cerdos de tamaño miniatura Yucatán con uno o ambos alelos apoE noqueados son creados a partir de células recombinantes mediante clonación "artesanal".

1. Clonación de construcciones dirigidas

15 Un fragmento de 1,6 kb que contiene el extremo 5' del gen ApoE, un fragmento de 3,2 kb que contiene el gen ApoE completo, y un fragmento de 6,1 kb que contiene el extremo 3' del gen ApoE fueron todos amplificados mediante PCR utilizando ADN genómico extraído a partir de fibroblastos aislados de cerdos de tamaño miniatura Yucatán recién nacidos como molde (véase a continuación). Después de subclonar y secuenciar, las partes de los productos de la PCR resultantes se usaron para la clonación adicional en el vector pKO Scrambler NTKV-1903 (Stratagen) dirigido que comprende un gen con resistencia a la neomicina.

20 Fragmento de 1,6 kb de ApoE (extremo 5' de ApoE) - los cebadores usados para amplificación están subrayados:

5'-

gcctgggaatgagtgccagctcctccagttccacgtggcctcaccacacaccicaactctgagctctgggagtcgtgtaac
 agggctgctgggggatgggggggtgagtcagcgcctcaccatctgtcacagaagtaactggaactgttcttctatc
 cccgatgatggggttaaagcaaccatttcccgctcttagtgaccgagaaacaatgttcagagaggctaggtcattg
 ctcaaggtcacacagctgacaacccgcagagcctggattcaggcctggaggcttggttccagagttcacagtcggaac
 caggcgacgggacaggaacactcccaggcctgtggaaggcgggatgacggcggagctcctggaatgogcaa
 ggcttatgtggggcagagagctgcatcctcattgcacaaatcaggaaagcggctcagagaagcactcagatgtgccc

 aaggtcacggccctcgagagggagtgagggttaaaactctgtggtgcaacggaaaatccaactggaacatga
 ggctgtgggttgatccccggcctcgtcaatgggttaaggatccagcacggcgtgcccgtgagctgtggtgtaggtgc
 agacgaggcttgatcccacttggtgtgctgtggtgtggttaggcccgcagctgtaactgtaattcgacc
 tagcctgggaacctccacaagccacgggtgtggcctaaaaagcaaaaaacgaaagcaaaaagaactctcaa
 agcctaaacttcagcaaaaagaactctcaaacgctaaacttgagcagatgccttacaccgccccacgcctctcat
 ccccttctgtctggcctccagctccctcccccttaaccagaaatcccagacctcagaccagatttcgagctcccag
 cctgcccccaattctattcatccaagcacaggacaagagagaggcagggccggccttctgtcctgctcctctccctgc
 ccagcccacccccaccagtgcatggagaaggctcgggagttactgggtgagagacaccttccatgggggctgg
 gagtaaggggggggtgataggctgccaagccccacccctcccctcccctcccctcccctcctgctgtgtgaaagg
 gaggccagcccactcgtgacccgacggggctggccagctggcccagttctggaggagtgggcggggcgggg
 ggagccctataattggccgaatctgggctccctgaatcctactcagccccggaggaggaaggaggaggagga
 ggaagcaaccggtgaggagcagacctgggggacagagatgggctcggggctcgggtgtgggaggggtgggctgtag
 ggggaggaggaaatgacctggcccccgggccaccaccgaggcaggagttggggatgaggctagagcccaggg
 actggacctagaaggaggggtggcagcaggaggaggtatccgccttggctggaaggggaggtcaggggaagcagc
 gggacctgtaggaagaaccagacgagccagagccgacgaattgactggc-3'

ES 2 547 015 T3

Fragmento de 3.2 kb de ApoE (gen ApoE completo) - los cebadores usados para amplificación están subrayados:

5'-

gcccagctggccccagttctggaggagtggcgggggcgggggagccctataattggccgaatctgggctccctgaat
cctactcagccccggaggaggaaggaggaaggaggaggaggaagcaaccggtgaggagcagacctgggggacac
agagatgggctcggggctcgggtgtgggggggtgggctgtagggggaggaggaaatgacctggccccggggcca
ccaccgaggcaggagtgggatgaggctagagcccaggactggacctagaaggaggggtggcagcaggagga
ggttatccgcttggtggaaggggaggtcaggaagcagcgggacctgtaggaagaaccagacgagccagagcc
gacgaattgtactggcaggtatggcgcatctactcaagttttgagcacactaagagctccatcgaggagaccagggt
ggcggcgaccaggggtgacctcgaccgggtggcggcagggtagctagagcgttggtggaaggacatgtaaatgag
gattaaattaggaatgagtgaaaaacagggttagatgtaagttggagcttgaatgtaaggtaccaggaagaacg
tgagctggagcccagaaagcaaggctggggctcacatgggactccagggtggaggggtggggggcgacgtgggt
ggaattgaaccctgggagagaggaaggctttggccgagccgacctggggatggggagataggagaagacaat
gagggaaattacacggacaatgaaaggatctgctcgggaaatatcgttgattaggtgatgcagataaggggggtc
aaggcttgaaggctgtgactggacagggctggctctgggtgggaggagcagcccccgctgttgagtgacaatt
ctccctctgcaggttgccaatcgcaagccagaagatgagggtctgtgggtgctttggtgtaacctctcgcaggta
tgggggtgggctgtcaggttccctgccccccccatccccggctgtaccgggtgccccctctcatccctgggtctctc
tgctgtctctctcccctgaggagagccctagatgtgaggcctctctggcactccttctctgaacagctcgtttactctc
gagcctcagttccccatcttaaaatgggagttatgttgagagattccagctgtggctcagcaggtaagaaccgactag

tatcatgaggaaggggtcaatccctggctcgtcagcgggttaaggatccggcggtgcatgagctgcggcataag
tcgcagatgcagctcgaatcgggtgtgtgtgctgtggtgagggctggcagctatcgttccatcggaccctcgcctg
ggaactccacgtatgccactggcagccctaaaagacaaacaacaaaaacgaaagaagagaaaagaaagg
aaagggggctctgttctaatcgtgtgtcctggcagggcgtagcattagatagctgtcagctgtgactagcgtgcacg
gagcacacaalccatgcttccagtaattagacagggctgggtgtccttccacccccctctgcccaccagtgtctagag
aagcccaccaccagggtgggggagcacctgctgtaccaggtaccgtgtctgggagggggcagaggacctgat
ggctgtgaactggctcgtgacaggtgacggagcagagcggggccgcccggagggtcacgtgtgtgg
gaggagcccaagtgagggcagccagccctgggagcaggccctggcgcttctgggattacctgcgtgggtgca
gtccctgtctgaccaagtgcaggaggagctgtcagaccaaggtcaccaggaactgacgtaagtcccaccgact
cccgccgcgcgcgcgcgcgcgcgcgccctgacctctggcggaccgtgtgtctggacccctcaggctccaccgg
tccgggttctctgtcctgtgccaactctgggggtctgggtctctgtttctttttctctctctttttgggggagttacttt
tctttttctttcaftgacttcatgtcttcttcttccatctgagctcctgcctgtctctgggtcagcttgcctcctgtctg
tcttgaatctctggcagctcctggccatcgccagctcaggagccctctctcccccccccccccgcctctctgcgc
ccaggagctgatagaggagagcatgaaggaggtgaaggcctaccgagaggagctggaggcgcagctgggcccc
gtgaccaggagacgcaggcggcctgtccaaggagctgcaggcggcgagggcccgtgggcccagacatgga
ggacgtgcgaaccgctgtgtctaccgagcaggtgcacaacatgttggccagaccaccgaggagctgcgga
gccgctgtgctccaccctgcgaagctgcgaagcggctgtccgcgacaccgaggacctgcagaagcgcctggcc
gtgtaccaggcggggctgcgcgagggcggcagcgcagcgtgagcgcctccgagcgcctcgggcccctgtgtg
agcagggccgattgcgcgcccaccctgagtaccagggccggcagccgctgcgcgagcgcgccaagcctggg
gccagaagctgcgcggacggctggaggagatgggagccggaccgaccgacctgatgagatcgtgagcagc
tggaggaggtgcacccaagtggaggagcagggcagccagttgcgcctgcagggccgaggcctccaggccccgct
caaaggctggtcagccctgggtggaagacatgcggcgccagtgggccgggctgggtggagaggatgcagtcggccg
tgagcatcagctctccaccctgcgcccagtgataatcagtgagtgccctctcatccgggacccccctcggggccccgt
tctgcccactccccgcctccccagccttagctgccctctgtggggcccctgctaataaagattcatcaagcttcaca
gcagctctgggtgac-3'

ES 2 547 015 T3

Fragmento de 6,1 kb de ApoE (extremo 3' de ApoE) - los cebadores usados para amplificación están subrayados:

5'-

attcatcaagcttcacagcagctctgggtgccccgtgattctcagctccagcctcagttcccttccctccctgactga
ccaccagttctctgctcctgcccctgctgctgctgctctattgtctcttccccctttcttttttggccgagcccatggcatgc
ggaagtccccggccagggaattgaacccatgccacagccgccacaacgaaggatcctaactactaggccaccaggg
aacccatccttctaactctgcttggcttcccccttttagcgttttagggctgcacccctcagcatgtggaagccccaggctag
gggtcaaattggcgctacagctgccagcctacaccacagccccagcaacgcaggatccaagccacatcttgacctac
accacagctcatggaacaccagatcctaaccactgagcaagggattgaaccacatcctcatggatactagtctggg
ttgttaatcactgagccacggcaggaaccccccccctgactactgtgggcaaaaagcaacttcagagttcctgtgtgg
ctcagtggttatgaaccaactagatccatgagggctgctgctgctcctgatccctgatcctgctcagtggttaaggatctgac
attgccatgagctccagtatagtaacagaaatgtctgcatccacaccgctgtggctgtgacgtaggctggcagtttagct
ctgattcgaccctagcctgggaacttccttatgccagggttaaccctagaaaagagggggaaaaaaatcaacatctg
agcctcggttgcccagcttaaaatgcctgcttcatggcctgtfactcaaaagacctgaaaccactgccatttggttttttt
taagtctcttttttttaacgattttttttccattgtagttggtttacagcgttctgtgagttttctacggaccagtcacacac
atatatacattcttttctacatcatcctccatcctgctccatccccagtgactagatagttcccagtgctctacagcaggat
ctcattgcttaacctcctcagatgcaatgggttacgtctattaaaccagactcccagttccatcccacgcccctccccctccc
ccactgccattttgttagcattttcttttttctcctctcctctcttaccggattctgcctccttctgctcctggcctctgttc
tcagtcctgctcctccctgagaggctcatttctctggtctctcttttctccgctcttctgctcctccccctctggtgctcctgc
ccctggccctgctgtttctagttgccctcctccaggttgccctcgccaccacgtgggcccctctcttttttttttttactcccc
cgaccaggaatcgaaccctagccatagaagtcaaatgcagatccttagctactagcccaccagggagttccatctcc
cctcatcctctcctccccctggatcactggcctctggctaccttgacaagcclaccaggctgctgggtgcaggctggaga
gaggggcccagcctgtgaccctggtaltaaggcggggcatcatgttgggagctgacacgcagcatggctggagcct
ggagaagcaggagcttccctcccacgcccctcagttctcaggaggggagcaggattccatccagagccagcggactgt
gtctccaggcggcctctgccccctggtctgtgtaaacctctgtgctcactccgcgcttccctgcccctgctgcccgtgtg
gaatcaggctccccccccagccagatgtccaccctgggactgtgtgaggcgggctacatctgtgtgaggcagggc
caagttctgctgattcactcactgtgtgctcagggcctgggcatctatcccagatgtcggggagtggggctcagcc
atatctcccattttaaaagctggtctgtgagttccctcatggctcgtatggaagcaaatctggctagcatccatgaggatgc
gggtctgacctggcctcactcagtaggtaaggatctggtgttgccgagagctgggtgtaggtagcagatggggctgt
ggctgtgtgagggcggcagctcagctccagttgaccctaacctgggaacctcatgtgactgggtgcccctca
aaataaataaatgatacgaactaaataacatacatacatacatacataaaaaataaaaaaattaaaagctggatctc
aaattctgtttgaagccagctaggcggagaggggctcaccaccacaccccagcagcccaggftcctctcagtgaa
aggaggctggcagggggggcagtggggtggcggctgaccccagcaggatccagagagtcagcctgaagggggg
aagatgatgaaggacagagaagggggcgccagcagcctctcattgagcctctgaaacctcttagctgccatcagtttc
cccccttaaacggaggtgacagtgacgatgagactggccaaaccaagctgtcatccggggtgggaggggagga
gagcagacattcgggtggatgtggggagcgtgggctcacagaggaagcagccctcatcagaggggctggggggc
tggcgggggctggatgactcggagggctgttgaatccggccagggtagcatctgtgctgtctttcaaacatccccct
cctcgccccagggctgacacgtggtgttgggcacgaggccagccaacctagcgtctgggccagggcctctctcccc
agctgccagggatcacgagcagtcaaaaggcagctggaggaagggggcagcctaggccggcagcccctgccaacca
atgtggaggaagggacagggagagtcgtggtgtaggagtgccaagagggggcatgagagcagatggagtggtt
ccagggacctggaggctgagaggcagggaaaccacgcctggggaacagggttctggtggaccagtgaggggc
acagattaggagccttgacgtgaggtctgctcttttttttttttagtctgtacctccggcatagggacgttctcagcctag
gagtcgaatcagagctgacgtctgtgcctacaccacagccacgcccagatccaagctgctctgacctaaccaca
gcttacagcaatgacggatcctgacccactgagtggggcccagggatggaactggcatcctgagccacaacagaaaat

catctgcactctcgacaggttcaggacaacctcctccaggagtcccccattgtggcgcagcagaaacgaatccaactagg
aaccacgatgtttaggttcgacccctggcctcgctcagtggttaaggatctgacatgtgagctgtggttaggtcgcata
catggcttgatctagtgttctcggctgtggagtagagcagcagccgtagctcccatgggacccctaacctgggaacct
ccatgtgccgcaggtacggccctaaaaagaaaaaaaaaaaaaaaaaagagaaagagagagagaccctccact
gaaggaagattggggctgtgaaattaaggctccagagagcgtccagggaggcctgggagtctcccagatgcagag
agaggggagaatggaaggctagtcggacagtgatattggagatggcatggtggcaggtgtgtggaggcagactat
gagacccagactcctgaagagtctgagctgaagagacctactaagaaggggaggaggagtccatcctggctca
gtggttaacgaatccgacgaggaacctagaggtgcgggttcgatccccggcccctgctcagtggttaaggatccggc
gttccatgagctgtggttaggttcagacgtggctcgatccccgtgtgctgtggctctgtagccggcggctaca
gctccgattggacccctagcctgggaacctccatagccatgggagcggccaagaatggcaaaaagacaaaaaa
aaaaagactcctccaagaactgggtgctatgactattaaggccatgagggtaataacctcagagggccagagat
gtaaagtcacacagccagcatgcggacaactggatcggggccccccagcctcaggcaatcactccactacctcctcc
tggctggctgcccagataaggaacattatctggctgattcaccaccaggcacacagaaggcattattactctctt
ctctcttttttttttaattttgtctttcagagctgcacccacagctatagaggtaaccaggctaggggtcgaatcagagc
agcagctgccagcctgcaccacagccacagcaacgtgggatccgagctgcatcttaactccccacagctcacagc
aacaccggatccttaacctactgagtgaggccaggatcgaacgaacctacgtcctcatggatgctactcaggtcattt
ccgctgagccacgatgggaactcctgttgattacactttcaaggataatgaaggggagtgagagaggtcaaagggtg
gacaagggtagagccctcaaacagaccgaccaacccccctccaagtctcagctctgatgtcccctcctccaggaa
gccctcctgacccaggtgaatcgagccccctcatctcagccctgtctactctgggtcatcactctctggggatggatgg
gctgtcccccgacccaccccactggaccgtgagccctgggggacagggacagggcttcatcgccacc
atgctcaggcataaccagcacatgactaggcctggcacgggactcattattggtgaaacgagatgctacctatgca
aagaaaaataaataacatgacattttcataaaacctctgaggttagattgtttcactgagccacgatgggagctocattt
aaaaatttttaggagttcccgctatggcgcagtggttaaccaatccgactaggaacctagaggttcgggttcgatccct
gccctgtcagtggttaacgatctggcgtgccgtgagctgtggtgcaggtgtgagcgtggctcagttgtgtgcccctg
gtgttagggcagcggctcagctccgattagaccctagcctgggaacctccatgtgacgcaggagagggccaagaa
atggctaggaatcatgaggttcaggttcgatccctggcctgtcctaatgggtaaggatccagtggtgtcgtgagctgtgt
gtaggttcagatgaggctcagatccacattgctgtggctcggcatgggctggcggtacagctccaattcgaccccta
gcctgggaacctccatagccgtgggagcggctctagaaatggcaaaaagacaaaagaaaaagaaaaagaaa
aaaaaagaaaaagtgggcggggccatagaggtggcctggggacacagtgaaatgaattactgtctggctttttctt
cttcttttagggcgcaccggcggcttatggacatatggaggtcccaggctaggggtcgaatcggagctgcacctgggt
tctctgggggtccgctcaggctctcaggctgccccagggggtggtgatctgccaggggagccctggcagccaatg
acgtatcatgcccattctccgggattggctgtctgtctttacagctaagaaaggggtgggtcctgtctagtgtgagag
gaaagcagctcacagcctctgagccccactggtcgtctagtacctctctacatttaacaccatgacccccaagac
tcacatcaaggatctccttaccatccctggagtctaccccaagagctccaatactgaatgtttgcacccctgccctttt
ctggtaggctcagccccagcctaggtgacccag-3'

2. Transfección y cribado de células porcinas dirigidas

Los fibroblastos porcinos de cerdos de tamaño miniatura Yucatán recién nacidos o fetales se cultivan a partir de biopsias de la oreja. Las células son cultivadas para una confluencia del 50 % en un matraz de 75 cm² (TPP, Suiza), tripsinizado y resuspendido en 40 ml de medio (DMEM, Lonza, Suiza). Un cuarto (10 ml) se sembró posteriormente en una cápsula Petri de 10 cm². Las células son transfectadas con 6 ug de vector de ADN en reactivo de transfección FuGENE 6 de acuerdo con el protocolo del fabricante (Roche Applied Science). Las células son cultivadas bajo selección con geneticina (Gibco Invitrogen) (1 mg/ml) durante 8 días, se aislaron las colonias de células resistentes a la neomicina, y cada colonia se transfirió a un pocillo de 1,9 cm² (placa de 24 pocillos, TPP, Suiza) y se cultivaron hasta una confluencia del 80 %. Cada colonia es transferida a un pocillo de 9,4 cm² (placa de 6 pocillos, TPP, Suiza), se cultivaron hasta una confluencia del 80 %, y 1/3 de las células se usa para aislamiento de ARN mientras que 2/3 de las células se transfieren a un matraz de 25 cm², se cultivaron hasta una confluencia del 80 % y se almacenaron a -135 °C en DMEM conteniendo 10 % de DMSO hasta su uso posterior en la clonación

artesanal.

5 El cribado de eventos dirigidos específicos del locus se realiza por PCR y Transferencia Southern utilizando ADN genómico extraído de clones resistentes a la neomicina como molde. Para esta PCR, se usa un cebador directo situado aguas arriba del 5' de la región de homología del ApoE y un cebador inverso situado dentro del gen resistente a la neomicina, o un cebador directo situado dentro del gen resistente a la neomicina y un cebador inverso situado aguas abajo del 3' para el brazo de homología del ApoE.

La transferencia Southern es realizada para verificar los eventos dirigidos específicos del locus. El ADN genómico era digerido y las transferencias se sondearon con una sonda de ADN situada fuera de la zona de homología de la ApoE.

10 Los fibroblastos porcinos noqueados en ApoE transgénicos resultantes fueron usados posteriormente para transferencia nuclear de la célula somática (SCNT) por clonación artesanal.

Ejemplo 2

Cerdo noqueado en ApoE creado por recombinación homóloga mediada con AAV

1. Clonación de construcciones dirigidas

15 Parte del intrón 2 (brazo izquierdo de la homología) y del intrón 3 (brazo derecho de la homología) de la ApoE se amplificaron por PCR y se usó junto con un fragmento extraído en gel del vector pNeDaKO-Neo (que contiene un gen resistente a la neomicina) en una PCR de 3 fusiones como se describe por Kohli et al. (Nucleic Acids Research 2004, vol. 32, nº 1).

20 El producto resultante de la PCR que comprende las secuencias del gen ApoE que flanquean el exón 3 y un gen resistente a la neomicina se clonó en el vector pAAV-MCS (Stratagen) del virus adeno-asociado (AAV). El empaquetamiento de esta construcción dirigida (véase más adelante) y la posterior producción de lisado vírico para la infección de células porcinas se realizaron como se describe por Kohli et al. (2004).

Construcción dirigida AAV-MCS/ApoE KO - secuencia (4.055 pb)

25 (región sombreada = Neo-secuencia de pNeDaKO-Neo, regiones no sombreadas = secuencias del gen ApoE, las secuencias del cebador están subrayadas)

**atacatacgcggccgcgggatctgctcgggaatatctgcttgattaggctgatgcagataagggggtgcaaggcttg
gaaggctgtgactggacagggctgggctctgggtgggaggagcgcagccccgcgctgttgagtacaatttctccctcct
gcaggttgccaatcgcaagccagaagatgaggggtctggtgggtgctttggtgtaacctcctcgcaggtatgggggtg
gggcttgctcaggttccctgccccctccccatccccggctgtaccgggtgccccctctcatccctgggtctctctgctggtct
ctctcccctgagggagggcctagatgtgaggcctctctggcactcctgcttctgaacagctcgtttactctctgagcctca
gttccccatcttaaatgggagttatgttgagagattccagctgtggtcagcaggttaagaacccgactagtatccatga
ggaagaggggtcaatcccctggctcgcctcagcgggtaaggatccggcgttgccatgagctgcggcataagtgcagat
gcagctcgaatcgggtgtgtgctgtggctgtggtgcaggtggcagctatcgttccatcgaccctcgctgggaactcc
acgtatgccactggtgcagccctaaaagacaaacaaacaaaacgaaagaaagagaaaagaaaggaaggggg
cttctgtttctaatgcgtgtgtgcctggcaggggcgtgagcattagatacgtgtcagctgtgactagcgtgcacggagcacac
aatccatgctgtccagtaattagacaggctgggtgtccttccacccccctcctgcccaccagtgctctagagaagcccac
ccaccagggctgggggagcacctgctctgtaccaggtaccgtgtgctgctaaagggaaacaaaagctggagctccac
cgcgataactcgtatagcatacattatacgaagttatcgccctaccgggtaggggaggcgcttttccaaggcagtc
tgagcatgcgttagcagccccgctgggcaactggcctacacaagtgccctggtcctgcacacattccacatcca
ccggtaggcgccaaccggctccgttcttgggtggcccctcgccacccttactcctcccctagtcaggaagtcccccc
cgccccgcagctcgcgtcgtgcaggacgtgacaaaatggaagtagcacgtctcactagtctcgtgcagatggacagcac
cgctgagcaatggaagcgggtaggccttggggcagcggccaatagcagcttggctcctcgtttctgggctcagagg
ctgggaaggggtgggtccggggggcgggtcagggggcggggcgccgaaggtcctccgg
aagcccggcattctgcacgctcaaaagcgcacgtctccgcgctgttctcctctcctcatctccgggccttgcacctgca
gccaatatgggatcgccattgaacaagatggattgcacgcaggttctccggcgtgggtggagaggctattcgggcta
tgactgggcacaacagacaatcggctgctgatgcggcgtgtccggctgtcagcgcagggcgcccggttctttttgtc**

aagaccgacctgtccggtgacctgaatgaactgcaggacgagggcagcgcgctatcgtggctggccacgacgggct
 tccctgcgacgtgtctgcagctgtcactgaagcgggaaggactggctgctattggcgaagtgcggggcaggat
 ctccctgcatctcacctgtcctgcggagaaagtatccatcatggctgatgcaatgcggcggctgatalacgctgatccgg
 ctacctgcccattcgaccaccaagcgaaacatcgcatcgagcgagcacgtactcggatggaagccggcttctgcaatca
 ggatgatctggacgaagagcatcaggggctcgcgccagccgaactgtcggcaggctcaaggcgcgatgcccgac
 ggcgaggatctcgtcgtgacctggcgaatgctgtgcgaatatcatgggggaaaatggccgctttctggattcatcg
 actgtggccggctgggtggcgatcgtatcaggacatagcgtggctaccggtgatatgctgaagagctggcggc
 gaatggctgaccgtctcctgctttacggtatgccgctcccattcgcagcgcatcgctctatcgcttctgacga
 gttctctgaggggatcaattctctagagctcgtgatcagcctcactgtgcctctagttgccagccatctgtgtgcccct
 cccccgtgctctctgacctggaagggtccactcccactgtcctttcctaataaaaatgaggaaatgcatcgcatgtctg
 agtaggtgtcattctattctggggggtgggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggca
 tgcgggggatcggtggctctatggctctgagggcgaagaaccagctgggggctgcagcacgtgtgacaattaatc
 atcggcatagtatacggcatagtataatcagactcactataggagggccaccatggccaagttagccagtccgctccg
 gtgctcaccgcgcgacgtcggcgagcggctcgtgagcggcaccggtcgggttctccgggactctgtggagg
 acgacttcggcggtgtggtccgggacgacgtgacctgtcactcagcgcggtccaggaccaggtgggtccggacaaca
 cctggcctgggtgtgggtgcgcgacctggagcagctgtacgccagtggtcggaggctgttccacgaactccggga
 cgctccggggccatgaccgagatcgcgagcagccgtgggggcgggagttcgccctgcgacccggcggg
 caactcgtgcactctggccgaggagcaggactgaataaactctgatagcatalacgaagttatggtaccaat
tcgcctatagtgagtcgtattaccggaccgtgtgtctggacctcaggctccaccctcgggttccctctgctctgtc
 gccaactctggggctcgggtcctgtttctttttcctctcctttttgggggagttactttttctttcttcttcttctg
 tctgtctttcttccatctgtgctcctcctcctctctctggtcagcttccgtccttctgctctctgaatctctggcagctc
 tggccalcgcccagctcaggagccctctctcccccccccccccgcctctctgcgcccagggagctgatagaggga
 gagcatgaaggagggaaggcctaccgagaggagctggaggcgcagctggggcccgctgaccaggagacgcagg
 cgcgctgtccaaggagctcaggcggcgcagggcccgctgggcccgcacatggaggagctgcgcaaccgctgtg
 gctctaccgacgcgaggtgcacaacatgttggccagaccaccgagagctgaggagcgcctggctcccacctgc
 gcaagctgcgcaaggctgtcctccgcacaccgaggacctgcagaagcgcctggccgtgaccaggcggggctgcg
 cgaggggcggagcgcagctgagcgcctccgagcgcctcggggcccctgggagcaggggccgattgcgcgc
 cgccacctgagtagcaggggccggcagccgctgcgcgagcgcgccaagcctggggccagaagctgcgaggac
 ggctggaggagatgggagccgaccgaccgacctggatgagatgctgagcagctggaggagggtgcgacca
 aagtgaggagcaggcagccagtgcgctcaggccgagggcggcgcgctgtatgat

2. Transducción y cribado de células porcinas dirigidas

5 La transducción de fibroblastos porcinos de cerdos de tamaño miniatura Yucatán recién nacidos o fetales se realizó en matraces de 75 cm² como se describe por Kohli et al. (2004). En resumen, las células fueron infectadas con el virus durante 2-3 horas y, posteriormente, se dejaron en cultivo durante 48 horas. Las células fueron recolectadas por tripsinización a las 48 horas después de transducción y se sembraron en placas de 96 pocillos con medios que contenían geneticina para seleccionar las células dirigidas y se dejaron en cultivo durante 2-3 semanas.

10 El cribado inicial para eventos dirigidos específicos del locus se realizó por PCR utilizando ADN genómico extraído de clones resistentes a la neomicina como molde. Para esta PCR, se usó un cebador directo situado fuera del brazo izquierdo de la homología del ApoE y un cebador inverso situado dentro del gen resistente a la neomicina, o un cebador directo situado dentro del gen resistente a la neomicina y un cebador inverso situado fuera del brazo derecho de la homología del ApoE.

15 La transferencia Southern se realizó para verificar los eventos dirigidos específicos al locus. El ADN genómico era digerido y las transferencias se sondearon con una sonda de ADN aguas arriba para el brazo izquierdo de la homología de ApoE o aguas abajo para el brazo derecho de la homología de ApoE.

Los fibroblastos porcinos noqueados ApoE transgénicos resultantes fueron usados posteriormente para transferencia nuclear de la célula somática (SCNT) por clonación artesanal.

Ejemplo 3

Cerdo noqueado en el receptor de LDL por recombinación homóloga

5 Se ha secuenciado parte de la secuencia codificante del receptor de LDL del cerdo de tamaño miniatura (GeneBank acceso nº AF065990). Un vector dirigido que contiene parte de la secuencia génica se crea con un casete de gen resistente a la neomicina sin promotor insertado en uno de los exones para interrumpir la función génica. El vector dirigido es linealizado y transfectado en fibroblastos fetales de Yucatán. Los fibroblastos se cultivan en presencia de G418. Los clones resistentes son cribados para recombinación homóloga por PCR. Los cerdos de tamaño miniatura Yucatán con el noqueado de uno o ambos alelos apoE son creados a partir de células recombinantes mediante clonación "artesanal".

10 Ejemplo 4

Cerdo de expresión disminuida en el receptor de LDL por interferencia de ARN

15 Se ha secuenciado parte de la secuencia codificante del receptor LDL del cerdo de tamaño miniatura (GeneBank acceso nº AF065990). Las dianas eficientes para interferencia de ARN se determinarán empíricamente por expresión transitoria de vectores que contienen 1) una secuencia de ARN de horquilla corta expresada bajo un promotor U6 o H1 que dirige una secuencia del nucleótido 19 en el ARNm del receptor de LDL.

20 Para la expresión estable del ARN de horquilla corta, se construye un vector basado en transposón o retroviral con 1) una secuencia de ARN de horquilla corta expresada bajo un promotor U6 o H1 dirigido a una secuencia del nucleótido 19 en el ARNm del receptor de LDL, 2) un casete de gen resistente a la puomicina, y 3) dos secuencias aisladoras de flanqueo. El vector dirigido basado en transposón es cotransfectado con plásmido que expresa transposasa en cultivos de fibroblastos fetales Yucatán. El vector retroviral es transducido en cultivos de fibroblastos fetales Yucatán. Los fibroblastos se cultivan en presencia de puomicina. Los clones resistentes son cribados para una eficiente regulación reductora del ARNm del receptor de LDL y de la proteína. Los cerdos de tamaño miniatura Yucatán de expresión disminuida del receptor de LDL son creados a partir de células transgénicas por clonación "artesanal".

25 Identificación de los ARNhc eficaces

En este ejemplo, se crea un modelo de la aterosclerosis de tamaño humano por desarrollo de cerdos de tamaño miniatura Yucatán de ingeniería genética en los que las moléculas efectoras de ARN dirigidas contra el receptor LDL endógeno inducen una depuración defectuosa de la lipoproteína y de la hipercolesterolemia.

30 Diez plásmidos que expresan ARNhc dirigidos a diferentes secuencias del nucleótido 19 en el ARNm del receptor de LDL del cerdo de tamaño miniatura Yucatán y un pSUPER.retro.puro de control que expresa un ARNhc irrelevante se creó en el pSUPER.retro.puro (Oligoengine) utilizando las recomendaciones del fabricante.

Tabla 2.

Dianas para ARNhc dirigido al receptor LDL con expresión disminuida		
	Primera base en la secuencia AF065990 de ADNc de cerdo	Secuencia
T1	763	tgtcaaagcggcgagtgca
T2	889	tcccatatctgcaatgacc
T3	1150	accctggaccgtagtgagt
T4	1308	tgacaccattattggcgaa
T5	1309	gacaccattattggcgaag
T6	1439	agactcttccaagagaa
T7	1553	tgaacggagtggacgtcta
T8	1814	tcacaggctcggacataca

Dianas para ARNhc dirigido al receptor LDL con expresión disminuida		
	Primera base en la secuencia AF065990 de ADNc de cerdo	Secuencia
T9	858	CCAACGAGTGTCTGGACAA
T10	1109	CCTACCTCTTCTCACCAA

5 Para medir la capacidad de estos ARNhc para dirigir y facilitar la degradación del ARN del receptor de LDL los autores de la invención establecieron un ensayo de rastreo de luciferasa de Renilla basado en dirigir ARNm para la fusión del receptor de LDL de la luciferasa de Renilla en células HEK293. Parte de la secuencia codificante del receptor de LDL porcina se amplificó mediante RCP del ADN obtenido de fibroblastos de cerdo de tamaño miniatura Yucatán utilizando los cebadores siguientes.

5' AAAACTAGTGCCAAGACGGGAAATGCATC 3' directo

5' AAAACGGGTGCTGTTGATGCTCTTAAGCC 3' inverso

10 El cebador directo contenía un sitio Spel y el inverso un sitio Agel y el segmento del receptor de LDL era clonado en sitios únicos Spel y Agel en el la región 5' UTR del gen luciferasa de Renilla en una versión modificada del vector pSiCheck-2 (Promega) para hacer el vector del LDLR-pSiCheck2.

15 Se sembraron células HEK293 a 19.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos (TPP) en DMEM conteniendo 10 % de suero fetal bovino (Lonza) en el día 0. En el día 1, las células fueron cotransfectadas con 0,04 µg de pSiCheck2-LDLR y 0,36 µg de pSUPER.retro.puro.T1-T10 o pSUPER.retro.puro.shScrambled utilizando reactivo de transfección FuGene 6 (Roche Applied Science). En el día 3, la actividad de la luciferasa se midió utilizando el Dual-Luciferase® Reporter Assay System de Promega. El ensayo se realizó por triplicado. El experimento se repitió dos veces. Los resultados se dan en la Figura 4.

20 Para facilitar la expresión estable de ARNhc eficaces en fibroblastos de cerdo de tamaño miniatura Yucatán, las secuencias de ARNhc son clonadas en uno o ambos ligadores del plásmido pSBT/cHS4.H1p.PGK-puro.U6p.cHS4, en el que los ARNhc son expresados bajo un promotor U6 o H1 de la polimerasa III, véase la Figura 3.

Transfección

25 Los fibroblastos porcinos de cerdos de tamaño miniatura Yucatán recién nacidos o fetales se cultivan en DMEM (Lonza, Suiza) que contiene 15 % de suero fetal bovino (Lonza). Las células se siembran en una cápsula Petri de 10 cm a 1 %, 0,25 % o 0,1 % de confluencia el día 0. En el día 1, el plásmido pSBT-shLDLR es cotransfectado con un plásmido que expresa la HSB3 mutante transposasa Sleeping Beauty hiperactiva (pCMV-HSB3, Yant SR et al. Mol Cell Biol. 2004; 24(20):9239-47). Desde el día 3, las células son seleccionadas en 0,6 microgramos/ml de puromicina (Sigma) durante 14 Días. Se contabiliza el número de clones resistentes (Figura 4) y después se cultivan las colonias con etiqueta HSB3 en 15 % de FCS en DMEM hasta la clonación artesanal.

Expresión del transgen y número de copias

30 Los fibroblastos se cultivan a partir de cerdos clonados recién nacidos en DMEM complementados con 10 % de suero bovino fetal. Para análisis del nivel de disminución de la expresión del receptor de LDL, los fibroblastos se cultivan en DMEM complementado con 10 % suero deficiente en lipoproteína durante 48 horas y el nivel de ARNm del receptor de LDL se determina mediante PCR cuantitativa. El ADN genómico es aislado a partir de fibroblastos por procedimientos estándares. La transferencia Southern utilizando una sonda de un gen (pac) resistente a la puromicina se usa para determinar el número de sitios de integración.

Ejemplo 5

Clonación artesanal (HMC) y establecimiento de embarazos, por ejemplos, 1, 2, 3 y 4.

Para la clonación y la entrega de transgénicos se emplean fibroblastos en la HMC. Las cerdas receptoras reciben un total en el intervalo de 60-70 de una mezcla de blastocistos el día 5 y/o el 6.

40 Excepto donde se indique de otro modo todos los productos químicos se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, EE.UU.).

Recogida de ovocitos y maduración in vitro (IVM)

Los complejos cúmulo-ovocito (COC) son aspirados de folículos de 2 a 6 mm de ovarios de cerdas obtenidos en

mataderos y madurados en grupos de 50 en 400 μ l de medio IVM constituido por TCM-199 (GIBCO BRL) tamponado con bicarbonato complementado con 10 % (vol/vol) de suero bovino (CS), 10 % (vol/vol) de fluido folicular de cerdo, 10 ui/ml de eCG, 5 ui/ml de hCG (Suigonan Vet; Skovlunde, Dinamarca) a 38,5 °C en 5 % de CO₂ en aire humidificado en el Sistema de Incubación Submarino (SIS; Vajta et al., 1997) durante 41-44 h.

- 5 La HMC es realizada mediante un procedimiento basado en la digestión parcial de la zona pelúcida, como se describió anteriormente (Du et al., 2005 y 2007). Los COC maduros son liberados de las células cúmulo en 1 mg/ml de hialuronidasa en TCM-199 tamponado con Hepes. Desde este momento (excepto donde se indique lo contrario) todas las manipulaciones se realizan en una etapa en caliente ajustada a 39 °C, y todas las gotas usadas para manipular ovocitos fueron cubiertas con un volumen de 20 μ l con aceite mineral. Las zonas pelúcidas son
10 parcialmente digeridas con 3,3 mg/ml de solución de pronasa disuelta en T33 (T significa medio TCM 199 tamponado con Hepes; el número significa porcentaje (vol/vol) de complemento de CS, aquí 33 %) durante 20 segundos y después son lavadas rápidamente en gotas de T2 y T20. Los ovocitos con zonas pelúcidas distendidas y ablandadas son alineados en gotas de T20 complementado con 2,5 μ g/ml de citocalasina B. Con una pipeta de vidrio de trazo muy fino, los ovocitos se hacen rotar para colocar el cuerpo polar en la superficie. Mediante bisección orientada con una Cuchilla de Corte con Filo Ultra (AB Technology, Pullman, WA, EE.UU.) menos de la mitad del
15 citoplasma cerca del cuerpo polar es retirado manualmente del citoplasto putativo restante.

- Los fibroblastos de donante transgénico cultivados en una monocapa confluyente en DMEM complementado con 10 % FCS fueron tratados con tripsina y mantenidos en T20 (Kragh et al., 2004). La fusión se realiza en dos etapas. Durante la primera etapa, el 50 % de los citoplastos disponibles se transfieren en 1 mg/ml de fitohemaglutinina (PHA; ICN Pharmaceuticals, Australia) disuelta en T0 durante 3 s, después cada uno fue goteado rápidamente sobre un fibroblasto transgénico único. Después de la unión, los pares de células citoplasto-fibroblasto son equilibrados en medio de fusión (0,3 M de manitol y 0,01 % de PVA) durante 10 s y se transfieren a la cámara de fusión (cámara de fusión de 0,5 mm de microlámina BTX, modelo 450; BTX, San Diego, CA, EE.UU.). Utilizando una corriente alterna (CA) de 0,6 kV/cm y 700 KHz, los pares fueron alineados al alambre de una cámara de fusión con las células somáticas más alejadas del alambre, después se fusionaron con una corriente continua de 2,0 kV/cm durante 9 μ s. Después del pulso eléctrico, los pares de células se incuban en gotas de T10 para observar si la fusión ha tenido lugar.
20

- Aproximadamente 1 h después de la primera fusión, cada par se fusiona con otro citoplasto y se activa simultáneamente en medio de activación (0,3 M de manitol, 0,1 mM de MgSO₄, 0,1 mM de CaCl₂ y 0,01 % de PVA). Utilizando una CA de 0,6 kV/cm y 700 kHz, un par fusionado y un citoplasto se alinean al alambre de la cámara de fusión, con pares fusionados contactando con el alambre, seguido por un único pulso de CC de 0,85 kV/cm durante 80 μ s. Cuando se ha observado la fusión en gotas de T10, los embriones reconstruidos se transfieren en medio cigoto porcino 3 (PZM-3; Yoshioka et al., 2002) complementado con 5 μ g/ml de citocalasina B y 10 μ g/ml de cicloheximida. Después de una incubación de 4 h a 38,5°C en 5 % de CO₂, 5 % de O₂ y 90 % de N₂ con máxima humedad, los embriones se lavaron tres veces en medio PZM-3 antes del cultivo.
30
35

Cultivo y transferencia del embrión

- Los embriones se cultivan a 38,5 °C en 5 % de CO₂, 5 % de O₂ y 90 % de N₂ con máxima humedad en medio PZM-3 en el pocillo del sistema de pocillos (WOW; Vajta et al., 2000). Los blastocistos de Día 5 y 6 con masa celular interna claramente visible son transferidos quirúrgicamente a cerdas Landrace danesas el día 4 o 5 después del destete. Las embarazadas son diagnosticadas por ultrasonografía el día 21 y confirmadas cada dos semanas. Los lechones nacen por cesárea el día 114, 24 h después de tratamiento con prostaglandina F2.
40

Ejemplo 6

Examen del fenotipo de cerdos ateroscleróticos transgénicos

- En las dietas convencionales (\approx 3 % grasa, peso/peso), los cerdos de tamaño miniatura Yucatán tienen bajos niveles de colesterol en plasma (\approx 2 mmol/l) y no desarrollan aterosclerosis. Los cerdos de tamaño miniatura transgénicos modelos de aterosclerosis tienen un nivel de colesterol total esperado de $>$ 5 mM de colesterol total en una dieta normal de los cerdos, que puede acentuarse adicionalmente alimentando con una dieta que contenga 20 % de grasa saturada e incluso más alimentando con una dieta que contenga 20 % de grasa saturada y 1 % de colesterol.
45

- Para caracterizar el nivel de hipercolesterolemia que puede obtenerse en cerdos de tamaño miniatura Yucatán transgénicos, los cerdos de tamaño miniatura Yucatán transgénico y normal se mantienen con una dieta normal de los cerdos, dieta de cerdos complementada con 20 % de grasa saturada o dieta de cerdos complementada con 20 % de grasa saturada y 1 % de colesterol. Se tomaron muestras de sangre en el momento del destete y después cada 3 meses.
50

- El colesterol y los triglicéridos totales en plasma se midieron en un analizador Vitros 950 (Ortho-Clinical Diagnostics). El colesterol HDL (HDL-C) se mide enzimáticamente en un analizador Kone 30 (Thermo) utilizando unos kit de ABX (Triolab, Copenhage, Dinamarca). La distribución de colesterol dentro de las fracciones de lipoproteínas se analiza mediante cromatografía líquida rápida para proteínas.
55

Para caracterizar el nivel de la aterosclerosis inducida por la hipercolesterolemia, los cerdos son examinados mediante ultrasonido intravascular (IVUS) a los 6 meses, 9 meses y 12 meses de edad. Después del último examen, los cerdos de tamaño miniatura son sacrificados y el corazón y las arterias principales son extraídos y diseccionados longitudinalmente para identificar las lesiones ateroscleróticas. Las lesiones ateroscleróticas son fijadas en 4 % de formaldehído durante 24 horas e incorporadas en parafina. Los especímenes se seccionan en serie, se tiñen mediante elastina-tricromo y se analizan microscópicamente. Las lesiones ateroscleróticas se caracterizan de acuerdo con la clasificación descrita por Virmani et al. Se espera que los cerdos transgénicos muestren un engrosamiento intimal patológico y ateromas de caperuza fibrosa.

Ejemplo 7

10 Uso de un modelo porcino de la aterosclerosis en estrategias de ensayo preventivas y terapéuticas

Formación de imágenes a nivel molecular de la aterosclerosis:

15 El diagnóstico por imágenes de la aterosclerosis, que se está convirtiendo en teóricamente posible con la llegada de nueva tecnología de imágenes de alta resolución, es una prometedora nueva herramienta para la estratificación del riesgo de personas asintomáticas. Sin embargo, para desarrollar agentes trazadores/de contraste y secuencias de imágenes que sean capaces de visualizar placas ateroscleróticas y actividad de enfermedad aterosclerótica, se necesita un modelo animal de tamaño humano de la enfermedad que pueda ser examinado mediante escáneres con TC, RM y TEP en el paciente.

20 Ejemplo: La sustancia X se administra de forma intravenosa y se analiza la acumulación en placas ateroscleróticas mediante escaneado de RM, escaneado de CT, escaneado de SPECT, escaneado de PET o ultrasonido intravascular. Después del escaneado, los cerdos de tamaño miniatura son sacrificados. Los especímenes arteriales que contienen lesiones ateroscleróticas son fijados, incrustados en parafina, seccionados, teñidos y analizados microscópicamente. Los resultados obtenidos mediante imágenes se comparan con los hallazgos histológicos.

25 Efecto sobre las placas ateroscleróticas de la colocación de un estent: Las placas en las arterias coronarias de un cerdo transgénico de un año de edad se cartografían por ultrasonido intravascular (IVUS) y se coloca un estent que eluye un fármaco X y un estent de control en las ubicaciones de dos ateromas de caperuza fibrosa. Después de 3 meses, los cerdos son sacrificados y la patología de las lesiones ateroscleróticas con estent colocado se comparan mediante técnicas histológicas.

Estudio del fármaco:

30 A los cerdos de tamaño miniatura transgénicos (6 meses de edad) se da durante 3 meses atorvastatina (3 mg/kg por día) o placebo. Al inicio del estudio se obtienen muestras de sangre y, más adelante, cada mes. Al inicio del estudio y después de 3 meses se llevan a cabo exámenes mediante IVUS de las arterias coronarias. Después del último examen mediante IVUS, los cerdos de tamaño miniatura son sacrificados y se procesan las lesiones ateroscleróticas para su análisis histológico. El efecto de la atorvastatina en la aterosclerosis se determina comparando los datos de IVUS de la serie y la histología de la aterosclerosis en el estudio final entre los grupos de cerdos de tamaño miniatura tratados con atorvastatina y con placebo.

Ejemplo 8

Como alternativa, el casete de ARNhc y de promotor se insertará en fibroblastos fetales utilizando el "Sistema de cerdo maestro"

40 Basado en los mecanismos bien descritos de la transposición de SB (4-8) y recombinación Flp (9, 10), la presente invención divulga un nuevo vector diana para la integración específica del sitio en el genoma. Este vector transporta dentro del contexto de un vector transposón SB un casete de gen bicistrónico que contiene (i) el sitio de recombinación FRT incorporado en la secuencia codificante de eGFP y (ii) un gen con resistencia a la puromicina controlado por el IRES. Los autores de la invención demuestran una inserción del plásmido selectiva y eficiente en el loci genómico etiquetado SB. En un intento por mejorar más el comportamiento de estos vectores, los autores de la invención han analizado el efecto de elementos aisladores, han creído proteger los genes foráneos insertados contra el silenciamiento transcripcional, dentro del contexto de vectores SB. Las investigaciones de los autores de la invención indicaron que los aisladores que flanquean el casete de expresión del gen FRT pueden servir para mantener y estabilizar la expresión génica de transgenes insertados con Flp.

50 En la presente invención se emplean dos tecnologías de integración no viral, el sistema de transposón SB y la recombinasa Flp, en un esfuerzo combinado por lograr la detección del locus activo, mediado por SB, y la inserción dirigida al sitio en un sitio interesante, mediada por Flp. Se divulga una tecnología bifásica en la que un vector SB integrador, que transporta un gen reportero y un gen marcador selectivo, puede servir primero como un reportero para la expresión génica continua y, como consecuencia, como una diana para la inserción génica. Utilizando un vector integrado activamente en lugar del ADN plasmídico que está recombinado aleatoriamente en el genoma los autores de la invención certifican (i) que sólo una copia única, y no concatémicos, del vector son insertados y, además, (ii) que el casete reportero no está flanqueado por secuencias derivadas de la cadena principal del

plásmido bacteriano que pueden tener un efecto perjudicial en la actividad del locus a lo largo del tiempo. En una segunda etapa de modificación este vector puede servir como una diana para la inserción de uno o más casetes de expresión génica en un locus bien caracterizado.

Construcción del vector

5 El vector basado en el trasposón SB usado en este estudio era derivado del vector pSBT/SV40-GFIP.loxP. Este vector contiene, dentro del contexto de un transposón SB, un casete bicistrónico FRTeGFP-IRES-puro (GFIP) flanqueado aguas arriba por un codón de iniciación ATG y aguas abajo por una secuencia poli(A). Además, el vector contiene un sitio de reconocimiento para la recombinasa Cre (loxP) situado entre la repetición invertida superior del vector y el promotor SV40 que controla la expresión del casete FRTeGFP-IRES-puro.

10 Construcción del vector pSBT/SV40-GFIP.loxP

El vector pSBT/RSV-GFIP contiene la terminal invertida del transposón de ADN SB que flanquea un casete de gen bicistrónico de FRT-GFP.IRES.puro controlado por un promotor derivado del virus del sarcoma de Rous (RSV). La secuencia eGFP se amplificó a partir de peGFP.N1 (Clontech) utilizando un cebador directo que contenía la secuencia de FRT de 48-pb. Para analizar la funcionalidad FRT-GFP, la fusión FRT-eGFP se insertó en un vector de expresión que contenía el promotor SV40. El fragmento PCR que contiene el gen de fusión eGFP etiquetado FRT era digerido con MluI y XmaI e insertado en pSBT/RSV-hAAT digerido con MluI/XmaI (pT/hAAT en ref. (8), obtenido de Mark Kay, Stanford University, EE.UU.), generando un vector transposón con la expresión de eGFP controlada por el RSV (pSBT/RSV-eGFP). Un casete IRES-puro era amplificado por la PCR de pectoenv-IRES-puro (proporcionado por Finn Skou Pedersen, University of Aarhus, Dinamarca), digerido con XmaI, e insertado en pSBT/RSV-eGFP digerido con XmaI, generando pSBT/RSV-GFIP (véase la Fig 6). Se generaron versiones alternativas de este vector que contenían el promotor SV40 (pSBT/SV40-GFIP) y el promotor derivado del gen de la ubiquitina humana (pSBT/Ubi-GFIP). Además, insertando un sitio diana de recombinación Cre (loxP) en el sitio MluI situado entre la repetición invertida izquierda del transposón y el promotor SV40 de pSBT/SV40-GFIP, se creó el vector pSBT/SV40-GFIP.loxP. El plásmido pcADN5/FRT donante, que contenía un gen de fusión FRT-hygro sin un codón de iniciación, se obtenía de Invitrogen. El plásmido codificante de Flp, pCMV-Flp, se obtuvo de A. Francis Stewart, University of California San Francisco, EE.UU.). Este plásmido codifica la variante de Flp potenciada designada Flpx9 (11). Un vector SB que contiene dos copias del elemento (12, 13) aislador derivado del sitio 4 (cHS4) hipersensible de la ADNasa de pollo de 1,2-kb se generaba insertando secuencias de cHS4 amplificadas por PCR y un ligador intercalado en pSBT/PGK-puro (obtenido de Mark Kay, Stanford University, EE.UU.) digerido por NotI/Spel. El casete PGK-puro fue retroclonado en la construcción utilizando sitios de restricción situados en el ligador, generando pSBT/cHS4.PGK-puro.cHS4

Para uso adicional en los cerdos se insertó un sitio (loxP-257) de reconocimiento Cre alternativo en un único sitio AscI que se creó por mutagénesis en una posición situada entre la secuencia poli(A) y la repetición invertida inferior del vector. Este vector se designó pSBT/loxP.SV40-GFIP.loxP257. La presencia de dos sitios de recombinación Cre permite el intercambio de casete mediada con recombinasa Cre después de inserción del plásmido basado en Flp, facilitando de ese modo, si se necesita, la eliminación de secuencias de plásmido y genes de selección.

Transposición de SB en fibroblastos primarios de cerdo

Los vectores transposón de SB, bien SBT/PGK-puro o bien el transposón diana SBT/loxP.RSV-GFIP.loxP257, se insertaron en el genoma del fibroblasto del cerdo mediante la cotransfección (utilizando Fugene-6 de Roche) de 1,5 µg pSBT/loxP.RSV-GFIP.loxP257 (o pSBT/PGK-puro) con 1,5 µg de pCMV-SB (o 1,5 µg de pCMV-mSB como un control negativo). El pCMV-SB (derechos de concesión por Perry Hackett, University of Minnesota, Minnesota, EE.UU.) codifica la transposasa Sleeping Beauty reconstruida de elementos transponibles de ADN fósil de pescado salmoide. El pCMV-SB, pCMV-mSB, y la variante hiperactiva pCMV-HSB3 se obtuvieron de Mark Kay, Stanford University, EE.UU. Clones de células marcadas con SB aparecieron como resultado de seleccionar células transfectadas con puromicina (0,5 µg/ml). Las colonias se fijaron y tiñeron en azul de metileno en metanol y posteriormente se contabilizaron.

Transposición de SB sólido en fibroblastos primarios de cerdo

La SB se transpone eficientemente en la mayoría de las células de mamíferos pero con mayor eficacia en células humanas que en células de murino. La transposición de vectores de la SB no se ha analizado nunca en células porcinas, y los autores de la invención han probado inicialmente la actividad en fibroblastos primarios del cerdo. Los autores de la invención han utilizado un trasposón estándar que codifica un gen con resistencia a la puromicina (SBT/PGK-puro) y encontraron niveles decentes de transposición, dando como resultado aproximadamente 75 colonias resistentes al fármaco en cultivos de fibroblastos cotransfectados con pSBT/PGK-puro y pCMV-SB (Fig. 7). Menos de 3 colonias aparecieron después de la transfección con pSBT/PGK-puro y pCMV-mSB, codificando el último una versión inactiva de la transposasa. Curiosamente, se obtuvo una media de casi 140 colonias utilizando la variante HSB3 de transposasa hiperactiva, que indica que HSB3 también en células porcinas intermedian mayores niveles de la transposición comparados con la transposasa SB original.

Inserción eficiente de un vector de SB etiquetado FRT en fibroblastos de cerdo

Para generar clones de células marcadas con SB que contienen un sitio diana de recombinación Flp para la inserción del gen específico del sitio, los autores de la invención cotransfectaron el plásmido pSBT/loxP.SV40-loxP257 con pCMV-mSB, pCMV-SB, y pCMV-HSB3, respectivamente. El HSB3 mostró de nuevo la mayor actividad, dando como resultado aproximadamente 30 colonias resistentes al fármaco después de la transfección de 3 H 10⁴ fibroblastos (Fig. 8).

Las colonias resistentes a la puromicina fueron aisladas y expandidas. El análisis del clon mediante microscopía de fluorescencia mostró una expresión eficiente de FRTEGFP (Fig. 9), demostrando funcionalidad del vector y fácil detección de FRTEGFP en fibroblastos de cerdo. Estos clones de células fluorescentes que transportan la secuencia de recombinación de Flp FRT están siendo usados actualmente en la creación de animales transgénicos clonados producidos por clonación artesanal.

Verificación de SBT/loxP.SV40-GFIP.loxP257 como diana para la recombinación de Flp

Debido a limitaciones de crecimiento a largo plazo de fibroblastos primarios del cerdo en cultivo de tejidos los autores de la invención no pudieron demostrar la inserción génica basada en Flp en vectores de SB etiquetados FRT en fibroblastos de cerdo. Por lo tanto, los autores de la invención escogieron probar la funcionalidad del vector que contenía FRT mediante un conjunto estándar de experimentos de recombinación llevados a cabo en células HEK-293. Los autores de la invención generaron clones de células HEK-293 que contenían el vector SBT/loxP.SV40-GFIP.loxP257 transposado. Mediante cotransfección de tales clones con (i) un plásmido sustrato derivado de pcADN5/FRT que contenía un gen de fusión FRT-hygro y un casete de expresión de la proteína roja fluorescente (RFP) y (ii) un plásmido que codifica la recombinasa Flp (pCMV-Flpx9), los autores de la invención identificaron posteriormente colonias resistentes a la higromicina B. Mediante microscopía de fluorescencia los autores de la invención observaron que los clones de diseñados específicamente para un sitio, como se esperaba, desactivaron la expresión de eGFP y activaron la expresión de RFP (datos no mostrados). Este cambio fenotípico "de verde a rojo" indica que el vector diana integrado derivado de la SB sirve como sitio aceptor para la recombinación basada en Flp.

En conclusión, el vector basado en el transposón de ADN Sleeping Beauty de la presente invención sirve en su forma integrada como una diana para la inserción génica basada en recombinasa. El vector SB es transferido de forma eficiente mediante transposición de corte y empalme en el genoma de fibroblastos primarios porcinos y por lo tanto no está flanqueado por secuencias bacterianas derivadas de plásmido. El empleo de estas células primarias de ingeniería genética, por ejemplo, en la microinyección y en la clonación artesanal permite análisis detallados posteriores de la expresión de eGFP derivados del vector SB en cerdos clonados y la identificación de animales con interesantes perfiles de expresión (p. ej., ubicuo, específico del tejido). Los fibroblastos primarios de tales "cerdos maestros" son modificados por recombinación basada en Flp, permitiendo la inserción del gen dirigido al sitio en un locus marcado con vector de SB que no está silenciado en el tejido de interés. Los cerdos clonados albergan un gen de interés de una enfermedad insertado específicamente en un sitio o un casete de expresión de ARNhc para la regulación reductora de genes endógenos puede ser generados en una segunda ronda de clonación animal.

EJEMPLO 9

Producción de modelo de enfermedad por clonación artesanal

Excepto donde se indique de otro modo todos los productos químicos se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.).

40 Recogida de ovocitos y maduración in vitro (IVM)

Los complejos de cúmulo-ovocito (COC) fueron aspirados de folículos de 2-6 mm de ovarios de cerdas o cerdas jóvenes obtenidas en mataderos. Los COC fueron madurados en grupos de 50 en 400 µl de TCM-199 (GIBCO BRL) tamponado con bicarbonato complementado con 10 % (vol/vol) de suero bovino (CS), 10 % (vol/vol) de fluido folicular de cerdo, 10 ui/ml de eCG, 5 ui/ml de hCG (Suigonan Vet; Skovlunde, Dinamarca) a 38,5 °C en el "Sistema de Incubación Submarino" (SIS; Vajta, et al. 1997) en 5 % de CO₂ en aire humidificado durante 41-44 horas.

Fertilización in vitro (IVF)

Los experimentos de IVF se realizaron con ovocitos madurados in vitro en 3 réplicas idénticas. Después de la maduración, los COC se lavaron dos veces con mTBM que contenía cafeína 2 mM (mTBM_{fert}) y se transfirieron en grupos de 50 a 400 µl de mTBM_{fert}. El semen recién eyaculado se trató como se ha descrito previamente (Booth, et al., en prensa). Después de 2 h de capacitación a 38,5 °C y en 5 % de CO₂ en aire humidificado, se añadió espermatozoides/ml. La fertilización se realizó a 38,5 °C y en 5 % de CO₂ en aire humidificado en el SIS durante 3 h. Después de la inseminación, los presuntos cigotos se sometieron a vórtex en mTBM_{fert} para retirar células cúmulo antes de lavar en medio de IVC y colocar en placas de cultivo (véase, cultivo de embriones y evaluación).

Clonación artesanal (HMC)

El procedimiento de HMC aplicado se basó en trabajos previos de los autores de la invención en ternera y cerdo (Kragh, et al., 2004; Peura y Vajta, 2003; Vajta, et al., 2003), pero con modificaciones significativas. En resumen, 41h después del inicio de la maduración, la inversión cúmulo de los COC se retiró mediante pipeteados repetidos en 1mg/ml de hialuronidasa en TCM199 tamponado con Hepes. Desde este momento (excepto donde se indique de otra manera), todas las manipulaciones se realizaron en una etapa en caliente ajustada a 39 °C, y todas las gotas usadas para manejar ovocitos eran de 20 µl de volumen cubiertas con aceite mineral. Los ovocitos se incubaron brevemente en 3,3 mg/ml de pronasa disuelta en T33 (T para medio TCM 199 tamponado con Hepes; el número significa el porcentaje (vol/vol) de complemento de CS, aquí 33 %) durante 5 s. Antes de que los ovocitos empezaran a llegar a deformarse en la solución de pronasa, fueron recogidos y lavados rápidamente en gotas de T2 y T20. Los ovocitos con zonas parcialmente digeridas pero todavía visibles fueron alineados en gotas de T2 complementado con 3 mg/ml de poli(alcoholvinílico) (TPVA) y 2,5 µg/ml de citocalasina B. Se realizó trisección en lugar de bisección, manualmente, bajo control estereomicroscópico con Cuchilla de Corte con Filo Ultra (AB Technology, Pullman, WA, EE.UU.; Fig. 10a). Los fragmentos de ovocitos triseccionados se recogieron y tiñeron con 5 µg/ml de fluorocromo Hoechst 33342 en gotas de TPVA durante 5 min, después se colocaron en gotas de 1 µl del medio TPVA en el fondo de una cápsula Petri Falcon de 60 mm cubierta con aceite (3-4 fragmentos por gota). Utilizando un microscopio invertido y luz UV, se registraron las posiciones de los fragmentos sin tinción con cromatina (citoplastos) y después se recogieron bajo un estereomicroscopio en gotas de T10 hasta el inicio de la fusión.

Se prepararon células fibroblasto fetales como se ha descrito previamente (Kragh, et al., en prensa). La fusión se realizó en dos etapas donde la segunda incluía también el inicio de la activación. Para la primera etapa, se utilizaron un tercio de los citoplastos seleccionados (preferiblemente, las partes más pequeñas). Con una pipeta de vidrio de trazo muy fino y pulida al fuego, se transfirieron 10 citoplastos como un grupo a 1 mg/ml de fitohemaglutinina (PHA; ICN Pharmaceuticals, Australia) durante 3 segundos, después se gotearon rápidamente individualmente sobre una de las células fibroblastos que se sedimentaron en una gota de T2. Después de la unión, 10 pares de células citoplasto-fibroblasto se equilibraron en medio de fusión (0,3 M manitol y 0,01 % de PVA) durante 10 s. Utilizando una corriente alterna (CA) de 0,6 kV/cm y 700 KHz, los pares de células se alinearon al alambre de una cámara de fusión (cámara de fusión de 0,5 mm de microlámina BTX, modelo 450; BTX, San Diego, CA, EE.UU.) con las células donantes más alejadas del alambre (Fig. 10b), después se fusionaron con una corriente continua (CC) de 2,0 kV/cm durante 9 µs. Después del pulso eléctrico, los pares de células fueron retirados con cuidado del alambre, transferidos a gotas de T10 e incubados para observar si la fusión había tenido lugar.

Aproximadamente 1 hora después de la primera fusión, los pares fusionados juntos con los dos tercios de citoplastos restantes se equilibraron por separado en las gotas del medio de activación (0,3 M de manitol, 0,1 mM de MgSO₄, 0,1 mM de CaCl₂ y 0,01 % de PVA). Bajo una CA de 0,6 kV/cm, se alinearon tripletes de citoplasto-par fusionado-citoplasto secuencialmente al alambre en grupos de 10, con los pares fusionados situados en el medio (Fig. 10c). Un único pulso de CC de 0,7 kV/cm durante 80 µs se usó para la segunda fusión y el inicio de la activación. Los tripletes se retiraron después del alambre y se transfirieron con cuidado a gotas de T10 para comprobar la fusión (Fig. 10d). Los embriones reconstruidos se incubaron en medio de cultivo (véase, cultivo del embrión y evaluación) complementado con 5 µg/ml de citocalasina B y 10 µg/ml de cicloheximida durante 4 h a 38,5 °C en 5 % de CO₂, 5 % de O₂ y 90 % de N₂ con máxima humedad, después se lavaron a fondo por 3 veces en medio de IVC antes del cultivo.

Activación partenogenética (PA)

Se obtuvieron ovocitos partenogenéticamente activados bien de forma separada o en paralelo con HMC. A los ovocitos se les dejó sin sistema inmune en la misma forma de antes excepto que se empleó un incubación en pronasa de mayor duración para conseguir retirar completamente la zona pelúcida. Los ovocitos libres de la zona (ZF) se equilibraron después durante 10 s en medio de activación (manitol 0,3 M, MgSO₄ 0,1 mM, CaCl₂ 0,1 mM y 0,01 % de PVA) y se transfirieron a la cámara de fusión (cámara de fusión de 0,5 mm de microlámina BTX, modelo 450; BTX, San Diego, CA, EE.UU.). Un único pulso de CC de 0,85 kV/cm durante 80 µs se generó con una máquina de fusión de células BLS CF-150/B (BLS, Budapest, Hungría) y se aplicó a ovocitos ZF. Para los ovocitos intactos de la zona (ZI), se empleó un único pulso de CC de 1,25 kV/cm durante 80 µs (de acuerdo con los experimentos preliminares no publicados de los autores de la invención, estos parámetros dieron como resultado la activación y posterior desarrollo in vitro mayores para los ovocitos ZI y ZF, respectivamente). El procedimiento después del pulso eléctrico era el mismo que para embriones de HMC reconstruidos.

Cultivo de embriones y evaluación

Todos los embriones porcinos producidos por los tratamientos anteriores se cultivaron en un medio NCSU37 modificado (Kikuchi, et al., 2002) que contenía 4 mg/ml de BSA a 38,5 °C en 5 % de O₂, 5 % de CO₂ y 90 % de N₂ con máxima humedad. El medio de cultivo se suministró con 0,17 mmol de piruvato sódico y 2,73 mmol de lactato sódico desde el Día 0 (día de la fertilización y de la activación) hasta el Día 2, después el lactato sódico y el piruvato sódico eran reemplazados por 5,5 mmol de glucosa desde el Día 2 hasta el Día 7. Todos los embriones ZF se cultivaron en el sistema WOW (Vajta, et al., 2000) en el mismo medio de cultivo y mezcla de gases utilizados

anteriormente, con un cuidadoso cambio del medio en Día 2 sin retirar los embriones de los WOW. La tasa de blastocisto se registró en Día 7. Para determinar los números de células totales, los blastocistos fueron fijados y montados en una lámina de vidrio de microscopio en glicerol que contenía 20 µg/µl de fluorocromo Hoechst 33342. Después de tinción durante 24 horas, los embriones se observaron bajo un microscopio invertido Diaphot 200 con un accesorio epifluorescente y filtro de UV-2A (Nikon, Tokio, Japón).

10.1

Diferencias en capacidad de desarrollo entre ovocitos derivados de cerdas adultas (2,5 años, 170 kg de peso) y de ovocitos derivados de cerdas jóvenes (5,5-6 meses, 75 kg de peso) se investigaron a través de la PA de ZF y de ZI después de 44 h de maduración in vitro. Se investigaron cuatro grupos combinados en 3 réplicas idénticas: (1) ovocitos ZF de cerdas adultas (2) ovocitos ZI de cerdas adultas (3) ovocitos ZF de cerdas jóvenes (4) ovocitos ZI de cerdas jóvenes. Para activación de la ZF, se aplicó un único pulso de CC de 0,85 kV/cm durante 80 µs, mientras un único pulso de 1,25 kV/cm se empleó para activar ovocitos ZI. Después de 7 días de cultivo como se ha descrito anteriormente, se determinó el porcentaje de blastocistos por embrión activado.

Se investigó la capacidad de desarrollo in vitro de ovocitos partenogenéticamente activados derivados bien de cerdas adultas o de cerdas jóvenes. Como se muestra en la Tabla 3, las tasas de blastocisto de ovocitos de cerdas partenogenéticamente activados fueron significativamente superiores que los de cerdas jóvenes, después de la PA tanto de ZF como de ZI.

Tabla 3

Desarrollo del blastocisto de ovocitos de cerdas adultas o de cerdas jóvenes el Día 7 partenogenéticamente activados				
Zona Libre			Zona Intacta	
	Nº de ovocitos activados	Nº de blastocistos (%) [*]	Nº de ovocitos activados	Nº de blastocistos (%) [*]
Cerda	103	43 (42 ± 4) ^a	110	61 (55 ± 6) ^c
Cerda joven	85	17 (20 ± 2) ^b	137	36 (26 ± 5) ^d

^{a,b,c} Los diferentes superíndices indican diferencias significativas (p < 0,05).
^{c,d} Los diferentes superíndices indican diferencias significativas (p < 0,05).
^{*} Porcentaje (Media ± S.E.M) de embriones desarrollados frente a blastocistos.

La diferencia en la capacidad de desarrollo de ovocitos entre cerdas adultas y cerdas jóvenes se ha examinado en la producción in vitro (IVP) y en los embriones de la transferencia nuclear de la célula somática (SCNT) de forma separada, dando como resultado una conclusión similar como en la publicación anterior de otros grupos de investigación (Sherrer, et al., 2004; Hyun, et al., 2003), es decir, que los embriones de ovocitos derivados de cerdas adultas son superiores a los ovocitos derivados de cerdas jóvenes en apoyar el desarrollo del blastocisto. Aunque las cerdas jóvenes empleadas en el estudio de los autores de la invención estaban al borde de la madurez, la diferencia entre proporciones de blastocisto en Día 7 después de la PA era significativa, demostrando la superior capacidad de desarrollo de los ovocitos de cerdas adultas.

10.2

La factibilidad de la HMC porcina modificada se investigó en 6 réplicas idénticas, con IVF y en paralelo con la PA de la ZF como controles. Los ovocitos de cerda adulta (de acuerdo con el Ejemplo 1), más competentes, se usaron en el Ejemplo 2. Siete días después de la reconstrucción y/o de la activación, se determinó el número de blastocistos por embrión reconstruido y el número total de células de blastocistos seleccionados aleatoriamente.

Más del 90 % de fragmentos de ovocito derivados de ovocitos morfológicamente intactos pudieron ser recuperados por HMC después de la trisección. De media, pudieron reconstruirse 37 embriones de 100 ovocitos maduros. La capacidad de desarrollo de todas las fuentes de embriones porcinos se muestra en la Tabla 4. En Día 7, el desarrollo de los embriones reconstruidos en el estadio de blastocisto era de 17 ±4 % con un número medio de

células de 46 ± 5 , mientras las tasas de blastocisto para IVF, y la PA de la ZF eran de $30 \pm 6 \%$ y $47 \pm 4 \%$ (n=243, 170, 97) respectivamente.

Tabla 4

Desarrollo in vitro de embriones producidos por HMC, IVF y PA de la ZF				
Orígenes del embrión	Nº de embriones/ovocitos en el cultivo	Nº de blastocistos %	Tasas de blastocisto (Media \pm S.E.M).	Número medio de células de blastocistos
HMC	243	41	17 ± 4^a	46 ± 5^d
IVF	170	52	30 ± 6^b	74 ± 6^e
PA de la ZF	97	46	47 ± 4^c	53 ± 7^d

^{a,b,c} Los diferentes superíndices indican diferencias significativas (p < 0,05).
^{d,e} Los diferentes superíndices indican diferencias significativas (p < 0,05).

5 Aunque todavía no se alcanzaba la eficiencia máxima teórica, la integración de la digestión parcial de zona y la trisección de ovocitos casi duplican el número de los embriones reconstruidos comparados con el sistema anterior de los autores de la invención (Kragh, et al., 2004 *Reprod. Fertil. Dev* 16, 315-318). Este aumento en la eficiencia de la reconstrucción puede tener especiales ventajas en la clonación porcina ya que la recuperación del ovocito después de la aspiración es más exigente y ha necesitado más tiempo que en el ganado. Un punto incluso más importante es el elevado número de embriones requerido para el establecimiento de los embarazos después de la transferencia nuclear porcina. El IVC en cerdos es también considerado como un procedimiento exigente e ineficaz (Reed, et al., 1992 *Theriogenology* 37, 95-109). Una desventaja de los sistemas ZF es que los embriones tienen que alcanzar al menos el estadio de mórula compacta o de blastocisto temprano in vitro para evitar la desintegración en el oviducto sin la capa protectora de la zona pelúcida. Por otro lado, una vez en la etapa de blastocisto, los embriones libres de la zona pueden ser transferidos con éxito como se demuestra mediante los becerros nacidos después de la transferencia nuclear de la célula bien embrionaria o somática (Peura et al., 1998; Tecirlioglu et al., 2004; Oback et al., 2003; Vajta, et al., 2004) y también mediante lechones nacidos después de la IVP de ovocitos de la zona libre (Wu, et al., 2004).

20 El medio NCSU37 ha sido el medio más ampliamente utilizado y con mayor éxito para el cultivo de embriones de cerdo. Sin embargo, a pesar del desarrollo mejorado del embrión comparado con otros medios, la viabilidad de embriones porcinos en la IVP está comprometida todavía después de IVC. Algunos informes sugieren que la glucosa no es fácilmente metabolizada por embriones porcinos tempranos antes del estadio de ocho células pero se usó en mayores cantidades en embriones entre los estadios de mórula compacta y de blastocistos (Flood, et al., 1988). La sustitución de glucosa con piruvato y lactato en NCSU37 durante los primeros 2 días de cultivo dieron como resultado una tasa de blastocisto de 25,3 % para embriones porcinos en la IVP en el estudio de Kikuchi (Kukuchi, et al., 2002), que fue corroborado además por los presentes estudios de los autores de la invención con una tasa de blastocistos en la IVP de 30 % de promedio. Además, la primera evaluación de este sistema secuencial del cultivo en HMC porcina y en embriones de la PA de la ZF ha dado como resultado tasas de blastocistos de 17 % y 47 % respectivamente. A veces, la tasa de blastocisto de la PA de la ZI podía incluso alcanzar niveles tan elevados como 30 90 % (Du, no publicado)

Análisis estadístico

Se realizó un análisis ANOVA utilizando SPSS 11.0. Una probabilidad de P<0,05 se consideró que era estadísticamente significativa.

10.3

35 Vitricación de blastocistos porcinos clonados artesanales producidos a partir de ovocitos desgrasados madurados in vitro.

Recientemente se publicó un procedimiento no invasivo para el desgrasado de embriones porcinos con centrifugación pero sin posterior micromanipulación (Esaki et al. 2004 *Biol Reprod.* 71, 432-6).

40 La criopreservación de embriones/blastocistos se llevó a cabo por vitricación utilizando Cryotop (Kitazato Supply Co, Fujinomiya Japón) como se describió anteriormente (Kuwayama et al. 2005a; 2005b). En el momento de la

5 vitrificación, se transfirieron embriones/blastocistos en solución de equilibrio (ES) constituida por 7,5 % (vol/vol) de etilenglicol (EG) y 7,5 % de dimetilsulfóxido (DMSO) en TCM199 complementado con 20 % de sustituto sintético de suero (SSS) a 39°C durante 5 a 15 min. Después de una contracción inicial, los embriones recuperaron su volumen original. Se transfirieron 4-6 embriones/blastocistos a una gota de 20 ul de solución de vitrificación (VS) constituida por 15 % (vol/vol) de EG y 15 % (DMSO) y sacarosa 0,5 M disuelta en TCM199 complementado con 20 % de SSS. Después de incubar durante 20 s, los embriones se cargaron en Cryotop y se sumergieron en nitrógeno líquido. El proceso de la exposición en VS hasta la inmersión se completó en 1 min.

10 Los embriones/blastocistos fueron descongelados por inmersión en Cryotop directamente en solución descongelante (TS) constituida por sacarosa 1,0 M en TCM199 mas 20 % de SSS durante 1 min, después se transfirieron a la solución de dilución (DS) constituida por sacarosa 0,5 M en TCM199 más 20 % SSS durante 3 min. Para eliminar el crioprotector, los embriones/blastocistos se mantuvieron dos veces en una solución de lavado (WS; TCM199 más 20 % de SSS), 5 min para cada vez. La supervivencia de los blastocistos vitrificados se determinó de acuerdo con tasas de reexpansión después de 24 h de recuperación en medio de cultivo complementado con 10 % de suero bovino (CS).

15 El procedimiento de desgrasado no invasivo se aplicó a ovocitos porcinos madurados in vitro y se investigó el desarrollo adicional de los ovocitos desgrasados después de la activación partenogenética en 4 repeticiones idénticas. Los ovocitos se separaron aleatoriamente en grupos de desgrasado y de control.

20 Para el desgrasado, los ovocitos fueron digeridos con 1mg/ml de pronasa en presencia de 50 % de suero bovino (CS) durante 3 min, y se lavaron en medio TCM-199 tamponado con Hepes complementado con 20 % de CS lo cual dio como resultado la digestión parcial de la zona pelúcida (fig. 11a). Posteriormente, se centrifugaron 40-50 ovocitos (12.000 × g, 20 min) a temperatura ambiente en medio TCM-199 tamponado con Hepes complementado con 2 % de CS, 3 mg/ml de PVA y 7,5 µg/ml de citocalasina B (CB) (fig. 11b). Las zonas pelúcidas de ambos ovocitos centrifugados e intactos fueron eliminadas completamente con digestión adicional en 2mg/ml de solución de pronasa. Para la activación, se aplicó una única corriente continua de 85 kV/cm durante 80 us a ambos grupos, seguido de 4 h de tratamiento con 5 µg/ml de CB y 10 µg/ml de cicloheximida (CHX). Todos los embriones se cultivaron después en el medio NCSU37 modificado. Los blastocistos en Día 7 se vitrificaron y calentaron utilizando la técnica Cryotop (Kuwayama et al., RBM Online, en prensa) a 38,5°C. La supervivencia de blastocistos vitrificados se determinó de acuerdo con tasas de reexpansión después de 24 h de recuperación en medio de cultivo complementado con 10 % de CS. Los números de células de blastocistos reexpandidos de ambos grupos se determinaron después de la tinción de Hoechst. Los resultados se compararon mediante análisis de ANOVA. La digestión parcial de la zona y la centrifugación dieron como resultado un desgrasado con éxito en 173/192 (90 %) de los ovocitos. El desarrollo para blastocistos no era diferente entre ovocitos desgrasados e intactos (28 ± 7 % frente a 28 ± 5 %, respectivamente; P>0,05). Sin embargo, las tasas de supervivencia de blastocistos derivados de ovocitos desgrasados fueron significativamente superiores a los desarrollados a partir de ovocitos intactos (85 ± 6 % frente a 32 ± 7 %, respectivamente; P<0,01). No existe diferencia en el número medio de células de blastocistos reexpandidos derivados bien de los ovocitos desgrasados o bien de los intactos (36 ± 7 frente a 38 ± 9, respectivamente; P>0,05). Los resultados demuestran que la sencilla técnica del desgrasado no dificulta la capacidad de desarrollo in vitro de ovocitos porcinos activados, y mejora la criosupervivencia de los blastocistos derivados sin pérdida significativa en el número de células.

40 Después del desgrasado, la zona pelúcida de los ovocitos de ambos grupos era eliminada completamente. Los mismos parámetros descritos anteriormente para la activación eléctrica se aplicaron a ambos grupos. Siete días después de la activación, se determinaron las tasas de blastocistos y los números de las células de los blastocistos.

45 Se investigó la factibilidad de aplicar una técnica de desgrasado no invasiva a ovocitos porcinos madurados in vitro. El 90 % (173/192) de los ovocitos puede ser desgrasado con éxito. Como se muestra en la tabla 5, el desarrollo para blastocistos no era diferente entre ovocitos desgrasados e intactos (28 ± 7 % frente a 28 ± 5 %, respectivamente; P>0,05). Sin embargo, las tasas de supervivencia de blastocistos derivados de ovocitos desgrasados fueron significativamente superiores a los desarrollados a partir de ovocitos intactos (85 ± 6 % frente a 32 ± 7 %, respectivamente; P<0,01). No existe diferencia en el número medio de células de blastocistos reexpandidos derivados bien de los ovocitos desgrasados o bien de los intactos (36 ± 7 frente a 38 ± 9, respectivamente; P>0,05).

50 Tabla 5. Capacidad de desarrollo y criosupervivencia de embriones vitrificados-descongelados a partir de ovocitos activados desgrasados e intactos.

Tratamiento del ovocito	Ovocito activado	Tasa de blastocisto (%)	Blastocisto reexpandido después del calentamiento (%)	Número medio de células de blastocistos reexpandidos
Desgrasados	173	28 ± 7	85 ± 6	36 ± 7
Intactos	156	28 ± 5	32 ± 7	39 ± 9

Clonación artesanal de ovocitos desgrasados

Los ovocitos desgrasados se usaron para HMC en 5 réplicas. Se utilizaron cuatro réplicas idénticas de ovocitos no desgrasados para HMC como un sistema de control. Siete días después de la reconstrucción, los blastocistos producidos a partir de ambos grupos fueron vitrificados con Cryotop. Las tasas de supervivencia y los números de células de blastocistos re-expandidos se determinaron como se describe para los blastocistos producidos por PA.

Excepto donde se indique lo contrario, todas las manipulaciones se realizaron en una etapa en caliente ajustada a 39°C, y todas las gotas usadas para manipular los ovocitos eran de 20 µl de volumen cubiertas con aceite mineral. Para la transferencia nuclear de la célula somática, la clonación artesanal (HMC) descrita por los autores de la invención en un trabajo previo (Du, et al., 2005) se aplicó con una sencilla modificación: para la enucleación de ambos ovocitos desgrasados y de control, se aplicó la bisección en lugar de la trisección.

En resumen, después de la eliminación de la inversión cúmulo, los ovocitos de control se incubaron en 3,3 mg/ml de pronasa disuelta en T33 durante 10 s. Antes de que los ovocitos empezaran a llegar a deformarse en la solución de pronasa, fueron recogidos y lavados rápidamente en gotas de T2 y T20. Los ovocitos desgrasados después de la centrifugación fueron digeridos en los 3,3 mg/ml de la solución de pronasa durante unos adicionales 5 s.

Tanto los ovocitos de control como los desgrasados con zonas pelúcidas parcialmente digeridas, distendidas y ablandadas fueron alineados en gotas de T2 complementado con 2,5 µg/ml de citocalasina B. La bisección se realizó manualmente bajo control estereomicroscópico (Fig 11 c) con Cuchilla de Corte con Filo Ultra (AB Technology, Pullman, WA, EE.UU.). Las mitades se recogieron y tiñeron con 5 µg/ml de fluorocromo Hoechst 33342 en gotas de T2 durante 5 min, y después se colocaron en gotas de 1 µl del medio T2 en el fondo de una cápsula Petri Falcon de 60 mm cubierta con aceite (3-4 mitades por gota). Usando un microscopio invertido y luz UV, se registraron las posiciones de las mitades sin tinción con cromatina (citoplastos). Los citoplastos se recogieron más tarde bajo un estereomicroscopio y se almacenaron en gotas de T10.

Las células de fibroblasto fetal porcino se prepararon con digestión en tripsina a partir de monoláminas como se describió previamente (Kragh, et al., 2005). La fusión se realizó en dos etapas donde la segunda incluía también la iniciación de la activación. Durante la primera etapa, el 50 % de los citoplastos disponibles fueron transferidos en 1 mg/ml de fitohemaglutinina (PHA; ICN Pharmaceuticals, Australia) disuelta en T0 durante 3 s, después se goteó rápidamente sobre células fibroblastos individuales. Después de la unión, los pares de células citoplasto-fibroblasto fueron equilibrados en medio de fusión (0,3 M de manitol y 0,01 % de PVA) durante 10 s y se transfirieron a la cámara de fusión. Utilizando una corriente alterna (CA) de 0,6 kV/cm y 700 KHz, los pares fueron alineados al alambre de una cámara de fusión con las células somáticas más alejadas del alambre (Fig. 11 d), después fusionados con una corriente continua de 2,0 kV/cm durante 9 µs. Después del pulso eléctrico, los pares de células fueron retirados con cuidado del alambre, transferidos a gotas de T10 e incubados para observar si la fusión había tenido lugar.

Aproximadamente 1 hora después de la primera fusión, cada par se fusionó con otro citoplasto en medio de activación. Se aplicaron corriente AC y un único pulso de CC de 0,7 kV/cm durante 80 µs como se ha descrito anteriormente. La fusión se detectó en gotas de T10, después de que los embriones reconstruidos fueran transferidos en medio IVC0-2 (véase Cultivo y evaluación del embrión) complementado con 5 µg/ml de citocalasina B y 10 µg/ml de cicloheximida. Después de una incubación de 4 h a 38,5°C en 5 % de CO₂, 5 % de O₂ y 90 % de N₂ con máxima humedad, los embriones se lavaron tres veces en medio IVCO-2 antes del cultivo.

Tabla 6. Capacidad de desarrollo y criosupervivencia de embriones vitrificados-descongelados de embriones SCNT porcinos derivados de ovocitos desgrasados e intactos.

Grupo HMC	Nº de embriones reconstruidos	Tasa de blastocisto (%) [*]	Blastocisto reexpandido después del calentamiento (%) [*]	Número medio de células de blastocistos reexpandidos [*]
Desgrasados	240	21 ± 6 ^a	79 ± 6 ^b	41 ± 7 ^d
Intactos	150	23 ± 6 ^a	32 ± 8 ^c	39 ± 5 ^d

Los superíndices diferentes indican diferencias significativas (p < 0,05).

*: media ± S.E.M.

La capacidad de desarrollo in vitro se observó en la HMC con ovocitos desgrasados cuando las tasas de blastocistos en Día 7 se compararon con el grupo de la HMC de control (21 ± 6 % frente a 23 ± 6 %, respectivamente; P>0,05).

Tabla 6). La tasa de criosupervivencia después de la vitrificación de blastocistos derivados de ovocitos desgrasados era significativamente superior a los desarrollados a partir de ovocitos intactos ($79 \pm 6 \%$ frente a $32 \pm 7 \%$, respectivamente; $P < 0,01$).

10. 4

5 Enucleación artesanal químicamente asistida (CAHE) y comparación con los procedimientos existentes

Después de 41-42 h de maduración in vitro, los COC fueron cultivados adicionalmente durante 45 min en la misma solución complementada con 0,4 $\mu\text{g/ml}$ de demecolcina. Células cúmulo se retiraron después pipeteando en 1 mg/ml de hialuronidasa disuelta en TCM-199 tamponado con Hepes. Desde este momento (excepto donde se indique de otra manera), todas las manipulaciones se realizaron en una etapa en caliente ajustada a 39 °C. Todas las gotas usadas para manejar ovocitos eran de 20 μl de volumen, y estaban cubiertas con aceite mineral.

Las etapas básicas del procedimiento de la HMC han sido descritas en otra parte en el presente documento. En resumen, ovocitos sin células cúmulos se incubaron en 3,3 mg/ml de pronasa disuelta en T33 (T para medio TCM 199 tamponado con Hepes; el número significa el porcentaje vol/vol de complemento de CS, aquí 33 %) durante 20 s. Cuando tiene lugar la lisis parcial de la zona pelúcida y ligera deformación de los ovocitos, fueron recogidos y lavados rápidamente en gotas de T2 y T20. Nueve ovocitos fueron alineados en una gota T2 complementada con 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de citocalasina B (CB). Utilizando una pipeta de trazo muy fino y pulida al fuego, los ovocitos se rotaron para encontrar un ligero cono de extrusión y/o un cuerpo polar unido fuertemente en la superficie, y se realizó la bisección orientada manualmente bajo control estereomicroscópico con una microcuchilla (AB Technology, Pullman, WA, EE.UU.). Menos de la mitad del citoplasma (cerca de la extrusión o del PB) se separó de la parte restante (Fig. 12). Después de la bisección de los 9 ovocitos en la gota, las partes más grandes y las partes más pequeñas (con la extrusión o el PB unido) se recogieron y se colocaron en gotas separadas de T2, respectivamente.

Enucleación artesanal orientada sin tratamiento con demecolcina (OHE)

Todas las etapas fueron similares al procedimiento previamente descrito, pero no se aplicó preincubación con demecolcina.

25 Bisección artesanal aleatoria para la enucleación (RHE)

También se omitió la preincubación con demecolcina del pretratamiento de este grupo. Después de la retirada de células cúmulo, las zonas pelúcidas fueron parcialmente digeridas mediante pronasa como se ha descrito anteriormente. La bisección idéntica artesanal aleatoria se aplicó en gotas de T2 complementado con 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de CB. Todos los demi-ovocitos fueron seleccionados y teñidos con 10 $\mu\text{g/ml}$ de Hoechst 33342 en gotas de T2 durante 10 min, después se colocaron en gotas de 1 μl de medio T2 cubiertas con aceite mineral (tres demi-ovocitos en cada gota). Usando un microscopio invertido y luz UV, se registraron las posiciones de los demi-ovocitos sin cromatina, es decir, citoplastos. Estos citoplastos fueron recogidos más tarde bajo un estereomicroscopio y almacenados en gotas de T2 antes de manipulaciones adicionales.

Fusión e inicio de la activación

35 Se prepararon células de fibroblasto fetal porcino como se ha descrito previamente (Kragh, et al., 2005, Du, et al., 2005). La fusión se realizó en dos etapas, donde la segunda incluía también el inicio de la activación. Para la primera etapa, con una pipeta de vidrio de trazo muy fino y pulida al fuego, se colocaron aproximadamente 100 células somáticas en una gota de T2, y se colocaron 20-30 citoplastos en una gota de T10. Después de un corto equilibrio, se transfirieron grupos de 3 citoplastos a 1 mg/ml de fitohemaglutinina (PHA) durante 2-3 segundos, después cada una se goteó rápidamente sobre una célula somática individual. Después de la unión, los pares de citoplasto-célula somática se recogieron de nuevo y se transfirieron a un medio de fusión (0,3 M de manitol complementado con 0,01 % [peso/vol] de PVA). Utilizando una corriente alterna (CA) de 0,6 kV/cm y 700 KHz, los pares equilibrados se alinearon al alambre de una cámara de fusión (cámara de fusión de 0,5 mm de microlámina BTX, modelo 450; BTX, San Diego, CA) con las células somáticas más alejadas del alambre, después fusionadas con una corriente continua (CC) de 2,0 kV/cm durante 9 μs . Los pares se retiraron del alambre después con cuidado hasta una gota de T10, y se incubaron adicionalmente para observar si la fusión había tenido lugar.

Aproximadamente 1 h después de la fusión, los pares fusionados y los citoplastos restantes se equilibraron por separado en el medio de activación (0,3 M de manitol, 0,1 mM de MgSO_4 , 0,1 mM de CaCl_2 y 0,01 % de PVA). Utilizando una CA de 0,6 kV/cm, un par y un citoplasto se alinean al alambre de la cámara de fusión, con los pares fusionados en contacto con el alambre. Un único pulso de CC de 0,86 kV/cm durante 80 μs se usó para la segunda fusión y el inicio de la activación. La fusión se comprobó después de la incubación en gotas de T10.

Clonación tradicional (CT)

La micromanipulación fue realizada con un microscopio invertido Diaphot 200 (Nikon, Tokio, Japón), como se describió anteriormente (Chen et al., 1999; Zhang et al., 2005). En resumen, después de 42-44 h de maduración in vitro, las células cúmulo fueron retiradas como se ha descrito anteriormente. Todas las manipulaciones se realizaron

en una etapa en caliente ajustada a 39°C. Una gota individual de solución de micromanipulación de 50 µl se puso en el área central en una tapa de un plato de cultivo de 60 mm y se cubrió con aceite mineral. En la misma gota se colocaron grupos de 20-30 ovocitos y células fibroblastos fetales. Después de incubación durante 15-30 min, se fijó un ovocito con una pipeta de sujeción (diámetro interior = 25-35 µm y diámetro exterior = 80-100 µm). Después de estar situado en la posición de las 5-6 en punto en el reloj, el primer cuerpo polar y el citoplasma adyacente (approx. 10 % del volumen total del ovocito) conteniendo presuntamente placa metafase fueron aspirados y retirados con una pipeta de inyección biselada (diámetro interno = 20 µm). Después se inyectó una célula fibroblasto fetal en el espacio a través de la misma rendija. Después de transferencia nuclear (NT), los pareados reconstruidos fueron transferidos en gotas de medios cubiertas con aceite mineral para la recuperación durante 1 a 1,5 horas hasta que se realizó la fusión y la activación. El medio de recuperación fue NCSU-23 complementado con 4 mg/ml de BSA y 7,5 µg/ml de CB. Los pareados reconstruidos fueron incubados en medio de fusión durante 4 min. Los pareados fueron alineados manualmente utilizando un capilar de vidrio finamente estirado y pulido para realizar el contacto plano paralelo a los electrodos. Después, se aplicó un único pulso de 2,0 kV/cm de corriente continua de 30 µs. Después del cultivo en gotas de IVC0-2 (especificado en "Cultivo y evaluación del embrión") complementado con 7,5 µg/ml de CB durante 30-60 min, los resultados de la fusión se examinaron bajo un estereomicroscopio. Los pareados fusionados se sometieron a un segundo pulso en la solución de activación. Después de 30 min de incubación en T10 fueron transferidos a IVCO-2 para evaluar el desarrollo in vitro.

Etapas adicionales de activación

Después del pulso de la activación, todos los embriones reconstruidos se incubaron en IVC0-2 complementado con 5 µg/ml de CB y 10 µg/ml de cicloheximida a 38,5 °C en 5 % de CO₂, 5 % de O₂, y 90 % de N₂, con máxima humedad.

Cultivo y evaluación del embrión

4 h más tarde, todos los embriones reconstruidos y activados se lavaron y cultivaron en placas Nunc de cuatro pocillos en 400 µl de IVC0-2 cubiertos por aceite mineral a 38,5°C en 5 % de CO₂, 5 % de O₂, y 90 % de N₂, con máxima humedad. IVC0-2 era un medio NCSU37 modificado (Kikuchi, et al., 1999), que contenía 4 mg/ml de BSA, 0,17 mM de piruvato sódico, y 2,73 mM de lactato sódico desde Día 0 (el día de la activación) hasta el Día 2. Piruvato sódico y lactato sódico se reemplazaron con 5,5 mM de glucosa desde el Día 2 hasta el Día 7 (IVC2-7). Todos los embriones libres de las zonas se cultivaron en el sistema Pocillo del Pocillo (WOW) (Vajta, et al., 2000) en el mismo medio de cultivo y mezcla de gases usada anteriormente, con un cuidadoso cambio del medio en Día 2 sin retirar los embriones de los WOW. Los embriones del TC se cultivaron en grupos de 15 a 30 en pocillos de placas de cuatro pocillos utilizando la misma cantidad y composición del medio. Las tasas de división y de blastocisto se registraron en Día 2 y Día 7, respectivamente. Para determinar los números de células totales, los blastocistos fueron fijados y montados en una lámina de vidrio de microscopio en una pequeña cantidad (<2 µl) de glicerol que contenía 10 µg/ml de Hoechst 33342. Después de tinción durante varias horas a temperatura ambiente, los embriones se observaron bajo un microscopio invertido Diaphot 200 con un accesorio epifluorescente y filtro UV-2A (Nikon, Tokio, Japón).

Comparación de la eficiencia de CAHE frente a OHE

La eficiencia y fiabilidad de CAHE se ensayó en 12 réplicas idénticas utilizando un total de 620 ovocitos. Después de 41-42 h de maduración, los ovocitos se sometieron a incubación con demecolcina. La bisección orientada se realizó en ovocitos en los que se detectó un cono de extrusión y/ un PB fuertemente unido después de digestión parcial con pronasa. Se registraron los porcentajes de ovocitos biseccionados frente a totales y de ovocitos sobrevivientes frente a biseccionados. Posteriormente, se recogieron de forma separada tanto los citoplastos putativos como los carioplastos y se tiñeron con Hoechst 33342 (10 µg/ml en T2 durante 10 min). La presencia o ausencia de cromatina se detectó bajo un microscopio fluorescente invertido (Fig. 13).

La eficiencia y fiabilidad de la OHE se investigó en 9 réplicas idénticas utilizando un total de 414 ovocitos. Después de 42-43 h de maduración in vitro, se realizó bisección orientada se realizó en ovocitos maduros donde se detectó un cono de extrusión y/o PB después de digestión parcial con pronasa. Los resultados se evaluaron como se describió en el párrafo anterior.

Los resultados se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7 La eficiencia de la enucleación artesanal químicamente asistida (CAHE) y enucleación artesanal orientada (OHE)

Grupos	Nº de ovocitos tratados	Ovocitos biseccionados/totales (%)*	Citoplasto/bisección (%)*	Citoplasto/ovocitos totales (%)*
CAHE	620	96 ± 1 ^a	94 ± 2 ^b	90 ± 3 ^c

ES 2 547 015 T3

Grupos	Nº de ovocitos tratados	Ovocitos biseccionados/totales (%) [*]	Citoplasto/bisección (%) [*]	Citoplasto/ovocitos totales (%) [*]
OHE	414	92 ± 2 ^a	88 ± 3 ^b	81 ± 4 ^d

*: media ± D.A. (desviaciones absolutas)
Los superíndices diferentes indican diferencia (p < 0,05)

5 No se detectaron diferencias entre los grupos considerando conos de extrusión y/o cuerpos polares unidos permitiendo bisección orientada o en las tasas de lisis, y la enucleación con éxito por la relación de ovocitos biseccionados era también similar. Sin embargo, la eficiencia global del procedimiento medida mediante número de citoplasto por ovocitos totales era mayor en el grupo de la CAHE que en el grupo de la OHE.

Comparación del desarrollo in vitro de embriones producidos con CAHE, RHE y TC

10 En 8 réplicas, un total de 468 ovocitos madurados in vitro se distribuyeron aleatoriamente y se sometieron a tres de los procedimientos de enucleación descritos anteriormente. Se registraron las tasas de fusión entre citoplasto y fibroblastos donantes. Los embriones reconstruidos se activaron y cultivaron como se describió anteriormente. Las tasas de división y de blastocisto se determinaron en Día 2 y Día 7, respectivamente. Las características estereomicroscópicas de los blastocistos desarrollados se compararon entre grupos.

Tabla 8: Capacidad de desarrollo de embriones derivados de enucleación artesanal químicamente asistida (CAHE), enucleación artesanal aleatoria (RHE) y clonación tradicional (CT) basada en un micromanipulador.

Grupos	Nº de embriones reconstruidos	Tasa de la fusión (%) [*]	Tasa de la división (%) [*]	Tasa de blastocisto (%) [*]	Nº de células de blastocistos (Día 7)
CAHE	150	87 ± 7 ^a	97 ± 6 ^b	28 ± 9 ^d	57 ± 6 ^e
RHE	86	81 ± 4 ^a	87 ± 8 ^b	21 ± 9 ^d	49 ± 7 ^e
TC	178	81 ± 10 ^a	69 ± 9 ^c	21 ± 6 ^d	53 ± 6 ^e

*: media ± D.A. (desviaciones absolutas)
Los superíndices diferentes indican diferencia (P < 0,05)

15 Las tasas de fusión después de enucleación eran similares entre CAHE, RHE y TC, respectivamente. La segunda fusión y activación dieron como resultado pérdidas insignificantes (<1 %) en los primeros dos grupos. Aunque la TC dio como resultado menores tasas de la división por embrión reconstruido que los otros dos grupos, esta diferencia no estaba presente en las tasas de blastocisto por embrión reconstruido.

20 Las características estereomicroscópicas (tamaño; proporción estimada y contornos de la masa celular interna) no se diferenciaban entre los grupos. Los números de células (57 ± 6 frente a 49 ± 7 frente a 53 ± 6) de los blastocistos producidos a partir de CAHE, RHE y TC se muestran en la Tabla 8, Fig. 14 y Fig. 15.

Análisis estadístico

El AVEDEV se realizó mediante software Excel de Microsoft XP y el ANOVA se realizó mediante el sistema SAS. Una probabilidad de P<0,05 se consideró que era estadísticamente significativa.

25 10.5

Producción de lechones

Clonación artesanal (HMC)

30 Cuarenta y una horas después del inicio de la maduración in vitro, la inversión cúmulo de los COC se retiró mediante pipeteados repetidos en 1 mg/ml de hialuronidasa en TCM199 tamponado con Hepes. Desde este momento (excepto donde se indique de otra manera), todas las manipulaciones se realizaron en una etapa en caliente

ajustada a 39 °C, y todas las gotas usadas para manejar ovocitos eran de 20 µl de volumen cubiertas con aceite mineral. Los ovocitos se incubaron brevemente en 3,3 mg/ml de pronasa disuelta en T33 (T para medio TCM 199 tamponado con Hepes; el número significa porcentaje (vol/vol) de complemento de suero bovino (CS), aquí 33 %) durante 20 segundos y después se lavaron rápidamente en gotas de T2 y T20. Los ovocitos con zonas parcialmente digeridas pero todavía visibles se alinearon en gotas de T2 complementado con 2,5 µg/ml de citocalasina B (CB). Con una pipeta de vidrio de trazo muy fino y pulida al fuego, los ovocitos se rotaron para encontrar el cuerpo polar (PB) en la superficie, y se realizó la bisección orientada manualmente bajo control estereomicroscópico con una microcuchilla (AB Technology, Pullman, WA, EE.UU.). Por ello, menos de la mitad del citoplasma del ovocito (cerca de la extrusión o PB) se retiró del citoplasma restante. Los citoplastos se lavaron dos veces en gotas de T2 y se recogieron en una gota de T10.

Las células fibroblasto fetal se prepararon como se ha descrito previamente (Kragh, P.M. et al. *Theriogenology* 64, 1536-1545 (2005)).

La fusión se realizó en dos etapas donde la segunda incluía también el inicio de la activación. Para la primera etapa, se usaron las mitades de los citoplastos putativos. Con una pipeta de vidrio de trazo muy fino y pulida al fuego, se transfirieron 10 citoplastos como un grupo a 1 mg/ml de fitohemaglutinina (PHA; ICN Pharmaceuticals, Australia) durante 3 segundos, después se gotearon rápidamente individualmente sobre una de las células fibroblastos que se sedimentaron en una gota de T2. Después de la unión, 10 pares de células citoplasma-fibroblasto se equilibraron en medio de fusión (manitol 0,3 M y 0,01 % PVA) durante 10 segundos. Utilizando una corriente alterna (CA) de 0,6 kV/cm y 700 KHz, los pares de células se alinearon al alambre de una cámara de fusión (cámara de fusión de 0,5 mm de microlámina BTX, modelo 450; BTX, San Diego, CA, EE.UU.) con las células somáticas más alejadas del alambre, después se fusionaron con una corriente continua (CC) de 2,0 kV/cm durante 9 µs. Después del pulso eléctrico, los pares de células fueron retirados con cuidado del alambre, se transfirieron a gotas de T10 y se incubaron para observar si había tenido lugar la fusión.

Aproximadamente 1 h después de la primera fusión, los pares fusionados junto con los citoplastos restantes se equilibraron por separado en las gotas del medio de activación (0,3 M de manitol, 0,1 mM de MgSO₄, 0,1 mM de CaCl₂ y 0,01 % de PVA). Bajo una CA de 0,6 kV/cm, citoplasma-par fusionado se alinearon secuencialmente al alambre en grupos de 10, con pares fusionados alejados del alambre. Un único pulso de CC de 0,7 kV/cm durante 80 µs se usó para la segunda fusión y el inicio de la activación. Los pares se retiraron después del alambre y se transfirieron con cuidado a las gotas de T10 para comprobar la fusión. Los embriones reconstruidos se incubaron en medio PZM-3 complementado con 5 µg/ml de CB y 10 µg/ml de cicloheximida durante 4 h a 38,5 °C en 5 % de CO₂, 5 % de O₂ y 90 % de N₂ con máxima humedad, después se lavaron a fondo antes del cultivo.

Clonación tradicional (TC)

La micromanipulación se realizó con un microscopio invertido Diaphot 200 (Nikon, Tokio, Japón). Las células cúmulo se retiraron como se ha descrito anteriormente después de 42 a 44 h de maduración. Todas las manipulaciones se realizaron en una etapa en caliente ajustada a 39 °C. Una única gota de 50 µl de la solución de micromanipulación (NCSU-23 complementado con 4 mg/ml de BSA y 7,5 µg/ml de CB) se puso en el área central en una tapadera de una placa de cultivo de 60 mm y se cubrió con aceite mineral. En la misma gota se colocaron grupos de 20 a 30 ovocitos y células fibroblastos fetales. Después de incubación durante 15 a 30 min, se fijó un ovocito con una pipeta de sujeción (diámetro interior = 25-35 µm y diámetro exterior = 80-100 µm). Después de estar situado en la posición de las 5-6 en punto en el reloj, el primer cuerpo polar y el citoplasma adyacente (aprox. 10 % del volumen total del ovocito) conteniendo presuntamente placa metafase se aspiraron y retiraron con una pipeta de inyección biselada (diámetro interno = 20 µm). Después, se inyectó una célula fibroblasto fetal en el espacio a través de la misma ranura. Después de transferencia nuclear (NT), los pareados reconstruidos fueron transferidos en gotas de medios cubiertas con aceite mineral para la recuperación durante 1 a 1,5 horas hasta que se realizó la fusión y la activación. Los pareados reconstruidos fueron incubados en medio de fusión durante 4 min. Los pareados fueron alineados manualmente utilizando un capilar de vidrio finamente estirado y pulido para realizar el contacto plano paralelo a los electrodos. Después, se aplicó un único pulso de 2,0 kV/cm de corriente continua de 30 µs. Después del cultivo en gotas de medio PZM-3 complementado con 7,5 µg/ml de CB durante 30-60 min, los resultados de la fusión se examinaron bajo un estereomicroscopio. Los pareados fusionados se sometieron a un segundo pulso en la solución de activación. Después de 30 min de incubación en T10 fueron transferidos a medio PZM-3 para evaluar el desarrollo in vitro.

Cultivo y transferencia del embrión

Los embriones reconstruidos se cultivaron en medio PZM-3 (Dobrinsky, J.T. et al. *Biol Reprod* 55, 1069-1074 (1996)) complementado con 4 mg/ml de BSA. Los embriones libres de la zona producidos a partir de la HMC se cultivaron en el sistema de los WOW modificados (Feltrin, C. et al. *Reprod Fertil Dev* 18, 126 (2006)). Dos líneas celulares diferentes (LW1-2 para HMC, LW2 para TC) se usaron como células donante nuclear para HMC y TC para permitir la identificación de la cría de los dos procedimientos. LW1-2 y LW2 originan dos fetos a partir de un cruce (con Duroc) y Landrace danés puro, respectivamente.

La tasa media de blastocisto por embrión reconstruido después del cultivo in vitro durante 7 Días era de 50,1 ± 2,8 %

(media \pm S.E.M), que es significativamente mayor ($p < 0,01$) para HMC que la de TC realizada en paralelo en el laboratorio de los autores de la invención (Tabla 9) y también la mayor de la que se haya informado nunca en la clonación del cerdo.

Tabla 9

Desarrollo de embriones in vitro producidos a partir de clonación artesanal y clonación tradicional				
Grupo	Donante de célula somática	Nº de embriones reconstruidos	Tasa de la división (%)	Tasa de blastocisto (%)
HMC	LW1-2	643	83,7 \pm 4,90 ^a	50,06 \pm 2,80 ^a
TC	LW2	831	74,86 \pm 13,16 ^b	28,98 \pm 2,84 ^b

^{a, b}. Los valores de superíndices diferentes dentro de las columnas son significativamente diferentes ($p < 0,05$).
*: media \pm S.E.M.

5

Blastocistos mixtos producidos a partir tanto de HMC como TC se transfirieron quirúrgicamente a 11 cerdas adultas sincronizadas de forma natural en Día 4 o 5 del ciclo estral. Seis (55 %) receptoras fueron diagnosticadas de embarazo mediante ultrasonografía, 2 abortados y en el momento de escribir esto 2 habían parido 3 y 10 lechones, respectivamente. Un tamaño de camada de 10 lechones clonados es, de acuerdo con los autores de la invención, el mayor tamaño de camada logrado hasta ahora en la clonación del cerdo. Todos están sanos y se comportan normalmente excepto uno que muestra una flexión rígida de la unión distal de una pata delantera. %).

10

De forma preliminar, los resultados sugieren que cuando se transfirieron embriones de etapas similares, las receptoras en Día 4 del ciclo estral soportaron el establecimiento del embarazo mejor que los del Día 5 (Tabla 10).

Tabla 10. Desarrollo in vivo de embriones porcinos clonados

Número del receptor	Embriones transferidos		Etapas del embrión (Día)	Ciclo del receptor (Día)	Estado del embarazo	Nº de lechones nacidos		Duración de la gestación (Día)
	Embrión HMC	Embrión TC				Lechones a partir de HMC	Nº Lechones a partir de TC	
1327	22	10	D5,6,7	4	Y	2	1	116
1539	36	10	D7	4	Y	8	2	115
1309	30	28	D5,6	4	Y			
1553	45	44	D5,6	4	Y			
1668	48	18	D5,6	5	Y, abortado			
1428	78	22	D5,6	5	Y, abortado			
1725	44	4	D5,6,7	5	N	-	-	-
1643	22	11	D5,6,7	4	N	-	-	-
1520	30	26	D5,6	4	N	-	-	-

Número del receptor	Embriones transferidos		Etapas del embrión (Día)	Ciclo del receptor (Día)	Estado del embarazo	Nº de lechones nacidos		Duración de la gestación (Día)
	Embrión HMC	Embrión TC				Lechones a partir de HMC	Nº Lechones a partir de TC	
1363	37	7	D6,7	5	N	-	-	-
1560	99	42	D5,6,7	5	N	-	-	-

Análisis de microsatélites

5 El análisis parental utilizando 10 marcadores de microsatélites porcinos diferentes confirmó el genotipo idéntico de lechones clonados y células donantes usadas en la transferencia nuclear. La identificación se hizo mediante análisis de microsatélites de ADN genómico de cada lechón recién nacido, la cerda adulta sustituta, y los fibroblastos LW1-2 y LW2 de la piel del donante que provienen de dos fetos que representan Landrace danesa y Duroc, respectivamente. Diez loci de microsatélites polimórficos (SW886, SW58, SW2116, SW1989, SW152, SW378, KS139, SO167, SW1987 y SW957) situados en cromosomas porcinos diferentes se amplificaron mediante PCR multiplex de 3 colores y los productos se analizaron en el Genetic Analyzer 3130 X1 (Applied Biosystems) utilizando el programa Gene Mapper 3.7.

10 Para la segunda receptora, la tasa de crías por embrión (22 %) era la más elevada jamás informada hasta ahora en la clonación del cerdo (Walker, S.C. et al. Cloning Stem Cells 7, 105-112 (2005); Hoshino, Y. et al. Cloning Stem Cells 7, 17-26 (2005)). Se obtuvieron eficiencias comparables de nacidos vivos/embriones transferidos en HMC (17 %) y TC (15 %).

15 Análisis estadístico

Las diferencias entre los grupos experimentales se evaluaron utilizando pruebas-t para muestras independientes mediante SPSS 11.5. $P < 0,05$ se consideró significativo.

Secuencias

SEQ ID NO: 1: Secuencia del gen de la ApoE de Sus scrofa

SEQ ID NO: 2: Proteína ApoE de Sus scrofa

```

1  ctcgagaggg agtgagggtt aaaactctgt ggtgcaacgg aaacgaatcc aactgggaaa
61  ccatgaggct gtgggttggg tccccggcct cgctcaatgg gttaaggatc cagcacggcg
121 ctgccgtgag ctgtggtgta ggtcgcagac gaagcttggg tcccacttgg ctgtggctgt
181 ggctgtggct gtggtgtagg cccgcagctg taactgtaat tcgacccta gcctgggaac
241 ctccacaagc cacgggtgtg gccctaaaaa gcaaaaaaac gaaagcaaaa agaacactct
301 caaagcctaa actttgagca aaaagaacac tctcaaagcc taaactttga gcagatgcct
361 tacaccgccc ccacgcctct catccccttt ctgtctgggc ctccagctcc cttcccctt
421 aaccagaaa tcccagacct cagacccaag gatttcgaat ccccaggcct tggcccaatt
481 ctatcatccc agcacaggac aagaaaaaag cagggccggg ctttctggtc ctgctcctct
541 ccctgccagc ccaccccacc agtggcatgg aaaaagctcc ggaattactg ggtgaaaaaa
601 acctcttcca tggggctgg aattaggggg ggggtgatgg ttgccaaccc caccctccc
661 ctccctccct tccccacc tgcctgtgta aaggggaggg cagcccactt cgtgaccoga
721 cgggggctgg ccagctggc cccagtctc gaggagtggg cggggcgggg ggagccctat
781 aattggccga atctgggctc cctgaatcat actcagcccc ggaggaggaa ggaggaaaga
841 ggaggaggaa gcaaccggtg aggagcagac ctgggggcac agagatgggc tcggggcttc
901 ggtgtggggg ggtgggctgt cgggggagga ggaaatgacc tggcccccg gggccaccac
961 cgaggcagga gtgggggatg aggctagagc ccagggactg gacctagaag gagggtgggc
1021 agcaggagga ggttatccgc cttggctgga aggggaggtc agggaaagcag cgggacctgt
1081 aggaagaacc agacgagcca gagccgacga attgtactgg caggatggc gcactactc
1141 aagttttgag cacactaaga gctccatcga ggagaccag ggggtggcgc gaccaggggt
1201 gacctcgacc gggctggcgg cagggtagct agagcgttgg tggaaaggaca tgtaaatgag
1261 gattaaatta gggaatgagt ggaaaacagg gtttagatgt gaagtggag cttggaatgt
1321 gaaggtacca ggaagaacgt gagcttgag cccagaaagc aaggctgggg ctccatggg
1381 actccagggt ggaaggggtg gggggcgacg tgggtggaat ttgaaccctg ggaaaaaagg
1441 aaggcttttg gccgcaccgc acctggggat ggggagatag gagaagacaa tgagggaatt
1501 acacggacaa tggaaaggat ctgctcggga aatatctgct tggattaggc tgatgcagat
1561 aagggggtgc aaggcttggg aggctgtgac tggacagggc tgggctctgg gtgagaggag
1621 cgagccccgc cgctgttgag tgacaatttc tccctcctgc aggttggcca atcgcaagcc
1681 agaagatgag ggttctgtgg gttgctttgg tggtaaccct cctcgcaggt atgggggtgg
1741 ggcttgctca ggttccctgc ccctcccca tccccggtgc ccctcctca tccctgggtc
1801 tcttctgctg gtctctcttc cccttgagga gaggcctaga tgtgaggcct ctctggcact
1861 ccttgcttct gaacagctcg ttttactctc tgagcctcag tttcccctc tttaaaatgg
1921 gagttatggt gagagattcc agctgtggct cagcaggtta agaaccgac tagtatccat
1981 gaggaagagg gttcaatccc ctggcttcgc tcagcgggtt aaggatccgg cgttgccatg
2041 agctgcgcca taagtcgcag atgcagctcg aatcgggtgt tgctgtggct gtggtgcagg
2101 ctggcagcta tcgcttccat cggaccctc gcctgggaac ttccacgtat gccactggtg
2161 cagccctaaa agacaacaaa acaaaaacga aagaaagaga aaagaaagga aagggggctt
2221 ctgtttctaa tgcgttggtg cctggcaggg cgtgagcatt agatacgtgt cagctgtgac
2281 tagcgtgcac ggagcacaca atccatgctt gtccagtaat tagacaggct ggggtgcctt

```

ES 2 547 015 T3

2341 ccacccccctc cctgcccacc agtgctctag agaagcccac ccaccagggc tgggggagca
 2401 cctgctctgt accagggtacc gtgtgctggg agggggcaga ggacctgatg gctgtgaact
 2461 ggctcgggtc aggatgccgg acagaggacg agccggggcc gccgccggag gtgcacgtgt
 2521 ggtgggagga gcccaagtgg cagggcagcc agccctggga gcaggccctg ggccgcttct
 2581 gggattacct gcgctgggtg cagtccctgt ctgaccaagt gcaggaggag ctgctcagca
 2641 ccaagggtcac ccaggaactg acgtaagtgc ccaccgact cccgccgcgc gcgcgcgcgc
 2701 gcgcgcgcgc gcctgaccct cctggcgaac cgtgtgttct ggacctcag gctccacccg
 2761 tccgggttct cttctgtcct tgctgccaac tcttgggggt ctgggtctct gtttctttt
 2821 tttcttctct ctttttttgg ggggaaaaaa ctttttcttt tttctttcat ttgacttcat
 2881 gtcttgcttt ctttccatct tgagctcctg ccttcgctct tctctgggtc agtcttgccg
 2941 tcccttgctg tctctgaatc tctggcacgt cctggccatc gccagctcag gagccctcct
 3001 tctccccctc accgcccccg ccctctctgc gcccaggggag ctgatagagg agagcatgaa
 3061 ggaggtgaag gcctaccgcg aggagctgga ggcgagctg ggccccgtga cccaggagac
 3121 gcaggcgcgc ctgtccaagg agctgcaggc ggcgagggcc cgcgtgggag ccgacatgga
 3181 ggagctgctc aaccgcttgg tgctctaccg cagcgagggt cacaacatgt tgggccagac
 3241 caccgaggag ctgctggacc gcctggcttc ccacctgcgc aagctgcgca agcggctgct
 3301 ccgcgacacc gaggacctgc agaagcgctt ggccgtgtac caggcggggc tgcgcgaggg
 3361 cgccgagcgc agcgtgagcg ccctccgcca gcgcctcggg cccctgggtg agcagggccg
 3421 attgcgcgcc gccaccctga gtaccagggc cggccagccg ctgcgcgagc gcgcggaagc
 3481 ctggggccag aagctgcgcg gacggctgga ggagatgggc agccggaccg gcgaccgcct
 3541 ggatgagatg cgtgagcagc tggaggaggt gcgcaccaa gtggaggagc agggcagcca
 3601 gttgcgcctg caggccgagg gattccacgc cctcctcaa ggctggttcg agcctctggt
 3661 ggaagacata cggcgccagt gggccgggct ggtggagagg atgcagtcgg gcgtgagcat
 3721 aagctcctcc acctctgcgc ccagtataaa tcagtgagtg ccctctcatc cgggcacccc
 3781 cttcggggcc cgttctctgc ccaactcccc cgcctcccc agccttagat gccctcttgg
 3841 tgggccctct ctttaataag attcatcaag cttcacagca gcttctgggt gtccccggtg
 3901 tgatttctca gctccagcct cagtttccct ttccttccct gcactgacca cccagttctc
 3961 tgctctgccc tctgctgtg tggtgtctatt tgtctcttct ccccttttct ttttttttgg
 4021 gccgagccca tggcatgcgg aagttcccc ggccagggat tgaaccctat ccacagccgc
 4081 cacaacgaag gatccttaac tactagggca ccagggaact ccatectttc taactctgtc
 4141 tttgctttcc ctttttttagc gttttagggc tgaccctca gcatgtggaa gtccccaggc
 4201 taggggtcaa attggcgcta cagctgccag cctacaccac agccccagca acgcaggatt
 4261 cctcgag

ApoE de Sus scrofa

LOCUS	SSU70240	4267 pb	ADN	lineal	MAM 10-AGO-1998
DEFINICIÓN	Gen apolipoproteina E (Apo-E) de Sus scrofa, CDS completa.				
ACCESO	U70240				
VERSIÓN	U70240.1 GI:2388608				
PALABRAS CLAVE	.				
FUENTE	Sus scrofa (cerdo)				
ORGANISMO	Sus scrofa				
	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; mamiferoia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Suina;Suidae; Sus.				

ES 2 547 015 T3

REFERENCIA	1 (bases 1 a 4267)	
AUTORES	Ramsoondar, J.J., Rucker, E.B., Vasquez, J.C., Gallagher, D.S., Grimm, D.R., Lunney, J.K., Schook, L.B. y Piedrahita, J.A.	
TÍTULO	Isolation and genetic characterization of the porcine apolipoprotein E gene.	
PUBLICACIÓN	Anim. Genet. 29 (1), 43-47 (1998)	
PUB. MED.	9682450	
REFERENCIA	2 (bases 1 a 4267)	
AUTORES	Ramsoondar, J.J. y Piedrahita, J.A.	
TÍTULO	Presentación Directa	
PUBLICACIÓN	Presentado (10-SEP-1996) VAPH, Texas A&M University, College Station, TX 77843, EE.UU.	
CARACTERÍSTICAS		Lugar/Calificadores
	fuelle	1..4267
		/organismo="Sus scrofa"
		/tipo_de_molécula="ADN genómico"
		/xref_de_bd="taxón:9823"
	gen	832..3879
		/gen="Apo-E"
	ARNm	unión(832..857, 1686..1728, 2473..2662, 3037..879)
		/gen="Apo-E"
	exón	832..857
		/gen="Apo-E"
		/número=1
	intrón	858..1662
		/gen="Apo-E"
		/número=1
	exón	1663..1728
		/gen="Apo-E"

ES 2 547 015 T3

		/número=2
	CDS	unión (1686..1728, 2473..2662, 3037..3757)
		/gen="Apo-E"
		/nota="lipoproteína en plasma"
		/inicio_de_codón=1
		/producto="apolipoproteína-E"
		/id_de_proteína= "AAC29512.1"
		/xref_de_bd="GI:2388609"
<pre> /translati on="MRVLWVALVVTLLAGCRTEDEPGPPPEVHVWWEPEKWQGSQPWE QALGRFDYLRWVQSLSDQVQEELSTKVTQELTELIEESMKEVKAYREELEAQLGPV TQETQARLSKELQAAQARVGADMEDVRNRLVLYRSEVHNMLGQTTEELRSRLASHLRK LRKRLLRDTEDLQKRLAVYQAGLREGAERSVSALRERLGLPLVEQGRLRAATLSTRAGQ PLRERAEAWGQKLRGRLEEMGSRTDRLDREMQLEEVRTKVEEQGSQLRLQAEGFHA LLKGFWEPLVEDIRRQWAGLVERMQSGVSISSSTSAPSDNQ" </pre>		
	intrón	1729..2472
		/gen="Apo-E"
		/número=2
	exón	2473..2662
		/gen="Apo-E"
		/número=3
	intrón	2663..3036
		/gen="Apo-E"
		/número=3
	exón	3037..3879
		/gen="Apo-E"
		/número=4

ORIGEN

1 ctcgagaggg agtgaggggtt aaaactctgt ggtgcaacgg aaacgaatcc aactgggaaa
 61 ccatgagggct gtgggttgga tccccggcct cgctcaatgg gttaaggatc cagcacggcg
 121 ctgccgtgag ctgtggtgta ggtcgcagac gaagcttgga tcccacttgg ctgtggctgt
 181 ggctgtggct gtggtgtagg cccgcagctg taactgtaat tgcacccta gcctgggaaac
 241 ctccacaagc cacgggtgtg gccctaaaaa gcaaaaaaac gaaagcaaaa agaacactct
 301 caaagcctaa actttgagca aaaagaacac tctcaaagcc taaactttga gcagatgcct
 361 tacaccgccc ccacgcctct catccccctt ctgtctgggc ctccagctcc cttccccctt
 421 aacccagaaa tcccagacct cagacccaag gatttcgaat ccccaggcct tggccaatt
 481 ctatcatccc agcacaggac aagaaaaaag cagggccggg ccttctggtc ctgtcctct
 541 ccctgccagc ccaccccacc agtggcatgg aaaaagctcc ggaattactg ggtgaaaaaa
 601 acctcttcca tgggggctgg aattaggggg ggggtgatgg ttgccaacc caccctccc
 661 ctccctccct tccccacc tgcctgtgta aaggggaggc cagccactt cgtgaccgga
 721 cgggggctgg cccagctggc cccagttctg gaggagtggg cggggcgggg ggagccctat
 781 aattggccga atctgggctc cctgaatcat actcagccc ggaggaggaa ggaggaagga
 841 ggaggaggaa gcaaccgggtg aggagcagac ctgggggcac agagatgggc tcggggcttc
 901 ggtgtggggg ggtgggctgt cgggggagga ggaaatgacc tggcccccg gggccaccac
 961 cgaggcagga gttggggatg aggctagagc ccagggactg gacctagaag gagggtgggc
 1021 agcaggagga ggttatccgc cttggctgga aggggaggtc agggaagcag cgggacctgt
 1081 aggaagaacc agacgagcca gagccgacga attgtactgg caggtatggc gcatctactc
 1141 aagttttgag cacactaaga gctccatcga ggagaccag ggtggcggc gaccaggggt
 1201 gacctcgacc gggctggcgg cagggtagct agagcgttg tggaggaca tgtaaatgag
 1261 gattaaatta ggaatgagt ggaaaacagg gtttagatgt gaagtggag cttggaatgt
 1321 gaaggtacca ggaagaacgt gagcttgag cccagaaagc aaggctggg ctcacatggg
 1381 actccagggg ggaaggggtg gggggcgacg tgggtggaat ttgaaccctg ggaaaaaagg

ES 2 547 015 T3

```

1441 aaggtttttg gccgcacccg acctggggat ggggagatag gagaagacaa tgaggggaatt
1501 acacggacaa tggaaaggat ctgctcggga aatatctgct tggattaggc tgatgcagat
1561 aaggggggtgc aaggcttggg aggctgtgac tggacagggc tgggctctgg gtgagaggag
1621 cgagccccgc cgctgttgag tgacaatttc tccctcctgc aggttgcca atcgcaagcc
1681 agaagatgag ggttctgtgg gttgctttgg tggtaaccct cctcgcaggt atgggggtgg
1741 ggcttgctca ggttccctgc ccctcccca tccccgggc ccctcctca tccctgggtc
1801 tcttctgctg gtctctcttc cccttgagga gaggcctaga tgtgaggcct ctctggcact
1861 ccttgcttct gaacagctcg ttttactctc tgagcctcag tttccccatc tttaaaatgg
1921 gagttatggt gagagattcc agctgtggct cagcaggtta agaaccggac tagtatccat
1981 gaggaagggt gttcaatccc ctggcttcgc tcagcgggtt aaggatccgg cgttgccatg
2041 agctgcggca taagtgcgag atgcagctcg aatcgggtgt tgctgtggct gtggtgcagg
2101 ctggcagcta tcgcttccat cggaccctc gcctgggaac tccacgtat gccactgggt
2161 cagccctaaa agacaacaa acaaaaacga aagaaagaga aaagaaagga aagggggctt
2221 ctgtttctaa tgcgttggtg cctggcaggg cgtgagcatt agatacgtgt cagctgtgac
2281 tagcgtgcac ggagcacaca atccatgctt gtccagtaat tagacaggct ggggtgcctt
2341 ccacccctc cctgccacc agtgctctag agaagccac ccaccaggc tgggggagca
2401 cctgctctgt accaggtacc gtgtgctggg agggggcaga ggacctgatg gctgtgaact
2461 ggctcgggtc aggatgcgag acagaggacg agccggggcc gccgcggag gtgcacgtgt
2521 ggtgggagga gcccaagtgg cagggcagcc agccctggga gcaggccctg ggccgcttct
2581 gggattacct gcgctgggtg cagtccctgt ctgaccaagt gcaggaggag ctgctcagca
2641 ccaaggtcac ccaggaactg acgtaagtgc ccaccgact cccgccgcgc gcgcgcgcgc
2701 gcgcgcgcgc gcctgacct cctggcgaac cgtgtgttct ggaccctcag gctccacccg
2761 tccgggttcc cttctgtcct tgcgcgaac tcttgggggt ctgggtctct gtttctttt
2821 tttccttct ctttttttg ggggaaaaaa cttttcttt tttcttcat ttgacttcat
2881 gtcttgcttt ctttccatct tgagctcctg ccttcgctg tctctgggtc agtcttgccg
2941 tccttctgct tctctgaatc tctggcacgt cctggccatc gccagctcag gagccctcct
3001 tctccccctc accgccccgc ccctctctgc gccagggag ctgatagagg agagcatgaa
3061 ggaggtgaag gcttaccgcg aggagctgga ggcgcagctg ggccccgtga cccaggagac
3121 gcagggcgcgc ctgtccaagg agctgcaggc ggcgcaggcc cgcgtgggcg ccgacatgga
3181 ggacgtgcgc aaccgcttgg tgctctaccg cagcaggtg cacaacatgt tgggcccagac
3241 caccgaggag ctgcccagcc gcctggcttc ccacctgcgc aagctgcgca agcggctgct
3301 ccgcgacacc gaggacctgc agaagcgcct ggccctgtac cagggcgggc tgccgagggg
3361 ccccagcgc agcgtgagcg ccctccgcga gcgcctcggg cccctgggtg agcagggccc
3421 attgcgcgcc gccaccctga gtaccaggcc cggccagccg ctgcccagac gcgcggaagc
3481 ctggggccag aagctgcgcg gacggctgga ggagatgggc agccggacc cgcaccgcct
3541 ggatgagatg cgtgagcagc tggaggaggt gcgcaccaa gtggaggagc agggcagcca
3601 gttgcgcctg cagggccagc gattccacgc cctcctcaa ggctgggtcg agcctctggt
3661 ggaagacata cggcgcagc gggccgggct ggtggagag atgcagtcg gcgtgagcat
3721 aagctcctcc acctctgcgc ccagtataa tcagtgagt cctctctc cgggcacccc
3781 cttcggggcc cgttctctgc ccaactcccc cgcctcccc agccttagat gccctcttgg
3841 tgggccctcg cttaataaag attcatcaag cttcacagca gcttctgggt gtccccgggt
3901 tgatttctca gctccagcct cagtttccct ttccttccct gcactgacca cccagttctc
3961 tgcctgccc tctgctgtg tgtgtctatt tgtctctt ccccttttc tttttttt
4021 gccgagccca tggcatgcgg aagttcccc ggccagggt tgaaccatg ccacagccgc
4081 cacaacgaag gatcettaac tactaggcca ccaggaact ccatccttc taactctgtc
4141 tttgcttcc ctttttagc gttttaggc tgcacctca gcatgtgaa gtccccaggc
4201 taggggtcaa attggcgcta cagctgccag cctacaccac agccccagca acgcaggatt
4261 cctcgag

```

ApoE

Gen apolipoproteína E (Apo-E) de Sus scrofa, CDS completo.

ES 2 547 015 T3

ACCESO	U70240	
VERSIÓN	U70240.1 GI:2388608	
PALABRAS CLAVE	.	
FUENTE	Sus scrofa (cerdo)	
ORGANISMO	Sus scrofa	
	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; mamíferoia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Suina;Suidae; Sus.	
REFERENCIA	1 (bases 1 a 4267)	
AUTORES	Ramsoondar, J.J., Rucker, E.B., Vasquez, J.C., Gallagher, D.S., Grimm, D.R., Lunney, J.K., Schook, L.B. y Piedrahita, J.A.	
TÍTULO	Isolation and genetic characterization of the porcine apolipoprotein E gene	
PUBLICACIÓN	Anim. Genet. 29 (1), 43-47 (1998)	
PUB. MED.	9682450	
REFERENCIA	2 (bases 1 a 4267)	
AUTORES	Ramsoondar, J.J. y Piedrahita, J.A.	
TÍTULO	Presentación Directa	
PUBLICACIÓN	Presentado (10-SEP-1996) VAPH, Texas A&M University, College Station, TX 77843, EE.UU.	
CARACTERÍSTICAS		Lugar/Calificadores
	fuelle	1..4267
		/organismo="Sus scrofa"
		/tipo_de_molécula="ADN genómico"
		/xref_de_bd="taxón:9823"
	gen	832..3879
		/gen="Apo-E"
	ARNm	unión (832..857, 1686..1728, 2473..2662, 3037..879)
		/gen="Apo-E"
	exón	832..857

ES 2 547 015 T3

		/gen="Apo-E"
		/número=1
	intrón	858..1662
		/gen="Apo-E"
		/número=1
	exón	1663..1728
		/gen="Apo-E"
		/número=2
	CDS	unión (1686..1728, 2473..2662, 3037..3757)
		/gen="Apo-E"
		/nota="lipoproteína en plasma"
		/inicio_de_codón=1
		/producto="apolipoproteína-E"
		/id_de_proteína= "AAC29512.1"
		/xref_de_bd="GI:2388609"
<pre> /translacion="MRVLWVALVVTLLAGCRTEDEPGPPPEVHVWWEPPKWQGSQPWE QALGRFWDYLRWVQSLSDQVQEELLSKVTQELTELIEESMKEVKAYREELEAQLGPV TQETQARLSKELQAAQARVGADMEDVRNRLVLYRSEVHNMLGQTTEELRSRLASHLRK LRKRLLRDTEDLQKRLAVYQAGLREGAERSVSALRERLGPLVEQGRLRAATLSTRAGQ PLRERAEAWGQKLRGRLEEMGSRTRDRLDREMQLEEVRTKVVEEQGQLRLQAEGFHA LLKGWFEPLVEDIRRWAGLVERMQSGVSISSSTSAPSDNQ" </pre>		
	intrón	1729..2472
		/gen="Apo-E"
		/número=2
	exón	2473..2662
		/gen="Apo-E"
		/número=3
	intrón	2663..3036

ES 2 547 015 T3

		/gen="Apo-E"
		/número=3
	exón	3037..3879
		/gen="Apo-E"
		/número=4

Homo sapiens

LOCUS	AF261279	5491 pb	ADN	lineal	PRI 27-OCT-2000
DEFINICIÓN	Gen apolipoproteína-E de homo sapiens, CDS completo.				
ACCESO	AF261279				
VERSIÓN	AF261279.1 GI:11034800				
PALABRAS CLAVE	.				
FUENTE	Homo sapiens (humano)				
ORGANISMO	Homo sapiens				
	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; mamíferoia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominidae; Homo.				
REFERENCIA	1 (bases 1 a 5491)				
AUTORES	Nickerson, D.A., Taylor, S.L., Fullerton, S.M., Weiss, K.M., Clark, A.G., Stengard, J.H., Salomaa, V., Boerwinkle, E. y Sing, C.F.				
TÍTULO	Sequence diversity and large-scale typing of SNPs in the human apolipoprotein E gene				
PUBLICACIÓN	Genome Res. 10 (10), 1532-1545 (2000)				
PUB. MED.	11042151				
REFERENCIA	2 (bases 1 a 5491)				
AUTORES	Nickerson, D.A.				
TÍTULO	Presentación Directa				
PUBLICACIÓN	Presentado (27-ABR-2000) en el Department of Molecular Biotechnology, University of Washington, Box 357730, Seattle, WA 98195, EE.UU.				
CARACTERÍSTICAS		Lugar/Calificadores			

ES 2 547 015 T3

	fuerate	1..5491
		/organismo="Homo sapiens"
		/tipo_de_molécula="ADN genómico"
		/xref_de_bd="taxón:9606"
		/cromosoma="19"
		/mapa="19q13.2"
	región repetición	de <3.>108
		/nota="putativo"
		/familia_de_rpt="MIR"
		/tipo_de_rpt= dispersado
	variación	73
		/frecuencia="0,01"
		/reemplazar="t"
	región_de_repetición	<207.>295
		/nota="putativo"
		/familia_de_rpt="MIR"
		/tipo_de_rpt= dispersado
	variación	308
		/frecuencia="0,01"
		/reemplazar="t"
	satélite	<320.>339
		/nota="putativo"
		/tipo_de_rpt= tándem
	región_de_repetición	<340.>637
		/nota="putativo"

ES 2 547 015 T3

		/familia_de_rpt="Alu"
		/tipo_de_rpt= dispersado
	variación	471
		/frecuencia="0,01"
		/reemplazar="g"
	variación	545
		/frecuencia="0,01"
		/reemplazar="t"
	variación	560
		/frecuencia="0,22"
		/reemplazar="t"
	variación	624
		/frecuencia="0.07"
		/reemplazar="c"
	satélite	<638.>718
		/nota="putativo"
		/tipo_de_rpt= tándem
	variación	832
		/frecuencia="0,45"
		/reemplazar="t"
	ARNm	unión (1060..1094, 1855..1920, 3013..3205, 3786..4645)
		/producto="apolipoproteína-E"
	variación	1163
		/frecuencia="0,35"
		/reemplazar="c"
	variación	1522

ES 2 547 015 T3

		/frecuencia="0,01"
		/reemplazar="a"
	variación	1575
		/frecuencia="0,01"
		/reemplazar="t"
	CDS	unión (1878..1920, 3013..3205, 3786..4503)
		/nota="APOE"
		/inicio_de_codón=1
		/producto="apolipoproteína-E"
		/id_de_proteína= "AAG27089.1"
		/xref_de_bd="GI:11034801"
<pre> /translacion="MKVLWAALLVTFFLAGCQAKVEQAVETEPEPELRFQQTIEWQSGQRW ELALGRFWDYLRWVQTLSEQVQEELLSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTP VAEETRARLSKELQAAQARLGADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLR KLRKRLLRDADDLQKRLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGS LAG QPLQERAQAWGERLRARMEEMGSRTRDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQ . ARLKSWEPLVEDMQRQWAGLVEKVAQAVGTSAAFVPSDNH" </pre>		
	variación	1998
		/frecuencia="0,10"
		/reemplazar="a"
	región_de_repetición	<2124.>2435
		/nota="putativo"
		/familia_de_rpt="Alu"
		/tipo_de_rpt=dispersado
	variación	2440
		/frecuencia="0,21"
		/reemplazar="a"
	región_de_repetición	<2569.>2848

ES 2 547 015 T3

	ón	
		/nota="putativo"
		/familia_de_rpt="Alu"
		/tipo_de_rpt= dispersado
	variación	2907
		/frecuencia="0,01"
		/reemplazar="g"
	variación	3106
		/frecuencia="0,01"
		/reemplazar="c"
	región_de_repetición	<3472.>3588
		/nota="putativo"
		/familia_de_rpt="Alu"
		/tipo_de_rpt= dispersado
	variación	3673
		/frecuencia="0,01"
		/reemplazar="g"
	variación	3701^3702
		/frecuencia="0,01"
		/reemplazar="ct"
	variación	3937
		/frecuencia="0,14"
		/reemplazar="c"
	variación	4036
		/frecuencia="0,01"
		/reemplazar="t"

ES 2 547 015 T3

	variación	4075
		/frecuencia="0,07"
		/reemplazar="t"
	región_de_repetición	<4755.>5056
		/nota="putativo"
		/familia_de_rpt="Alu"
		/tipo_de_rpt= dispersado
	región_de_repetición	<5065.>5476
		/nota="putativo"
		/familia_de_rpt="Alu"
		/tipo_de_rpt= dispersado
	variación	5229^5230
		/frecuencia="0,03"
		/reemplazar="gg"
	variación	5229
		/frecuencia="0,07"
		/reemplazar="t"
	variación	5229^5230
		/frecuencia="0,40"
		/reemplazar="g"
	variación	5230
		/frecuencia="0,13"
		/reemplazar=""
	variación	5361
		/frecuencia="0,06"
		/reemplazar="c"

ORIGEN

1 cttgatgctc agagaggaca agtcatttgc ccaaggtcac acagctggca actggcagag
 61 ccaggattca cgccttgca atttgactcc agaatcctaa ccttaacca gaagcacggc
 121 ttcaagcccc tggaaaccac aatacctgtg gcagccaggg ggaggtgctg gaatctcatt
 181 tcacatgtgg ggagggggct ccctgtgct caaggtcaca accaaagagg aagctgtgat
 241 taaaaccag gtcccattg caaagcctcg acttttagca ggtgcatcat actgttcca
 301 cccctcccat cccacttctg tccagccgcc tagccccact ttctttttt tcttttttg
 361 agacagtctc cctcttgctg aggctggagt gcagtggcga gatctcggct cactgtaacc
 421 tccgcctccc gggttcaagc gatttctcctg cctcagcctc ccaagtagct aggattacag
 481 ggcgccgcca ccagcctgg ctaacttttg tatttttagt agagatgggg tttaccatg
 541 ttggccaggc tggctcaaa ctctgacct taagtgattc gccactgtg gcctcccaa
 601 gtgctgggat tacaggcgtg agctaccgcc cccagcccct cccatcccac ttctgtccag
 661 cccctagcc ctactttctt tctgggatcc aggagtccag atccccagcc cctctccag
 721 attacattca tccaggcaca ggaaaggaca gggtcaggaa aggaggactc tgggcggcag
 781 cctccacatt ccccttccac gcttgcccc cagaatggag gagggtgtct ggattactgg
 841 gcgaggtgtc ctcccttctt ggggactgtg gggggtggtc aaaagacctc tatgccccac
 901 ctcttctctc cctctgcctt gctgtgcctg gggcaggggg agaacagccc acctcgtgac
 961 tgggggctgg cccagccgcg cctatcctt ggggaggggg cgggacaggg ggagccctat
 1021 aattggacaa gtctgggatc cttgagtctt actcagcccc agcggagggtg aaggacgtcc
 1081 tccccagga gccggtgaga agcgcagtcg ggggcacggg gatgagctca ggggcctcta
 1141 gaaagagctg ggacctggg aagccctggc ctccaggtag tctcaggaga gctactcggg
 1201 gtcgggcttg gggagaggag gagcgggggt gaggcaagca gcaggggact ggacctggga
 1261 agggctgggc agcagagacg acccgaccg ctagaagggtg ggggtggggag agcagctgga
 1321 ctgggatgta agccatagca ggactccacg agttgtcact atcatttacc gagcacctac
 1381 tgggtgtccc cagtgtcctc agatctccat aactggggag ccaggggcag cgacacggta
 1441 gctagccgtc gattggagaa ctttaaatg aggactgaat tagctcataa atggaacacg
 1501 gcgcttaact gtgaggttgg agcttagaat gtgaaggagg aatgaggaat gcgagactgg
 1561 gactgagatg gaaccggcgg tgggagggg gtgggggat ggaattttaa ccccgggaga
 1621 ggaagatgga attttctatg gagccgacc tgggatggg gagataagag aagaccagga
 1681 gggagttaaa tagggaatgg gttggggcg gcttggtaaa tgtgctggga ttaggctgtt
 1741 gcagataatg caacaaggct tggaaaggta acctgggggtg aggccgggtt ggggcggggc

ES 2 547 015 T3

1801 tgggggtggg aggagtcctc actggcgggt gattgacagt ttctccttcc ccagactggc
 1861 caatcacagg caggaagatg aaggttctgt gggtgcggt gctggtcaca ttctggcag
 1921 gtatgggggc ggggcttgc cgttcccc cgctcctccc cctctcatcc tcacctcaac
 1981 ctctggccc cattcaggca gaccctgggc cccctcttct gaggttctg tgctgcttcc
 2041 tggctctgaa cagcgattg acgctctctg ggctcgggt tccccatcc ttgagatagg
 2101 agttagaagt tgtttgttg ttgttgttg ttgttgttg tttgttttt tgagatgaag
 2161 tctcgtctg tcgcccaggc tggagtgcag tggcgggac tcggctcact gcaagctccg
 2221 cctcccaggc ccacgccatt ctctgcctc agcctcccaa gtagctggga ctacaggcac
 2281 atgccaccac acccgactaa ctttttgtg ttttcagtag agacggggt tcaccatggt
 2341 ggccaggctg gtctggaact cctgacctca ggtgatctgc ccgtttcgat ctcccaaagt
 2401 gctgggatta caggcgtgag ccaccgcacc tggctgggag ttagagggtt ctaatgcatt
 2461 gcaggcagat agtgaatacc agacacgggg cagctgtgat ctttattctc catcaccccc
 2521 acacagccct gcctggggca cacaaggaca ctcaatocat gcttttccgc tgggcgcggt
 2581 ggctcaccac tgtaatccca gcactttggg aggccaaagt gggaggatca cttgagccca
 2641 ggagtccaac accagcctgg gcaacatagt gagaccctgt ctctactaaa aatacaaaaa
 2701 ttagccaggc atggtgccac acacctgtgc tctcagctac tcaggaggct gaggcaggag
 2761 gatcgcttga gcccagaag tcaaggttgc agtgaacct gttcaggccg ctgcaactcca
 2821 gcctgggtga cagagcaaga ccctgtttat aaatacataa tgctttccaa gtgattaaac
 2881 cgactcccc ctccacctgc ccacctggc tccaaagaag catttggga gcacctctg
 2941 tgtcccccta ggtactagat gcctggacgg ggtcagaagg accctgacct acctggaact
 3001 tgtccacac aggatgccag gccaaagtgg agcaagcggg ggagacagag ccggagcccc
 3061 agctgcgcca gcagaccgag tggcagagcg gccagcgctg ggaactggca ctgggtcgct
 3121 tttgggatta cctgcgctgg gtgcagacac tgtctgagca ggtgcaggag gagctgctca
 3181 gctcccaggc caccaggaa ctgaggtgag tgtcccac tcggcccttg accctcctgg
 3241 tggcgggcta tacctcccc ggtccagggt tcattctgcc cctgtcgcta agtcttgggg
 3301 ggctgggtc tctgtggtt ctagcttctt cttcccattt ctgactcctg gctttagctc
 3361 tctggaattc tctctctcag ctttgtctct ctctctctcc ttctgactca gtctctcaca
 3421 ctctcctgg ctctgtctct gtctctccct agctctttta tatagagaca gagagatggg
 3481 gtctcactgt gttgcccagg ctggtcttga acttctgggc tcaagcgatc ctcccgcctc
 3541 ggctcccaa agtgctggga ttagaggcat gagccacct gccccggctc ctactcctt
 3601 ctctgtctct gcctctgccc tctgcatctg ctctctgcat ctgtctctgt ctctctctct
 3661 cggcctctgc ccggttctt ctctccctct tgggtctctc tggctcatcc ccactctgcc
 3721 cgcoccatcc cagcccttct ccccgcttcc cactgtgcca caccctccc ccctctcggc
 3781 cgcagggcgc tgatggacga gaccatgaag gagttgaagg cctacaaatc ggaactggag
 3841 gaacaactga ccccggtggc ggaggagacg cgggcacggc tgtccaagga gctgcaggcg
 3901 ggcgaggccc ggtggggcgc ggacatggag gacgtgtgcg gccgcctggg gcagtaccgc
 3961 ggcgaggtgc aggccatgct cggccagagc accgaggagc tgcgggtgcg cctcgcctcc
 4021 cacctgcgca agctgcgtaa gcggctctc cgcgatgccg atgacctgca gaagcgctg
 4081 gcagtgtacc aggccggggc ccgcgagggc gccgagcgcg gcctcagcgc catccgagag
 4141 gcctggggc ccctggtgga acagggccgc gtgcggggcg ccaactgtggg ctccctggcc
 4201 ggccagccgc tacaggagcg ggcccaggcc tggggcggag ggctgcgcg gcggatggag
 4261 gagatgggca gccggacctg cgaaccctg gacgaggtga aggagcaggg ggccgaggtg
 4321 cgcgccaagc tggagagaca ggcccagcag atacgcctg aggccgaggc cttccaggcc
 4381 gcctcaaga gctggttcca gccctggtg gaagacatgc agcgcagtg ggccgggctg

ES 2 547 015 T3

4441 gtggagaagg tgcaggctgc cgtgggcacc agcgcgccc ctgtgccag cgacaatcac
 4501 tgaacgccga agcctgcagc catgcgaccc cacgccaccc cgtgectcct gcctccgcgc
 4561 agcctgcagc gggagacctt gtccccgccc cagccgtcct cctgggggtg accctagttt
 4621 aataaagatt caccaagttt cacgcactct ctggcctccc cctgtgattt cctctaagcc
 4681 ccagcctcag tttctctttc tgcccacata ctggccacac aattctcagc cccctcctct
 4741 ccatctgtgt ctgtgtgat ctttctctct gccctttttt ttttttttag acggagtctg
 4801 gctctgtcac ccaggctaga gtgcagtggc acgatcttgg ctcaactgcaa cctctgcctc
 4861 ttgggttcaa gcgattctgc tgcctcagta gctgggatta caggctcaca ccaccacacc
 4921 cggctaattt ttgtattttt agtagagacg agctttcacc atgttgcca ggcaggtctc
 4981 aaactcctga ccaagtgatc caccgccgg cctcccaaag tgctgagatt acaggcctga
 5041 gccaccatgc cggcctctg cccctctttc ttttttaggg ggcagggaaa ggtctcacc
 5101 tgtcaccgc catcacagct cactgcagcc tccacctcct ggactcaagt gataagtgat
 5161 cctcccgct cagcctttcc agtagctgag actacaggcg cataccacta ggattaattt
 5221 gggggggggg tgggtgtgtt ggagatgggg tctggctttg ttggccaggc tgatgtgaa
 5281 ttctgggct caagcgatac tcccaccttgc cctcctgag tagctgagac tactggctag
 5341 caccaccaca ccagctttt tattattatt ttagagaca aggtctcaat atgttgcca
 5401 ggctagtctc aaacctctg gctcaagaga tcctccgcca tcggcctccc aaagtgtg
 5461 gattccaggc atgggctccg agcggcctgc c

LOCUS	NM_000041	1223 pb	ARNm	lineal	PRI 18-FEB-2007
DEFINICIÓN	Apolipoproteína E (APOE) de Homo sapiens, ARNm.				
ACCESO	NM_000041				
VERSIÓN	NM_000041.2 GI:48762938				
PALABRAS CLAVE	.				
FUENTE	Homo sapiens (humano)				
ORGANISMO	Homo sapiens				
	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;				
	mamíferoia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorhini;				
	Catarrhini; Hominidae; Homo.				
REFERENCIA	1 (bases 1 a 1223)				
AUTORES	Mullick, A.E., Powers, A.F., Kota, R.S., Tetali, S.D., Eiserich, J.P. y Rutledge, J.C.				
TÍTULO	Apolipoprotein E3- and nitric oxide-dependent modulation of endothelial cell inflammatory responses				
PUBLICACIÓN	Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 27 (2), 339-345 (2007)				
PUB. MED.	17138935				
OBSERVACIONES	GeneRIF: los datos sugieren un papel de la apoE3 en la pared vascular para equilibrar el estado redox intracelular en células endoteliales dañadas a través de vías de paso NO dependientes				

ES 2 547 015 T3

REFERENCIA	2 (bases 1 a 1223)
AUTORES	Gupta, V., Narayanaswami, V., Budamagunta, M.S., Yamamoto, T., Voss, J.C. y Ryan, R.O.
TÍTULO	Lipid-induced extension of apolipoprotein E helix 4 correlates with low density lipoprotein receptor binding ability
PUBLICACIÓN	J. Biol. Chem. 281 (51), 39294-39299 (2006)
PUB. MED.	17079229
OBSERVACIONES	GeneRIF: análisis de las propiedades de apoE de reconocimiento del LDLR
REFERENCIA	3 (bases 1 a 1223)
AUTORES	Pei, W.D., Zhang, Y.H., Sun, Y.H., Gu, Y.C., Wang, Y.F., Zhang, C.Y., Zhang, J., Liu, L.S., Hui, R.T., Liu, Y.Q. y Yang, Y.J.
TÍTULO	Apolipoprotein E polymorphism influences lipid phenotypes in Chinese families with familial combined hyperlipidemia
PUBLICACIÓN	Circ. J. 70 (12), 1606-1610 (2006)
PUB. MED.	17127808
OBSERVACIONES	GeneRIF: El polimorfismo de ApoE parece estar asociado con la varianza del fenotipo de la lipoproteína en familias chinas con hiperlipidemia combinada familiar.
REFERENCIA	4 (bases 1 a 1223)
AUTORES	Olarte, L., Schupf, N., Lee, J.H., Tang, M.X., Santana, V., Williamson, J., Maramreddy, P., Tycko, B. y Mayeux, R.
TÍTULO	Apolipoprotein E epsilon4 and age at onset of sporadic and familial Alzheimer disease in Caribbean Hispanics
PUBLICACIÓN	Arch. Neurol. 63 (11), 1586-1590 (2006)
PUB. MED.	17101827
OBSERVACIONES	GeneRIF: Individuos con historia familiar de EA y el
APOE	alelo épsilon4, factores adicionales genéticos o medioambientales pueden acelerar el comienzo de la demencia.
REFERENCIA	5 (bases 1 a 1223)
AUTORES	Christidis, D.S., Liberopoulos, E.N., Kakafika, A.I., Miltiadous, G.A.,

ES 2 547 015 T3

	Cariolou, M., Ganotakis, E.S., Mikhailidis, D.P. y Elisaf, M.S.
TÍTULO	The effect of apolipoprotein E polymorphism on the response to lipid-lowering treatment with atorvastatin or fenofibrate
PUBLICACIÓN	J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther. 11 (3), 211-221 (2006)
PUB. MED.	17056835
OBSERVACIONES	GeneRIF: Había una clara asociación entre el polimorfismo de apolipoproteína E en respuesta a la disminución de lípidos por tratamiento con atorvastatina y fenofibrato en pacientes con diferentes tipos de dislipidemia.
REFERENCIA	6 (bases 1 a 1223)
AUTORES	Lohse, P., Brewer, H.B. III, Meng, M.S., Skarlatos, S.I., LaRosa, J.C. y Brewer, H.B. Jr.
TÍTULO	Familial apolipoprotein E deficiency and type III hyperlipoproteinemia due to a premature stop codon in the apolipoprotein E gene
PUBLICACIÓN	J. Lipid Res. 33 (11), 1583-1590 (1992)
PUB. MED.	1361196
REFERENCIA	7 (bases 1 a 1223)
AUTORES	Moriyama, K., Sasaki, J., Matsunaga, A., Arakawa, F., Takada, Y., Araki, K., Kaneko, S. y Arakawa, K.
TÍTULO	Apolipoprotein E1 Lys-146----Glu with type III hyperlipoproteinemia
PUBLICACIÓN	Biochim. Biophys. Acta 1128 (1), 58-64 (1992)
PUB. MED.	1356443
REFERENCIA	8 (bases 1 a 1223)
AUTORES	Feussner, G., Funke, H., Weng, W., Assmann, G., Lackner, K.J. y Ziegler, R.
TÍTULO	Severe type III hyperlipoproteinemia associated with unusual apolipoproteína E1 fenotipo and epsilon 1/'null' genotype
PUBLICACIÓN	Eur. J. Clin. Invest. 22 (9), 599-608 (1992)
PUB. MED.	1360898
REFERENCIA	9 (bases 1 a 1223)
AUTORES	Schuler, G., Hambrecht, R., Schlierf, G., Niebauer, J., Hauer, K.,

ES 2 547 015 T3

	Neumann, J., Hoberg, E., Drinkmann, A., Bacher, F., Grunze, M. et al.
TÍTULO	Regular physical exercise and low-fat diet. Effects on progression of coronary artery disease
PUBLICACIÓN	Circulation 86 (1), 1-11 (1992)
PUB. MED.	1617762
REFERENCIA	10 (bases 1 a 1223)
AUTORES	Utermann, G., Pruin, N. y Steinmetz, A.
TÍTULO	Polymorphism of apolipoprotein E. III. Effect of a single polymorphic gene locus on plasma lipid levels in man
PUBLICACIÓN	Clin. Genet. 15 (1), 63-72 (1979)
PUB. MED.	759055
COMENTARIO	SEC. REF. REVISADA: Este registro ha sido comisariado por el equipo del NCBI. La secuencia de referencia se derivaba de BU848796.1 y BC003557.1.
	El 16 de junio de 2004 esta versión de la secuencia sustituyó la gi:4557324.
	Resumen: Restos de quilomicrón y restos de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL)
	son rápidamente eliminados de la circulación por
	endocitosis mediada por receptor en el hígado. La apolipoproteína E, una apoproteína principal del quilomicrón, enlaza con un receptor específico en las células hepáticas y en células periféricas. La ApoE es esencial para el catabolismo normal de constituyentes de la lipoproteína ricos en triglicéridos.
	El gen ApoE es cartografiado en el cromosoma 19 en una agrupación con APOC1 y APOC2.
	Los defectos en la apolipoproteína E dan como resultado disbetalipoproteinemia familiar, o hiperlipoproteinemia tipo III (HLP III), en las que un aumento de colesterol y triglicéridos en el plasma son la
	consecuencia de la depuración defectuosa de los restos de quilomicrón y de VLDL.
	Nota de la Publicación: Este registro de Sec. de Ref. incluye un subconjunto de las publicaciones que están disponibles para este gen. Por favor véase el registro Entrez Gene para acceder a publicaciones adicionales. EXHAUSTIVIDAD: completo en el extremo 3'.

CARACTERÍSTICAS

CARACTERÍSTICAS	Lugar/Calificadores
fuelle	1..1223
	/organismo="Homo sapiens"

ES 2 547 015 T3

	/tipo_de_molécula="ARNm"
	/xref_de_bd="taxón:9606"
	/cromosoma="19"
	/mapa="19q13.2"
gen	1..1223
	/gen="APOE"
	/nota="apolipoproteína E; sinónimos: AD2, MGC1571,
	apoproteína"
	/xref_de_bd="genID:348"
	/xref_de_bd="HGNC:613"
	/xref_de_bd="HPRD:00135"
	/xref_de_bd="MIM:107741"
CDS	84..1037
	/gen="APOE"
	/componente_en_la_OG="quilomicrón; citoplasma [pmid 9622609];
	zona extracelular [pmid 9622609] [pmid 14718574]"
	/función_en_la_OG="actividad antioxidante [pmid 14587032];
	enlace del receptor de la apolipoproteína E [pmid 12729008];
	enlace beta-amiloide [pmid 11305869]; enlace de heparina
	[pmid 12729008]; actividad de transportador de lípidos; enlace fosfolípido
	[pmid 40667131; enlace de la proteína tau [pmid 9622609]"
	/proceso_de_la_OG="homeostasis de colesterol [pmid 9622609];
	circulación [pmid 14506116]; organización citoesquelética y
	biogénesis [pmid 9622609]; inducción de la apoptosis [transporte pmid
	12753088]; transporte intracelular [pmid 9622609];
	aprendizaje y/o memoria [pmid 9622609]; regulación lípida de axón

ES 2 547 015 T3

	[pmid 9622609]; metabolismo de la lipoproteína [pmid 12729008];
	tetramerización de la proteína [pmid 4066713]; extensión sináptica
	[pmid 9622609]; regulación de la elasticidad neuronal
	[pmid 9622609]; respuesta a la especie oxígeno reactivo
	[pmid 117439991; transmisión sináptica, colinérgica [pmid 9622609]"
	/nota="enfermedad de Alzheimer tipo 2 (asociada a APOE*E4, aparición tardía)
	; apolipoproteína E3"
	/inicio_de_codón=1
	/producto="precursor del apolipoproteína E"
	/id_de_proteína= "NP_000032.1"
	/xref_de_bd=".GI:4557325"
	/xref_de_bd="CCDS:CCDS12647.1"
	/xref_de_bd="Id_del_gen:348"
	/xref_de_bd="HGNC:613"
	/xref_de_bd="HPRD:00135"
	/xref_de_bd="MIM:107741"
	/translation="MKVLWAALLVTF LAGCQAKVEQAVETEPEPELRRQQTEWQSGQRW ELALGRFWDYLRWVQTLSEQVQEELLSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTP VAEETRARLSKELQAAQARLGADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLR KLRKRLLRDADDLQKRLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGS LAG QPLQERAQAWGERLRARMEEMGSRTDRDLDEVKEQVAEVRKLEEQAOQIIRLQAEAFQ ARLKSWFEP LVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH"
péptido_señal	84..137
	/gen="APOE"
péptido_maduro	138..1034
	/gen="APOE"
	/producto="apolipoproteína E"
STS	249..356

ES 2 547 015 T3

	/gen="APOE"
	/nombre_estándar="PMC99927P2"
	/xref_de_bd="UniSTS:273705"
STS	342..640
	/gen="APOE"
	/nombre_estándar="GDB:171177"
	/xref_de_bd="UniSTS:154776"
STS	375..640
	/gen="APOE"
	/nombre_estándar="GDB:181693"
	/xref_de_bd="UniSTS:155329"
STS	404..631
	/gen="APOE"
	/nombre_estándar="GDB:169570"
	/xref_de_bd="UniSTS:154765"
STS	407..632
	/gen="APOE"
	/nombre_estándar="GDB:438097"
	/xref_de_bd="UniSTS:157265"
STS	408..678
	/gen="APOE"
	/nombre_estándar="GDB:196979"
	/xref_de_bd="UniSTS:155901"
STS	417..746
	/gen="APOE"
	/nombre_estándar="GDB:177380"

ES 2 547 015 T3

	/xref_de_bd="UniSTS:154875"
STS	417..634
	/gen="APOE"
	/nombre_estándar="PMC117303P1"
	/xref_de_bd="UniSTS:270328"
STS	609..752
	/gen="APOE"
	/nombre_estándar="STS-N29699"
	/xref_de_bd="UniSTS:34644"
STS	736..936
	/gen="APOE"
	/nombre_estándar="PMC310963P4"
	/xref_de_bd="UniSTS:272827"
STS	823..954
	/gen="APOE"
	/nombre_estándar="RH11470"
	/xref_de_bd="UniSTS:72925"
STS	919.1049
	/gen="APOE"
	/nombre_estándar="STS-K00396"
	/xref_de_bd="UniSTS:64138"
señal_poliA	1155..1160
	/gen="APOE"
sitio_poliA	1180
	/gen="APOE"

ES 2 547 015 T3

ORIGEN

```

1 gggatccttg agtcctactc agccccagcg gaggtgaagg acgtccttcc ccaggagccg
61 actggccaat cacaggcagc aagatgaagg ttctgtgggc tgcgttgctg gtcacattcc
121 tggcaggatg ccaggccaag gtggagcaag cgggtggagac agagccggag cccgagctgc
181 gccagcagac cgagtggcag agcggccagc gctgggaact ggcactgggt cgcttttggg
241 attacctgcy ctgggtgca acactgtctg agcaggtgca ggaggagctg ctcagctccc
301 aggtcaccca ggaactgagg gcyctgatgg acgagacccat gaaggagtgt aaggcctaca
361 aatcggaact ggaggaaca ctgaccccggt tggcggagga gacgcgggca cggctgtcca
421 aggagctgca ggcggcgag gcccgctgg ggcgggacat ggaggacgtg tgcggcgcgc
481 tgggtcagta ccgcgcgag gtgcaggcca tgctcggcca gagcaccgag gagctgcygg
541 tgcgcctcgc ctcccacctg cgcaagctgc gtaagcggct cctcccgcat gccgatgacc
601 tgcagaagcg cctggcagtg taccaggccg gggcccgcga gggcgcgag cgcgcctca
661 ggcctatccg cgagcgcctg gggcccctgg tggaaacagg ccgctgcygg gccgcccactg
721 tgggctccct ggccgcccag ccgctacagg agcgggcccc ggcctggggc gagcggctgc
781 ggcgcgcyat ggaggagatg ggcagccgga cccgcgaccg cctggacgag gtgaaggagc
841 aggtggcggg ggtgcygccc aagctggagg agcagcccca gcagatacgc ctgcaggccg
901 aggccttcca gcccgcctc aagagctggt tcyagcccct ggtggaagac atgcagcgc
961 agtgggcccg gctggtggag aaggtgcagg ctgccgtggg caccagcgc gccctgtgc
1021 ccagcgacaa tcaactgaacg ccgaagcctg cagccatgcy accccacgcc acccctgtgc
1081 tctgcctcc gcgcagcctg cagcgggaga ccctgtcccc gccccagccg tctcctggg
1141 gtggacccta gtttaataaa gattcaccaa gtttcacgca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1201 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa

```

SEQ ID Nº: 3

Secuencia ADNc del receptor de LDL

Sus scrofa	ARNm del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR), alelo LDLR-N, sec. codif. parcial.
ACCESO	AF065990
VERSIÓN	AF065990.1 GI:3153894
PALABRAS CLAVE	.
FUENTE	Sus scrofa (cerdo)
ORGANISMO	Sus scrofa
	Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
	mamíferoia; Eutheria; Laurasiatheria; Cetartiodactyla; Suina; Suidae;
	Sus.
REFERENCIA	1 (bases 1 a 2403)
AUTORES	Hasler-Rapacz, J., Ellegren, H., Fridolfsson, A.K., Kirkpatrick, B., Kirk, S., Andersson, L. y Rapacz, J.
TÍTULO	Identification of a mutation in the low density lipoprotein

ES 2 547 015 T3

Sus scrofa	ARNm del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR), alelo LDLR-N, sec. codif. parcial.
	receptor gene associated with recessive familial hypercholesterolemia in swine
PUBLICACIÓN	Am. J. Med. Genet. 76 (5), 379-386 (1998)
PUB. MED.	9556295
REFERENCIA	2 (bases 1 a 2403)
AUTORES	Hasler-Rapacz, J., Ellegren, H., Fridolfsson, A.K., Kirkpatrick, B., Kirk, S., Andersson, L. y Rapacz, J.
TÍTULO	Presentación Directa
PUBLICACIÓN	Presentado (16-MAY-1998) en Genetics & Animal Science, University of Wisconsin, 1675 Observatory Drive, Madison, WI 53706, EE.UU.
CARACTERÍSTICAS	Lugar/Calificadores
fuelle	1..2403
	/organismo="Sus scrofa"
	/tipo_de_molécula="ARNm"
	/xref_de_bd="taxón:9823"
	/cromosoma="2"
	/mapa="2q; cerca del centrómero"
	/tipo_de_tejido="hígado"
gen	<1.>2403
	/gen="LDLR"
	/alelo="N (normal)"
CDS	<1.>2403
	/gen="LDLR"
	/alelo="N (normal)"
	/nota="receptor de LDL; normolipidémico"
	/inicio_de_codón=1

ES 2 547 015 T3

Sus scrofa	ARNm del receptor de lipoproteína de baja densidad (LDLR), alelo LDLR-N, sec. codif. parcial.
	/producto="receptor de lipoproteína de baja densidad"
	/id_de_proteína= "AAC17444.1"
	/xref_de_bd="GI:3153895"

/translation="FQCQDGKCI SYKWICDGNTECKDGSDESLET CMSVTCKIGDFSC

GGRVNR CIPESWRC DGGQDCENG SDEEGC SPKTC SQDEFRC QDGKCIAPKFVCDSDRD
 CLDGSDEASCPTPTCGPASFCNSSTCIPELWACDGD PDCE DGSDEWPQHCRSHSSSL
 PERSNNPCSALEFHCHSGECIHSSWRCDGDT DCKDKSDEENC DVATCRPDEFQCS DGT
 CIHGSRQCDREYDCKDMSDEQGCVNATLCEGPNKFKCQSGECISLDKVCNSVRDCRDW
 SDEPLKECGTNECLDNKGGC SHICNDLKIGYECLCPEGFQLVDKHRCEDIDECQDPDA
 CSQICVNLEGSYKQCCEEGFQLEPLTKACKAIGTIAYLFFTNRHEVRKMTLDRSEYTS
 LIPNLKNVALDTEVASNRIYWS DLSQRKIYSTQIDRAPSFSSYDTIIGEDLQAPDGL

AVDWIHSNIYWTDSILGT VSVADTKGVKRKTLFQEKGSKPRAIVDPVHGFMYWTDWG
 TPAKIKKGLNGVDVYSLVTE DIQWPNGITLDLSGGRLYWVDSKLHSSIDVNGNR
 KTVLEDKTKLAHPFLAIFEDKVFWDIINEAIFSANRLTGSDIHLMAENLLSPEDIV
 LFHNLTQPRGVNWCERTALQNGGCQYLCLPAPQINPRSPKFTCACPDGMLLAKDMRSC
 LTETEPAGTTQGPSMVNSTAVGPKHTASSELTTAESVTMSQHALGDVAGRGVTEK PQS
 VGALYIVLPIALLILLFFGT FLLWKNWRLKSINSINFDPVYQKTTEDEVHICRSQDG
 YTY"

ES 2 547 015 T3

```
1 ttccagtgcc aagacgggaa atgcatctcc tacaagtgga tttgtgatgg gaacaccgag
61 tgcaaggacg ggtccgatga gtccctggag acgtgcatgt ctgtcacctg caagataggg
121 gacttttagct gtggggggccg tgtcaaccgc tgcattcctg agtcttggag gtgtgacggt
181 cagcaggact gcgagaatgg ctgagatgag gaaggctggt cccccaagac gtgctcccaa
241 gatgagttcc gctgccagga cggcaagtgc atcgcccaaa agtttgtctg tgactcggac
301 cgggactgcc tggacggctc ggatgaagca tcctgccccca caccacactg tggccccgcc
361 agcttccagt gcaacagctc cacctgcatc cctgagctgt gggcctgtga tggatgatcct
421 gactgagagg acggctcaga cgagtggcca cagcactgca ggagccacag ctcatcactc
481 cccgagagga gcaacaacc ctgctcagcc ctcgatttcc actgccacag tggcaggtgc
541 atccactcca gctggcgctg cgacggagac actgactgca aggacaagtc tgacgaggag
601 aactgcatg tggccacgtg ccggcctgac gaggttccagt gtcagacgg gacctgcatc
661 catggtagcc ggcatgcca cagggaatat gactgcaagg acatgagcga cgagcagggc
721 tgtgtcaatg cgactctgtg cgagggggcc aacaagtcca agtgtcaaag cggcaggtgc
781 atctccttgg aaaaagtgtg caactcagtc agggactgcc gggactggtc agacgagccc
841 ctcaaggagt gtgggaccaa cgagtgtctg gacaacaagg gtggctgctc ccatatctgc
901 aatgacctca agatcgcta tgagtgcctc tgtcccagg gcttccagct ggtggataag
961 cacagatgag aagatatcga cgagtgtcag gaccagacg cctgcagcca gatctgcgtg
1021 aacctcgagg gcagctaaa gtgccagtgt gaggagggtc tccagctgga gcctctcacc
1081 aaggcctgca aggcataggg caccatcgcc tacctcttct tcaccaaccg ccacgaggtg
1141 aggaagatga ccctggaccg tagtgagtac accagcctca tccccaacct gaagaacgtg
1201 gtcgctctgg aactgaggtg ggccagcaat agaactctact ggtctgacct gtctcagagg
1261 aagatctaca gtaccagat cgacagggcc cccagctttt cctcctatga caccattatt
1321 ggcgaagatc tccaggcccc cgatgggctg gcggtggact ggatccacag caacatatac
1381 tggactgact ccatcctggg cactgtctcc gtggctgaca ccaagggcgt gaagaggaag
1441 actctcttcc aagagaaagg ctccaagcca cgggcccattg tgggggaccc tgtccatggc
1501 ttcagtact ggactgattg gggaaacccc gccaatgca agaaggcgg cctgaacgga
1561 gtggacgtct actcgtggt gacggaggac atccagtggc ccaatggcat caccctggat
1621 cttctgaggc gccgccttta ctgggtcgac tccaagctcc actccatctc cagcatcgat
1681 gtcaacgggg ggaaccgga gaccgtcctg gaggacaaga cgaagctggc gcacccttc
1741 tccttgcca tttttgagga taaagtattt tggacagata taatcaacga agccattttc
1801 agtgcaaac gcctcacagg ctccggacata catttgatgg cagaaaacct gttgtctcca
1861 gaggacattg tccttttcca caacctcaca cagccgagag ggggtgaactg gtgtgaaagg
1921 accgacctcc aaaacggtg ctgccagtac ctgtgtctgc cagctccaca gatcaacca
1981 cgctcgccga agttcacctg tgctgcccg gatggcatgc tgttggcaa ggacatgagg
2041 agctgtctca cagagactga acctgcagga accaccaggg gaccttccat ggtcaactcg
2101 acagctgtgg ggccaaagca caccgcccgc tctgagctca ccacagccga gtcagtgacg
2161 atgtcccaac atgccctggg cgacgttgct ggccgaggag tcaactgagaa gcccagagc
2221 gtgggtgctc tgtacattgt cctccccatt gcaactgctc tcctcctctt cttcggaaac
2281 ttctcctct ggaagaactg gaggcttaag agcatcaaca gcattactt cgacaaccct
2341 gtgtaccaga agaccacgga agacgaggtc cacatctgcc gcagccagga cggctacacc
2401 tac
```

SEQ ID NO: 4

Secuencia de aminoácidos de LDL porcina

ES 2 547 015 T3

FQCQDQDKCISYKWICDGNTECKDGSDESLETMSVTCKIGDFSC
GGRVNRCPESWRCDGQQDCENGSDDEEGCSPKTCQDEFRCQDQDKCIAPKFVCDSDRD
CLDGSDEASCPPTCPGASFQCNSSTCIPELWACDGDPCEDGSDWEPQHCRSHSSSL
PERSNNPCSALEFHCHSGECIHSSWRCDGDTDCCKDKSDEENC DVATCRPDEFQCS DGT
CIHGSRQCDREYDCKDMSDEQGCVNATLCEGPNKFKCQSGECISLDKVCNSVRDCRDW
SDEPLKECGTNECLDNKGGC SHICNDLKIGYECLCPEGFQLVDKHRCEDIDECQDPDA
CSQICVNLEGSYKCQCEEGFQLEPLTKACKAIGTIAYLFFTRRHEVRKMTLDRSEYTS
LIPNLKNVVALDTEVASNRIYWS DLSQRKIYSTQIDRAPSFSSYDTIIGEDLQAPDGL
AVDWIHSNIYWTDSILGTVSVADTKGVKRKTLFQEKGSKPRAIVVDPVHGFMYWTDWG
TPAKIKKGG LNVGVVSLVTEDIQWPNGITL DLSGGRLYWVDSKLSISSIDVNGG NR
KTVLEDKTKLAHPFLAIFEDKVFWTDIINEAIFSANRLTGS DIHLMAENLLSPEDIV
LFHNLTPRGVNW CERTALQNGGCQYLCLPAPQINPRSPKFTCACPDGMLLAKDMRSC
LTETEPAGTTQGPSMVNSTAVGPKHTASSELTTAESVTMSQHALGDVAGRGVTEK PQS
VGALYIVLPIALLILLFFGTFL LWKNWRLKSINSINF DNPVYQKTTEDEVHICRSQDG
YTY

Genomisk sekvens del receptor del LDL humano [en gi:42406306] del Cromosoma 19. Secuencia codificante subrayada

1 gccccgagtg caatcgcggg aagccagggg ttccagctag gacacagcag gtcgtgatcc
61 gggtcgggac actgcctggc agaggctgcg agcatggggc cctgggctg gaaattggcg
121 tggaccgtcg ccttgctcct cgccgcgcg gggactgcag gtaagcttg ctccaggcgc
181 cagaataggt tgagagggag cccccgggg gcccttggga atttat tttt ttgggtaciaa
241 ataactactc catccctggg agacttgtgg ggtaatggca cggggtcctt cccaaacggc
301 tggagggggc gctggagggg ggcgctgagg ggagcgcgag ggtcgggagg agtctgaggg
361 atttaaggga aacggggcac cgctgtcccc caagtctcca cagggtgagg gaccgcatct
421 tctttgagac ggagtctagc tctgtcgccc aggatggagt gcagtggcac gatctcagct
481 cactgcaacc tccgcctccc gggtttaagc gagtctcctc tctcagcctc ccgaatagct
541 gggattacag gcgccaacc accacgccc cctaattttt gtatttttag tagagacggg
601 ttttcacat tttggccagg ctggtctcga accccgacct caggtgatct gcccaaaagt
661 gctgggatta caggcgtcag ccaccgcgc cggccgggac cctctcttct aactcggagc
721 tgggtgtggg gacctccagt cctaaaaaa gggatcactc ccacccccgc cttaaagtct
781 tctgggggag agggcgactg gagaccgga tgtccagcct ggaggtcacc gggggctcag
841 gggccccgat ccgctttgcg cgacccagc gcgccactgc catcctgagt tgggtgcagt

ES 2 547 015 T3

901 cccgggattc cgccgcgtgc tccgggacgg gggccacccc ctcccgcccc tgcccccgcc
 961 cctttggccc gcccccgaa ttccattggg tgtagtccaa caggccaccc tcgagccact
 1021 ccccttgccc aatgtgaggc ggtggaggcg gaggcgggcg tccggaggac ggggcttgtg
 1081 tacgagcggg gcggggctgg cgcggaagtc tgagcctcac cttgtccggg gcgagcgga
 1141 tgcaggggag gcttgccggt cctcccggt tcctgtcaca aaggcgacga caagtccgg
 1201 gtccccggag ccgctccgc gacatacac agtcgccctc cgttatcctg ggccctcctg
 1261 gcgaagtccc cggtttccgc tgtgctctgt ggcgacacct ccgtccccac cttgtcctgg
 1321 gggggccctc cgccccacca gccccgatca agttcacaga ggggcccccg gccaccctca
 1381 aggctcggg tccttacgag gttgaaacgt tgcctcagaa tctccccgcc cctccttggg
 1441 ctgcagccga gatcttcagc cacggtgggg cagctatccc ccgggaccga cccctgggg
 1501 tggcctcgct tcttcagagg ctgtgaaatg cttcggttca gctgtccaag cggcgatttt
 1561 tcctctgggt gaaatggatt agattttaga tttccacaag aggctgggta gtgcatgatc
 1621 ctgagttaga gcttttagg tggctttaa ttagttgcag agagacagcc tcgccctaga
 1681 caacagctac atggcccttt ccctcctgag aaccagccta gcctagaaaa ggattgggat
 1741 tgcctgatga acacaaggat tgcaggaaac tttttttta attggcaagg ggggtggctt
 1801 tgactggatg gagagcttg aactgccttg aaattcacgc tgtaactaac acaccagttt
 1861 cctctgggag gccagagagg gagggagggt gtaatgaaat acggatgatt gttctttat
 1921 tttattttac ttatttattt tttactttt tgtagagatg aggtctcgct tgggtgctca
 1981 ggtggtctt gaactcctgg cctcaagcga tcctcctacc tcagcctccc aaagtgttgg
 2041 gattacagga gtgagccacc gcgccccacc ggggatgatg atgattgcaa acattctgcc
 2101 actcagtttt acaaaagaaa gagaggcact ggattaatgt gtatctcact caccaatcaa
 2161 cctcttcctt aagagaaaa gttaaaggaag tcttaggcaa ggccttgttt gttcatcact
 2221 ttagtttctc tctccccgga tggctgagaa tgtgatgttt cctctgttgt caaggagact
 2281 acaccctga tgttttctc cagacttctg agagctggtg tgtgtttcta gcactttcta
 2341 gctgcaccac ctacgctgt agctggcttc aaggcatatc caggggggag tttcttctcc
 2401 atttccttta caaagggaag ttgttgaat ctgaaccgca agccttctact tagaccaaaa
 2461 tcaggcaaca gcggtgagcg cagctccaaa cgtgtcaatg actcacccaa atttgagtaa
 2521 gggagttggc tgctttaaag agccgcaggg tgattccctt gtcatttccg gaaataccta
 2581 tcttccaggg aacctggga aaaaacaggg agaccttgt tgagacagaa aacctgtagg
 2641 ggaattctgt tcctcattcc tgctcttacc tgtagacttc ctccctgata agatccaatt
 2701 ctgagtggt cggttctcc ttgctttgat ggggtctttg atgggcttta ttattattat
 2761 tattattatt attattattt tgatgggctt tttgatgtcc cttttccttc cacactctgt
 2821 cccaactgtc aagcaaatag ccttttgttg ctaagagact gcagatgtaa ccgaccagca
 2881 gcaaacagtg agtcaggctc tctctccgg aagcaaatc aattgctgag atcactctgg
 2941 gaaaaatacc caccttattt ggaaagaagc actgatcaat tgatgtctat ttttttttt
 3001 tttgagttgg agtctcgccc tgtcaccag gctggagtgc aatggcataa tctcgcctca
 3061 ctgcaatccc cgcctcccg gttccagcaa ttctcctgcc tcagcctcct gtagctgg
 3121 aattataggc gcctccaca acaccggct aatttttga tttgtagtag agatggggtt
 3181 tcaaccggtt ggccaggctg gtctcgaact cctgacctcg tgatccacc gccctcagct
 3241 cccaaagtcc aaggattgca ggcgtgacct actgtgccag ccaatcaatt gatttctcat
 3301 tcattttcag ctggtctgt tcccttaagc caggggattt tctgttgttt gttccccctt
 3361 caaggaaatg attctagcta cagttttgat ttcctgtac aactgtttc agtagcacag
 3421 gaaaagaaaa catcgaagc attcaccacc tcatttgtgt gctgggggaa aaagcagaaa
 3481 tgtgtattct cttttttgt ttcgatgacc ttgttctga cttgttactc gtgacttgag

ES 2 547 015 T3

3541 agatcagagg gctagaggac tagaatttat agaggtgttt tttttgttt tttatTTTTg
 3601 ttcgagttgc ccaggctgga gtgcagtggc gcaatctcgg ctcaactgcaa cctctgcctc
 3661 ccaggttcaa gcgattcttc ggcctcagcc tcctgagtag ctggaactac aggcgcccgc
 3721 caccacaccc agctaatttt tgtatttttc agtagagatg ggatttcacc atattggTca
 3781 agctggcctc gaactcctga cctcgtgatc caccgcctc agtttcccaa agtgctggga
 3841 gtacaggcgt gagccgccgt gcccggcctt tttgtgtttt tgtgtttttg agaggagctc
 3901 attgcttttt aggcttccct agcgtgagaa aatctgggga tccatgctct agtttacttc
 3961 cttttttttt ttttttttga gatggagtct cgcttagatt gcctaacttc agctcattgc
 4021 aacttctgcc tccgggggtc aagggattct cgtgtctcag cctcctgggt agctaggata
 4081 cgggcacccg ctacatgccc tggctaattt tgtactttta gtagagacag ggtttcgcca
 4141 cgttggccag gctggctcgc aactcctgac ctcaagtgag ccgcctgctt tggcctccca
 4201 aagtgtctgag attacaggcg tgagccaccg cgcttggcct aatttgcttt tcctgaaatt
 4261 caaatgttct aatatgaaaa acgccaacct tgcttgaaaag aataagaaaag aggtgcggtt
 4321 tcgttgggcc gtigtatgtt ggaacaggac tggttttgtc cccttgctcg gaaagggcag
 4381 caactgtgag gacagctccc tgacgtgctc tcaactcagca ctgttccggt cctgagcact
 4441 gtccccacta gctaggccaa gggagctcat ttggcaggca actgctgtct ggctgcgctt
 4501 gtggcagtaa aatctgcctt ttttttttgg aggcagggtc ttgcctgtc gctcaggctg
 4561 aagtgtgcag ttatagctca ctgcagcctc cagctctgtt actcaactga tcctcctctc
 4621 tcagcctcct gagtagctgg gactatacgc acgtgttacc actcccacct cagtttgttt
 4681 gtttatttat ttatttattt atttattgag atggagtttt gctcttgctg cccaggctgg
 4741 agtgcaatgg cgcatctcgc gctcaccgca acctccacct cctggttcaa gcgattctcc
 4801 tgctcagccc tcctgagtag ctgggattac aggcattgac caccacgccc ggctaatttt
 4861 gtatttttct tagagatggg gtttctccac attggttcag gctgttctcg aactcccaac
 4921 ctcaagtgat ccaccgcctc cagcctccca aagtgtctggg attataggcg tgagccccg
 4981 aaccgggcca ctcccagcta agtttaaatt tttgtttgt ttgttctgtt gtttttattt
 5041 tttgagacag agtctccgc ccaggctgga ggcagatca ctgcatcctt gacctccag
 5101 gcttaagcca tcctcccac tcagcctccc aagttagctgg gattacaggt gtgtgccact
 5161 atgcttggtt aagttgtgta tttttttag agatgggggt caagggattc tcgctttgtt
 5221 gcctcgggtt gtctcaaaact cctgggctca agcagctcct cctcctcagc ctcccagggt
 5281 gctggggaaa tccacttttg aaacattgtc tggagagtgg cccagggtgt agatcacaga
 5341 aataggtcat cgtgggggtc ttcccaggg tgagctcttg agccacctgt ggccagcaaa
 5401 tttttggaga ataatagtca ggggagagct tgaggtcag ggaaaggttt tgtttttctt
 5461 cagggaaaagg tttttattgt tctttatccc tccttaaagg acctcaggt gttactgaca
 5521 ttcccgtctt acccagtgcc acatttagtt tgtaagctgg gccctcgtac agaggtaggg
 5581 aggtgagagc attggattag tggtcaccaa agctgcggtc acctagtggg gtgatcagag
 5641 gctcctccct taagatcttg attgccaacg cctctggccc aactttcctt tttatttatc
 5701 gcaagcctcc tggaaatcct attgcttttt gccaccggg tgtgtcagca caagaaatga
 5761 gtcatttctt ctttaagca cagttgaaat tgagctgtga gtcagtgagg tgtgtacgat
 5821 attgtcaaag cggggtgtgt acagtattga cagatctgta gttgggcaag agaattatca
 5881 gagtttgtga ccacagcaga ttccaaagct cgactcattt tcttctctct tccttcctt
 5941 ttttcttttc tttttttttt tttttttgac agagtctcgc tctgttgccc aggctggagt
 6001 gcagtggcac aatctgggct cactgcagcc cctgcctcct gggttcaaat gattctcatg
 6061 tttcagctc ccgagtagct gcaattacag gcattcgggt tcaagtgatt ctctgcctc
 6121 agccacctga gcagctggga ttacagggc ccgccaccac gcccgctaa tttttgtatt

ES 2 547 015 T3

6181 tttagtagag acggggtttc accatgttgg ccaggctggt ctcgaactcc tgaactcagg
 6241 tgatccgccc acttcggcct cccaaagtgc tgagattaca gacgtgagtc accgcgccc
 6301 gcctgttctg ttctttaatt ctcaaaacac cctctagaa gtagagactg ccattctccc
 6361 ccattttaca gatcaggaaa ctgagtccca gaaggattta gtcagttacc caagtgttc
 6421 tagttaaatg gcctggaag ccagtgaagc ccaggattgt ctatctaacc cccttactac
 6481 tctaaacttc agggaatcca catgaatgtg ctgggtcaac catcaaagtt gaaatggata
 6541 aagggggctg gatgcggtgg ctgatgcctg taatcctagc actttgggag gccgagatgg
 6601 gtgggtggat tgcttgagcc caagagtttg agaccagcct gggcaacata gtgagacacc
 6661 tgtctctgca aaaaataaat aaaaagttag ctgagtgtga tgggtgaccc ctctagtac
 6721 agctgttgag ttaggcttag gcaggaggat cgcaggaacc tgggaggtgg aggcggccgt
 6781 gagcctcagt catgccactg cactccaacc tgggcaacag agtgaagcc ggtgtccgaa
 6841 agagaaagaa aaaaagacat agatacatct ttaaagtta ggttgtatgt taattaccta
 6901 caactcagtt tcaactgtgc taaaggagg aatgactca tttcttgcta catatcaaat
 6961 tagcccaaaa tgtagtggtc taaaacaaca ctttatgat ttctcagttt ttgctgtgca
 7021 ggaatttggg agcagcacag ctagacggtt ccagctcagg gtctctcatg aagttgcaat
 7081 caaaatattg gcaggagaga aaaacatatt ttcagaagct gcaggcatag gaagacttgg
 7141 ctggggttga aggatccact tccaagatgg cgcactcagt ggctcttggc tggaggcctc
 7201 agttccctgc tgcgtggagc tctccctcca gctgcttgag tggactcatg acatgcagct
 7261 ggcctcccct ggagcagtcg atccaacaat gagcatggcc atgaaactagg ctcagaagcc
 7321 actccctgtc gtctctacat tttcctatca gaagcaagtc attaaaagtc cagtgccact
 7381 ccaggggaga cgaattaggc tctgccttct gaaaggatta tcacagaaga tgcggtccta
 7441 tattcttttt ttaaattat tcttttttt atttttaga gatgggtct tggatgttg
 7501 cctaggccag tctggaattc ctgggtcaa acaatcctgt ctctgcctcc caaagtgtg
 7561 ggattacagg catgagccac tgcacctggt catgtggtca tatttcttt tcttttttt
 7621 ttttttttg agacagagtc tctgtcgccc aggctggagt atgggtggct gatctcagtt
 7681 cactgcagcc tccgcctccc gggttcaagc gattctcctg cctcagcctc ctgagtagct
 7741 gggattacag gcgcccgcga acatgcccag ctaatttttt lagtagagat ggggtttcac
 7801 catgtagacc aggatggtct cgatctcctg atttggtgat ccgcccacct tggcctcca
 7861 aagtttcaac catcgatcag aacttattga tgtacttatg tagctaggca cgggtggcgcg
 7921 tgctgtaat cccagctact tgggaagggtt aaggcaggag aatcgcttga acctgggag
 7981 cagaggttac agtgagtcaa gatcatacca ttgcactcca gtctgggcaa cagaatgaga
 8041 ctctgtctca aaaacaaaa acaaaccctt gtatgtgatt ttctgggata gcatctgtta
 8101 catcttcaca aagataaaaa gtcagacttg gctgggcatg gtggctcaca cctgtaatcc
 8161 cagcactgag aggctgagcc aggcagatca cttgaggtca ggaatttgag accaggctgg
 8221 gcagcatggt gaaaccccg ctctacaaaa aatacaaaaa ttagccgggt gtggtgtcac
 8281 gcacctgat tcccaagcta ctcaggaagc taaggcagga gaatcacttg aaccagagg
 8341 tggaggttg cagtgagttg agattgtgcc attgactcc agcctgggag acagagtgag
 8401 actctgtgtc aaaaataaaa taaaataaaa ttttaaaaaa ggcagatttt ttttcttct
 8461 tggattgtt accttattat agtaataata agtgcatagt gcatgctgag ataagcaatc
 8521 ataattgtt attgcgccg ggcattggtg ctccagccta taatcccagc actttggtca
 8581 ggagttcaag gccagcctgg ccaatatagt gaaactccat ctctactaaa atacaagaaa
 8641 ttacctgggc atggtggcag ttgctggtga tccccagcta cttgggaggc tgaggcagga
 8701 gaatcgcttg aacctgggaa gcagaggttg cagtgagcca agattgcacc actgcactcc
 8761 agcctgggtg acagagtgag actctgtctg aaaataataa taataataat ttgtatttg

ES 2 547 015 T3

8821 ttttattgcc ttagtttaca tagggaatca aagtttatac tttgatttat aaaagttgct
 8881 ttgattctag ttcacagaac cagaatcttt catataaagg tattagaggg cccagtggtg
 8941 tggctcatgc ctgtaatccc agcatattgg gaggctgagg agggaggatc actttaggag
 9001 tttgaggcca gcctaggcaa catagtgaga ccttgtctct acaaaaaatt ccaacattag
 9061 ctgggcatgg tggcatgtgc ctgtagtccc atttatttgg ggggctgagg caggaggatc
 9121 acttgagccc acgaggttca atccaggttg cagtaagcca tgatcctgcc actgcactcc
 9181 agtttgggta acagagcgaa gctatgtctc aaaaaagaa aaaaaagta ttctaatacc
 9241 aaatttaata tataaaacta aatgcaggcc aagtgtggtg gcatatacct ataatcacia
 9301 cactttggga ggctgagggt ggaggattgc ttgagcccaa gagttcaaga ccagcctagg
 9361 taacacagta agaccccatc tctacaaaaa gtagaaaaat tagcctggca tgggtggtgag
 9421 tgcttttaat cccaactact tagggggctg agatgggaag attgcttgag cctcagagtt
 9481 tgaggctgca gtgggcccgtg atcgctccac tgatcgctct aaagtgagac cctgtctcaa
 9541 aaaaaagaa aatagaagaa aactaaatac attcaataag actttgatct cttttccaag
 9601 gtgtaaatat attttgggaa attttccagt tactttgttc tcattttaat gtaataatct
 9661 aagcttgggt tttctaagga aaagttttct cttattatat cttttgttaa tgtttctctc
 9721 ccatttcttt tgatctgac ttcagatata tgattatctt cactgctaaa tttgtgttct
 9781 ctggcctcta catttataat ttctcataat tctttatcta agtatttctt ccctacctac
 9841 tgaagaaaac tcaagttttc ttccacctta atgattatgc tgtgtctgtg agttttcttc
 9901 atgactcttt acagtacaag ttttttgttt ttgttttttt aatggtcaga tggatagaac
 9961 aacacaggtt ttgtttgttt tgttttaact tttaaaaaa ttataataga taaagggctt
 10021 cactacgttg tccaggctga tctcactctc ctgggctcaa gcaatccacc cacctctgcc
 10081 tcccaaagtg ctgggattac agtcatgagc caacatgcct gggcagtaca ggtttttttt
 10141 gagacggagt tttgttcttg ttgccgaggc tggagtgcaa tggcacaatc ttggctcacc
 10201 acaaaagtctg cctcccaggt tcaagtgatt ctccctgcctc agcctcctga gtagctggga
 10261 ttacaggcat gtgccaccac gccagctaa ttttgtattt ttagtagaga cggggtttca
 10321 ccatgttggc caggctgggt tcgaactgct gacctcaggt gatctgcca cctcggcctc
 10381 ccaaagtctg gggattacag gcatgagcca ccattgcccag ctgtagtaca ggttttaata
 10441 tgctaaatac tcttctttc tttatataat tgcattggaag ttctaataat tttttccat
 10501 accccagaga gtccatattt tggaaatcaac aacctagcc tttgttgaca agtgtctctc
 10561 ttgggttccct tctttgtgtc ctccactgaa ttttggggtt cataaaattt catttgttgt
 10621 gcttgcttaa ttccctggga atcagactgt tcctgatcgg atgacatttc tggttaattc
 10681 tttagttggc aggaaataga cacaggaaac gtggtcagtt tctgattctg gcgttgagag
 10741 accctttctc cttttctctc ctctcagttg gcgacagatg cgaaagaaac gagttccagt
 10801 gccaagacgg gaaatgcatc tctacaagt gggctctgca tggcagcgtc gagtgccagg
 10861 atggctctga tgagttccag gagacgtgct gtgagtcccc tttgggcatg atatgcattt
 10921 atttttgtaa tagagacagg gtctcgccat gttggccagg ctggtcttga atttctggct
 10981 tcaagtgatc cgctggcctc ggcctcccaa agtgtctggga ttacaggcac cacgcctggc
 11041 ctgtgacacg attcttaacc cttttttgat gatggcggct ggaaaagtgg ccagtggtatt
 11101 ttgatgtatt caatcatgaa ttaggaggtg gggagagaat gaattattgg agctttcctt
 11161 aaagccatta aatggctcta ttgttttttc aattgatgtg aatttcacat aacatgaaat
 11221 taaccagctc agtggcatta atacatctgc aatgctgtgt ggccaccacc tctatcttgt
 11281 tccaaaactt tgcataacct aatgtctttt tttttttttt tttttgagac ggagtctctg
 11341 tccatcacc caggctggagt gcagtggtgt gatctcagct cactgcaacc tccgcctccc
 11401 aggttcacgc catcctcctg cctcagcctc ccgagtagct gggactacag gcaccctcca

ES 2 547 015 T3

11461 ccacatccgg ctaatttttt gtatcttttag tagagatggg gtttcacat gtttagccggg
 11521 atggtctcga tctcctgacc tctgtatcca cctgcctccg cctcccaaag tgctggcatt
 11581 acaggcgtga gccaccatgc ccggcctatt ttttttttta agagatggag tctaattctg
 11641 ttgccaggc tggagtccag tggtagcacc atacttctact gcagccttga cctcttgggc
 11701 tcaagtgatt ctcttgctc gaactcccaa agtattggga ttacaggtgt gagccaccgc
 11761 actcagccta atgtccagtt ttaacaagc tccatttaaa tgccctccgt tttgacccat
 11821 aaagggtag gcttggccgg gcacaatggc ttgtgtctgt agtcccagct acttgggagg
 11881 ctgaggcaga aaggcagaaa gattgtctta taaagcccag gagtttgagg gccacctggg
 11941 tggcatagct agacctcatc tctaaaaaat aagtaataaa taaatatttg tttttgtttt
 12001 tttctttttc tttctttttt tttttttttt tgagacggag tcttgcctctg ttgccaggc
 12061 tggagtgcag tggcgcgatc tcagctcact gcaagctgtg cctcctgggt tcatgccatt
 12121 ctctctgctc agcctcccga gtagctggga ctacagcgcg ccaactaccac gccacgctaa
 12181 ttttttgtat ttttagtaga gatgggggtt caccacgtta gccaggatgg tctcaatctc
 12241 ctgacctcgt gatccggcag ctttggcctc ccaaagtgtt gggattacag gcgtgagcca
 12301 ctgagcccg cccatatgta tgtatatata ttttttttta aaatgggaga ccaggcatgg
 12361 tggctcatgc ctagaatccc agcactttgg gaagctgagg taggcggatc acttgaggcc
 12421 atgagtttga gaccagcctg ctcaacatga tgaaacttct atctctacta aaaaaaaaaag
 12481 tgggattagg tcaggcacgg tggctcacac ctgtaatccc agcactttca gaggccgagg
 12541 caggaggatc atgaggctcag gagatcgaga ccatcctggc taacacggtg aaaccccgtc
 12601 tctactaaaa aaatacaaaa aattagccag gcgtggtggc ggggtgcctgt agtcccagct
 12661 actcaggagg ctgaggcagg agaatggcgt gaacccggga ggcggagctt gcagtgagcc
 12721 aagatcgtgc cactgtactc cagcctgggc gacagagcaa gactctgtct caaaaaaaaaa
 12781 aaaaaaagtg ggattgacat tctcttcaaa gttctgggtt tttccttgc aaagacagga
 12841 ttggcaaggc cagtgggtct tttttgtgtg tgtgtgtgtg acggagtctc actctgccac
 12901 ccaggctgga gtgcaatggc aggatctcgg ctaccgcaa cctcctctc ccaggtaaa
 12961 gtgattctcc tgctcagcc tcccgagtag ctgggactac aggtgcccg caccacacc
 13021 aactaatttt tgtattttta gtagagacag ggtttcacta tattggccag gctggtcttg
 13081 aacccctgac ctacagtgat ccacccgctt tggcctccca aagtgtctggg attacaggcg
 13141 tgagccactg tgctcggcct cagtgggtct ttcctttgag tgacagttca atcctgtctc
 13201 tctgtagtg tctgtcacct gcaaatccgg ggacttcagc tgtgggggce gtgtcaaccg
 13261 ctgcattcct cagttctgga ggtgcgatgg ccaagtggac tgcgacaacg gctcagacga
 13321 gcaaggctgt cgtaagtgtg gccctgcctt tgctattgag cctatctgag tcctggggag
 13381 tggctctgact ttgtctctac ggggtcctgc tcgagctgca aggcagctgc cccgaactgg
 13441 gctccatctc ttgggggctc ataccaagcc tcttccgccc tcaaatccc cccttgacca
 13501 ggaggcatta caaagtggg atggtgtctac ctcttcgggt ttgtcacgca cagtcagggg
 13561 ggctgtccct gccgagggct agccacctgg cacacacact ggcaagccgc tgtgattccc
 13621 gctggctctg atccccgtga tctgtgtgat cccgccccgt gaggtggaac acatagtgac
 13681 gcttgctagc caagcctcaa tgaccacagt aacatgaagg gggaaaagcc agaaagtctt
 13741 gccaggagc aaggccaaga atcccgaagg gaaatggact ttgaagctgg gcgtcttctt
 13801 ggctgtctta atacaagtgg cacatccaaa tccaaaacc cgaaattcaa agtcttgagc
 13861 acccgaaatt ctgaaacgct ttgagcactg acctttagaa ggaaatgctt attggagcat
 13921 tttggatttc ggatttttac cactgagtgt ggagtcttaa ttaggaaaaa aaccaggctg
 13981 accgaaccaa aggaaagcaa taaaagaagg cagatagggt caggcacggt ggctacccc
 14041 tgtaatccca gccttttgag aggctgaggc ggggtgatca cttgaggtca ggagttcgag

ES 2 547 015 T3

14101 agcagcctgg ccaacacggt gaaaccccat ctctactgaa aatacaaaaa ctagccaggt
 14161 atggtggcgt ctgcctgtaa tcccagctac tcgggaggtc gagacaggag aatcacttga
 14221 acctgggagc cagaggttgc agtgagccaa taccacgcca ttgcaactca gcctggggga
 14281 caagagcgaa attctgtctc aaaaaaaaaa aagaagaagg ccgacaaact atgtaactct
 14341 gcctttctcc atggtccaga acacacagcc ctctgcgta aataactcct tatcttctctg
 14401 ctcccagcta tcatcagaca cctcggctga tagaaaattg caagttagct cactgcaacc
 14461 tcggcattat aagtactgca caaagccctc ttcagcgcac agcacaagca ccattctata
 14521 aaatctccag caagcggcca ggtgcagtgg ctcatacctg taatcccagc attttgggag
 14581 actgagggcg gcggatcacc tgaggtcagg agtttgagac cagcctggcc aacatggtga
 14641 aaccccgctc ctattaaaaa tacaacaaaa ttagccaggc gtggtggcag gtgcctgtaa
 14701 tcccagctac ttggaaggct gaggcaggag aatcgcctga acccgggagg tggaagtgtc
 14761 agtgagccga gatcttgcca tcgcaactca gcctggggga caagagtggc acttctctctc
 14821 aaaaaaaaaa aaaaaaattc ccagcaagcc tttgtcttct ggcagtcagc tcctctcttg
 14881 ctgacctgct cattgctttc ttgcaaggta ttttctacc tactttctgg aataaatctg
 14941 tctttctgta cttacaacta ctttttttaa aatttctttc ttttttgaga tggagtctca
 15001 ctctgtttgc ccaggctgga gttcagtggt gcaatctcag ctcaactgca cctctaccta
 15061 ctgggttcaa gcgattctcc tgcctcagct tcccagtag ctgggattac aggcgtgcac
 15121 cagcacgcag gctaattttt gtatttttag tagagacggg gtttcacat gttggccaag
 15181 gtggtcttga actcctgacc tcaagtgatc ctcccacctc agcctcccaa agcgttagga
 15241 ttaccggccat gagccactga ggcggctgc acctacaact gtcttgataa attcttacc
 15301 ccacaccact ggtccagata gtcagtctc acccacaaca ttaaggatat tccaaattg
 15361 aaacattcca aaatcagaaa aatattccaa ctctgaaaat attccaaaat ccaaaaaaat
 15421 tcaaaatcca aaacacttct ggtcccaagc attttagaga agggatactc aacccaaat
 15481 aaggacagca attctataaa ttgtgctacc atcttgaggc tctcagttta acagctttac
 15541 acctattagc gcaccagtgc tcatagcagt gctgggaaat gtgtacagat gaggaaactg
 15601 aggcaccgag agggcagtggt ttcagagtcc atggcccctg actgctcccc agcccgcctt
 15661 tccaggggcc tggcctcact gcggcagcgt ccccgctat agaatgggct ggtgtggga
 15721 gacttcacac ggtgatggtg gtctcggccc atccatccct gcagcccca agacgtgctc
 15781 ccagcagcag tttcgtgccc acgatgggaa gtgcactctc cggcagttcg tctgtgactc
 15841 agaccgggac tgcttgagc gctcagacga ggcctcctgc ccggtgctca cctgtggtcc
 15901 cgccagcttc cagtgcaaca gctccacctg catccccag ctgtgggctt gcgacaacga
 15961 ccccgactgc gaagatggct cggatgagtg gccgcagcgc tgtaggggtc tttacgtgtt
 16021 ccaaggggac agtagccctt gctcggcctt cgagttccac tgcctaagtg gcgagtgcct
 16081 ccactccagc tggcgtgtg atggtggccc cgactgcaag gacaaatctg acgaggaaaa
 16141 ctgcggtatg ggcggggcca ggggtggggc ggggctcct atcacctgtc cctgggctcc
 16201 cccaggtgtg ggacatgcag tgatttaggt gccgaagtgg atttcaaca acatgccaag
 16261 aaagtattcc catttcatgt ttgtttcttt ttttctttt ctttctttat tttgttttg
 16321 agatggagtc tcaactctgtg atttttttca tctctaaatt tcctacatcc atatggccac
 16381 catgaggccc caggctggcc gatggttgc gtttagcttat tgggaaatca ctggttgga
 16441 ggtgctggtt gttttttgtt gtttgtgtt tttgttttg tttttgttt gagacggagt
 16501 ctgcctctgt cggcagggtg gagtgcagtg gcgcgatcag ctcaactgca cctccgcttc
 16561 ctgggttcaa gccattctcc tgcctcagcc tcccagtag cgcggattac aggcattgtc
 16621 caccacctcc ggctattttt ttttctattt agtagagatg gggtttcacc atgttagtca
 16681 gctggtcat gaactcttga cctcaggtga tccaccgcc tcggcctccc aaagtgtg

ES 2 547 015 T3

16741 gattacaggc gtgcaactgct gcacccagcc tttttttggt tttttgagac agggctcttg
 16801 tgtcacccag gtggaagtaa ggtggcacga ttatggctca ctgcgccctt gatctccttg
 16861 gctcaagcga tcctctcaact tcagcctctc aagcagttgg aaccacaggc tgtaccacca
 16921 agcctggcca atttttttgt acagacacag gctggctctg aactcctggg ctcaagcaat
 16981 cctcctgcct tggcctccca aagtgtggg attccaggca tgagccgctg caccggcga
 17041 aaggccctgc ttctttttct ctggttgtct cttcttgaga aaatcaacac actctgtcct
 17101 gttttccagc tgtggccacc tgtcgccctg acgaattcca gtgctctgat ggaaactgca
17161 tccatggcag cggcagtggt gaccgggaat atgactgcaa ggacatgagc gatgaagtgg
17221 gctgcgttaa tggtagcgc tggccatctg gttttccatc cccattctc tgtgccttgc
 17281 tgcttgcaaa tgatttgtga agccagaggg cgcttcctg gtcagctctg caccagctgt
 17341 gcgtctgtgg gcaagtgact tgacttctca gagcctcaact tccttttgggt ttgagacgga
 17401 gtctcgtctc gacacccagg ctggagtgtc gtggcacaat cacagctcac ggcagcctct
 17461 gcctctgatg tcagtgatt ctctgcctc agcctccga gtagctgaga ttaaaggcgt
 17521 ataccaccac gcccggctaa ttttttggat ttttattaga gacaggggtt ctccatggtg
 17581 gccaggctgg tcttgaactc ctggctctcag gtgatccacc cgcctcggcc tcccaaagtg
 17641 ctaggattac aggtgtgagc cactgcgcca ggcctaattt ttttgtattt ttagtagaga
 17701 tgcggttttg ccatattgcc caggctgtgc tcgaactcct gggctcaagc gatctgcctg
 17761 ccttggcctc ccaaagtgtc gggattacag gcacaaacca ccgtgccga cgcgttttct
 17821 taatgaatcc atttgcatgc gttcttatgt gaataaacta ttatatgaat gagtgccaa
 17881 caaactgagg ctacagaca cctgacctc ctctctcctc tctctggctc tcacagtgac
17941 actctgcgag ggacccaaca agttcaagtg tcacagcggc gaatgatca ccctggacaa
18001 agtctgcaac atggctagag actgccggga ctggtcagat gaacccatca aagagtgcg
 18061 tgagtctcgg tgcagcggc ttgcagagtt tgtggggagc caggaaaggg actgagacat
 18121 gagtgtgta gggtttggg aactccactc tgcccacct gtgcaaaggg ctcctttttt
 18181 cattttgaga cagtctcga cggctgcca ggctggagcg caatggcgcg atctcgctc
 18241 actgcaacct ctgcctccca ggttcaagtg attctcctgc ctacgctcc tgagttagctg
 18301 ggattacagg cccccacc caagccggg taattttttg tatgtttagt agagatggg
 18361 tttcactatg ttggccaggc tgggtttgaa ctctgacct catgatccgc ccacctcggc
 18421 ctcccaaagt gctgggatta caggcgtgac ccacccatg aaaaaaaaaa aaaaaatgaa
 18481 gcgatgctgg gcggttgga tcacgcctgt aatccagca ctttgggaag ctgaggcagg
 18541 cagatcacga gggcaggaga ttgagacat cctggctaata acggtgaaac cccatctcta
 18601 ctaaaactac aaaaaattag ccgggtgtgg tggcaggcac ctgtgatccc agctactcag
 18661 gaggctgagg caggagaatc gcttgaacct aggaggtgga ggttgagctg agccgggatc
 18721 acaccattgc actccagcct gggtagacaga gtgagactct gtctcaaaaa aaaaaaaaaa
 18781 aaaaaagcg aattctgaaa tacatgaatt cttttcctta gatgcctgct tctgtcttga
 18841 ggtttgtgtg tgttatttcg aaacagagtc ttgctctgct gctcaggctg gagtgcagtg
 18901 gcatgatctt ggctcaccac aacctcggc tcccaggttc aagcgattct tctgcctcag
 18961 cctcctgagt agctgggatt acagctgaat gccacctgct tgggctaatt tttgtatttt
 19021 tagtagagat ggggtttcac catgttggcc aggctggcct cgaactcctg acctcgagtg
 19081 atctgcccgc ctctgaagt gctgggatta caggcgtgag ccacctcgtc ctggtgaggg
 19141 tttttttttt tccccaccc tctgtggtgg atactgaaag accatattag gataactgta
 19201 cagtatagag aaggcagtg caagttttct ctgtcatata ccagagtggg cttgggcatg
 19261 gtggcatact cctgtagtct cagctaataca ggaggctgag gaaggaggat cgcttgggcc
 19321 caggagtgg agactgtagt gagctgtgat cacaccacca cacttcaatc tgggcaacag

ES 2 547 015 T3

19381 agcaagagac cctatctcta aaaaaaagta agtatttcgg acaactgtggg ccatacggtc
 19441 tctggtgcag tttctcaaca tggctgttgg gtgaacacaa ccacgcacag aacgcaaacc
 19501 aatacacgtg gctgtgggcc cagaaaatgt tatttatgga cacaaaaatt ggaatttcat
 19561 ataactgttt tgtgtcatga aaatgatttc cttttttatt tttatttttc ttctcaagta
 19621 tttaaataatg taaaagccat ttttaggcct ggcaggatgg ttcacagctg taatcccagc
 19681 actttgggag gtcgagggcg gaggatcacg aggtcaggag atcgagacca tcctggccaa
 19741 cacagtgaac ccccgctctc actaaaaata caaaaaatta accaggcttg gtggcgccgc
 19801 tctgtagtcc cagctgctca ggaggctgag gcaggagaat cgcttgaatg caggaggcgg
 19861 aggttgtagt gagccgaggt tgcaccactg cactccagcc tgagcgacag agtgagagtc
 19921 cgctcaaac aaaaaaatgt ttgcccctgc tggcttgaa ctctctgggt caagctatct
 19981 gcctgccttg gtctcccaa gttctgggat tacaggcatg agctacagcg cccggacttt
 20041 tgtgttttta tatctatata tctatatata acttgtttta tgtatatata taacttgttt
 20101 tataatata cataaactgc agtaaaaaac atgtaacata aaatttacct tctcaaacct
 20161 tattaagtgc acagttctgt gccattagca aattcacact gttgtacaac atcacaacca
 20221 ccatctccag aacttttttt ttttttttta ttctttttga gacagagtct cactcgtcgc
 20281 acgggctgga gtgcagtggt gcgatctcgg ttcactgcaa cctccaccta ccaggttcaa
 20341 gcaattctcc tgcctcagcc ccctcagtag ctgggattac aggtgcccggt cctaccacgc
 20401 ccagctaat tttgtatttt cagtagagac tgactgggtt tccacatggt ggccaggctg
 20461 gtctcgaact cctgacctca agtgatectc ccacctcagc ctcccaaagt gctgggaata
 20521 caggcatgag ccaactgcgc cggcccaga actcttttat ctcccaaac tgaagctctg
 20581 tccccatgaa acaactactc tccatcccct ccccaactcc tggcaccac cattctactt
 20641 tctgtcccta tgaatgtgat ggctctaggg acctcctctg agtggaatca gacagcattt
 20701 tccttttttg actggttat ttcactgagc caagtgcggt ggcacacgcc tghtaatcca
 20761 aaactttggg agaccgaggc gggcgcatca cctgaggtca ggagtccgag accagcccgg
 20821 ccaacatggt gaaaccccat ctctagtaaa aatacaaaaa attagcctgt catggtcgtg
 20881 ggtgcctgta atcccagcta agtgggaggc tgaggcagga gaatcgttg taccaggag
 20941 gcggaggtcg cagtgcgagc agatcgtgcc attacactcc agcctgggca acaagagtga
 21001 aactcgtct ctccataaaa tacaataaaa ttagctgggc atgggtggc acatgctgtag
 21061 tcccagctac ttgggaggt gaggcaggag aatcacttga acccgggag tggaggttgt
 21121 aatgagccaa ggttggcggc gaagggatgg gtaggggcc gagagtgacc agtctgcac
 21181 ccctggcct gcgcaggagc caacgaatgc ttggacaaca acggcggctg ttcccagctc
21241 tgcaatgacc ttaagatcgg ctacgagtgc ctgtgccccg acggcttcca gctggtggcc
21301 cagcgaagat gcgaaggtga tttccgggtg ggactgagcc ctgggcccc tctgcgcttc
 21361 ctgacatggc aaccaaacc ctcatgcctc agtttccca tctgttaagt gtgcttga
 21421 gcagtttaga gggtttcatg agattccacc tgcattgaaa actatcattg gctggccaga
 21481 gtttcttgcc tctggggatt agtaattaag aaatttcagg ccgggtgctg aatccctgta
 21541 atcccaacac cttgggagc cgaggcgggc agatcacctg aggtcgggag ttccagacca
 21601 gcctgaccaa catggagaaa ccccgctctc actaaaaata caaaattagc cgggcttggg
 21661 ggtgcatgcc tataatccca gctactcagg aggtcagggc aggagaatca cttgaacctg
 21721 ggaggtggag gttgtgtgta gccaaagatc tgccattgca ctccagcctg ggcaacaaga
 21781 gtgaaactcc atccaaaaaa aaaagaaaag aaaagaaaa aaagaaaaga aatttcagct
 21841 gacacagctt cacactcttg gttgggttcc cgtggtgaa gatgaggtca ggtgatgact
 21901 ggggatgaca cctggctggt tccttgatta catctcccga gaggctgggc tgtctcctgg
 21961 ctgccttcga aggtgtgggt tttggcctgg gccccatgc tccgtctcta gccattgggg

ES 2 547 015 T3

22021 aagagcctcc ccaccaagcc tctttctctc tcttccagat atcgatgagt gtcaggatcc
22081 cgacacctgc agccagctct cgcgtgaacct ggagggtggc tacaagtgcc agtgtgagga
22141 aggcttccag ctggaccccc acacgaaggc ctgcaaggct gtgggtgagc acgggaagge
 22201 ggcggtggg ggcggcctca cccttgcaag gcagcagtgg tgggggagtt tcatcctctg
 22261 aactttgcac agactcatat ccctgaccg ggaggctggt tgctcctgag ggctctggca
 22321 ggggagtctg ccgcctggtt aggacttggg ctgcccaggg ggatgcctgc atatgtccta
 22381 gtttttggga atatccagtt aacggaacct tcagccctac tgggtggaaca ggaaccggct
 22441 ttcctttcag ggacaacctg gggagtgact tcaagggggt aaagaaaaaa aattagctgg
 22501 gcatgggtgcc acacacctgt ggtcccagct actcagaagg ctgaggcggg aggattgctt
 22561 gagggcagga ggattggtg atcctccac ctcagcctcc ggagtagctg ggacctcagg
 22621 tgcatgccac tatgcctggc taattttctt ttttctttt ttttttttt cgagacggag
 22681 tctcgtctg ttgcccaggc tggagtgcag tggcaggatc tgggtcact gcaagctccg
 22741 cctcccggt tcaagccatt ctctgctc agcctccca gtagctggga ctacaggagc
 22801 ccgccactgc accaggccaa ttttttggta ttttttagtag agacggggtt tcaactgtgt
 22861 agccaggatg gtctcgatct cctgactcog tgatccggcc acctcggct tccaaagtgc
 22921 tcggattaca ggcgtgagcc actgcgcca gccgtaatt ttcataat ttagtaaaac
 22981 agggtttcac catgttggcc aggctagtct tgaactcctg aaccaagtg atcctcctgc
 23041 cttggcctcc caaagtctg ggattacaga caccacacct ggctattatt attttttaga
 23101 gacaggggtg tgctctatct tccagcctgt agtgcagtgc agcctccatc atagctcgt
 23161 gcagccttga cctcctgggt tcaagtgatc gtcccgccta agcctctgga ggagctggga
 23221 gtactggcat gtgccaccat gcctggttaa ttttttttt ttttttttg agacagagtc
 23281 tcattctgtc acccaggctg gagtgcggtg gtgcgatctt ggcttactga aacctccacc
 23341 tcccagggtc cagcaattct cctgcctcac cttctgagt agctgggatt acaggttccg
 23401 gctaccaaac ctggctagtt tttgtatggt tagtagagac agggtttcac catgttgggtg
 23461 aggctggtct cgattctccc gcctcagcct cccaaagtgc tgggattaca ggcttgagcc
 23521 accgtgcctg gcttttttt ttttttttt ttttgggca ataaggtctc attgtcttgc
 23581 ccaggctagc cttatgtctc tagcctcaag tgatcctct ccctcagcct cccaaagtgc
 23641 tgggattaca ggtgggcgcc actgtgcctg tccccgttg gaggctttt ccacctctt
 23701 tttctgggtg cctcctctg ctcagccgca ccctgcagga tgacacaagg ggatggggag
 23761 gcaactcttg tccatcgac gggctcccctc tgacccctg acctcgtctc ccggaccccc
 23821 aggtctcctc gcctacctct tcttcaccaa cgggcacgag gtcaggaga tgacgctgga
23881 ccggagcagc tacaccagcc tcatcccaa cctgaggaac gtggctcctc tggacacgga
23941 ggtggccagc aatagaatct actggtctga cctgtcccag agaatgatct gcaggtgagc
 24001 gtcgccccctg cctgcagcct tggcccagc gtgagatgag ggctcctggc gctgatgcc
 24061 ttctctctc ctgcctcagc accagcttg acagagccca cggcgtctct tctatgaca
24121 ccgtcatcag cagagacatc caggccccc acgggctggc tgtggactgg atccacagca
24181 acatctactg gaccgactct gtcctgggca ctgtctctgt tgcggatacc aagggcgtga
24241 agaggaaaac gtatttcagg gagaacggct ccaagccaag ggccatcgtg gtggatcctg
24301 ttcattgggtg cgtatccacg acgctgaggg ctgcagaggg aatggaggga gcaggaagga
 24361 gcttcaggaa ctggttagtg ggctgggcat ggtggctcaa agcacctgta atcccagcac
 24421 tttgggaggc caaggtgggt ggatcatcaa gaccagcctg accaacaatg tgaaacctg
 24481 tctctactaa aaatacaaaa attagccggg tgtgggtggtg ggcacctgta atcccagctg
 24541 ctcgggaggc tgaggcagga gaatcactg aacctgggag atggagggtg cagtgcacca
 24601 agacagcccc actgcactcc agcctgggtg acagagtgag actccgtctc aaaaaaaaa

ES 2 547 015 T3

24661 aaaaaaacta aacaaaaaac tggttagtgg ctagacaaca ggatggatc ttccaagccc
 24721 atggctgact cagcagctcc tgggtcaaga cactgtgacc tgtgtcccct ggcaaggaagc
 24781 atcgcccctg ccacctgccc ggtgtactct gtacctgtca ggtgacatct gctacctaaag
 24841 cacgtgagag gtggcatttc acagtttcag tgtggtgctg acaaccggg acgcacactg
 24901 tccttgacgc tacaatcagg aggtgaatgt tgggtttcca gcagagaaca ctggagaagg
 24961 cacacttggg gtctggaagg gaaaagcagg gaagagagca tcatcagatg cctgcgggtg
 25021 aaggtgggcc cgctatggcc agcgtccctt tttattttta tttatttatt tatttgagat
 25081 ggaatctcgc tctgtcgcgc agactgtagt gcagtgggtg gatcacggct cactgcaagc
 25141 tccgcctcac aggttcacgc catttctctg cctcagcctc ccgagtagct gggactacag
 25201 gcaccgccca ccacgcccg ttaatttttt gcatttttat tagagacggg gtttcaccgc
 25261 gttagccagg atggtctaaa tctcctgacc ctgtgatcca cccgcctcgg cctccctaag
 25321 tgcttgatt acaagcgtga gccaccacgc cgggccccct tttatttttt tttttttga
 25381 gacggagtct cgctctgtcg cccaggctag attgcagtgg cgtgatctcg gctcactgca
 25441 gcctccgctc ccaggttca agtgattctc ctgcctcaac ctcccaacta attaggatta
 25501 caagcatgta ccaccatgcc tgactaattt tttgtatttt tagtagagac tgggtttcac
 25561 catgttggtc aggttggct cgaaccctta gcctcaagta atctgcctgc ctcagcctcc
 25621 caaacagcgg ggattacagg catgagccac tgtgcccaac ccaaccctgg atctctttta
 25681 aacaagacaa tgctcgtgtg tgccacagaa caatgggtgg ggtacatgtg gccagtggtg
 25741 tttggccaca taactgccag gccagagggg aagagactct cagactgtct ccactcagat
 25801 acaaatgtgt gtgttgtgtg cgtgtgttct ggtctcatat ttgtttgttt tgagacaggg
 25861 tgtcgtctcg tcaactgagtc tggagtgcag tggcgcaatc agagttcact gcagcctcaa
 25921 actcttgggc tcagttgatt ctcccacttc agcctcccaa gtagctggaa ctacaggtga
 25981 acaccactgt gccagctaa tttattttat ttttagtaga gatgaggtct cactatgttg
 26041 cccaggctgg tcttgacctc ctagcctcaa gcaatcctcc tgccttggtc tcccaagtg
 26101 ctgggattac acgtgcgagc catttgcgat ggcttgtgtt cttgtgtttc ttcctttttc
 26161 tttcgagatg gcgtctcagt ctgccacca ggctggagtg cagtgggtg atcatagctc
 26221 actgtagcct caacttctct ggctcaagca atcctcttga tttcagcctc cgggctcggg
 26281 ccagcatggt gaaaccccg ctctactaaa aatacaaaaa tgtagccagg cgtggtgggtg
 26341 ggcgcctgta atcccagcta caccagaggc tgaggcagga gaatcgcttg agcctggaag
 26401 gtggaggttg cagcaagcca agatcgtgcc actgcaactc agcctgggca acagagacag
 26461 actctgtctc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaacc caaacaagcc acatttggag tttgggggtc
 26521 ccagcaggac tttttcccaa gcctgagcct ggctgtttct tccagaattc gttgcacgca
 26581 ttggctggga tcctcccccg ccctccagcc tcacagctat tctctgtcct cccaccagct
 26641 tcatgtactg gactgactgg ggaactcccg ccaagatcaa gaaagggggc ctgaatgggtg
 26701 tggacatcta ctcgctggtg actgaaaaca ttcagtggcc caatggcatc accctaggta
 26761 tgttcgcagg acagccgtcc cagccagggc cgggcacagg ctggaggaca gacggggggtt
 26821 gccaggtggc tctgggacaa gcccaagctg ctccctgaag gtttccctct tcttttctt
 26881 tgttttttct ttttttgaga tgaggtcttg gtctgtcacc caggctggag tgcactggcg
 26941 caatcgtagc tcaactgagc ctccacctcc caggctcaag tgatcctcct gcctcaccct
 27001 cctgagtagc tgagattaca gacacgtgcc accacggcag actaatttta tttattttt
 27061 gggagagac aaagtcttgt tatgttggcc tggctggtct caaactcagg gtgcaagcga
 27121 tcctccgccc tcagccttcc aaactgctgg gattacaggc gtgggccacc gtaccagcc
 27181 tccttgaagt ttttctgacc tgcaactccc ctacctgccc attggagagg gcgtcacagg
 27241 ggaggggttc aggtcacat gtggttggag ctgcctctcc aggtgctttt ctgctaggtc

ES 2 547 015 T3

27301 cctggcaggg ggtcttctcg cccggagcag cgtggccagg ccctcaggac cctctgggac
 27361 tggcatcagc acgtgacctc tccttatcca cttgtgtgtc tagatctcct cagtggccgc
 27421 ctctactggg ttgactccaa acttactcct atctcaagca tcgatgtcaa cgggggcaac
 27481 cggaagacca tcttgagga tgaaaagagg ctggcccacc ccttctcctt ggccgtcttt
 27541 gaggtgtggc ttacgtacga gatgcaagca cttagtggtg ggatagacac agactataga
 27601 tcaactcaagc caagatgaac gcagaaaact ggttgtgact aggaggaggt cttagacctg
 27661 agttatttct attttcttct ttcttttttt tttttttttt gagacagagt tttgctctcg
 27721 tttcccaggc tggagggcaa tggcatgac tgggtcacc gcaacctcca cctcccaggt
 27781 tcaagtgatt ctctgtctc aggtcccca gtagctggga ttacaggcat gcaccaccac
 27841 catgcccggc taattttgta tttttagtag agacggagtt tctccatggt ggtcaggctg
 27901 gtctcgaact cccgacctca ggtgatctgc ctgcctcggc ctcccaaagt gctgggatta
 27961 cagacttgag ccaccgcgc cagctatttc tgttttcttt ctttcttctt cttctttttt
 28021 tttttctaag agacaggatc tcaactctgc cccaggcagg agtgacagtgc tgtgatcata
 28081 gctcactgca gccttaacct cctgggtcga agtgatcttc ccacctcagc ctcccaagta
 28141 gctggaacta caggtgcaca ccacctgac cagctcattt ttgtattttt tttttttttg
 28201 agacagtctc gttctgtcac cccggctgga gtgcagtggt acaatcttgg ctcaactgca
 28261 cctctgcctc ccagggtcaa gcgattctcc tgcctcagcc tcttgagtag ttgagattac
 28321 aggcattgtg gccatcatac ctggctgatt tttgtatttt tttttagaga tggggctca
 28381 gtagtggac caggctgtgc ttaaaactcc ggctcaagt gatcctcca cttcagtctc
 28441 ccaaagtgct gggattacag gcatgagcca ctgcggccgg tttgttttct ttttttttct
 28501 gttttttgga gacggaattt cacctttggt gcccaggatg gagtgcaatg gcacgatatc
 28561 gcctcaccac aacctctgcc tcttgggttc aaaccatttt cctgcctcag ccttcttagt
 28621 agctgggatt acaagcatgt gccaccacgc cggctgatt ttgtattttt agtagagatg
 28681 gggtttctcc atgttggeca ggctggtctc gaactcctga cctcaggtca ttcgcccacc
 28741 tctgcctccc aaagtgtggt gattacaggc gtgagccacc gtgcccggtg gtttgtattc
 28801 tttttactga gagtctgaa aggcagtgat cctctgtcac atgtgatctt ggctctcagg
 28861 ggacatttgg caatttctag agattttttg gttgtcacia gtcaatgggg aagactgttg
 28921 gcatttagtg ggttagaggct ggtgacgctg ctgaacaccc agaacaggga agtagcagge
 28981 cctagataga gccatctggt ggaaacctct ctctaaggaa atggcgctat tttataaccc
 29041 cacgttctcg gcatgattac caacagccaa aagtggagtc cccccaagtg tgttcgtcca
 29101 tttgcattgc agtaaaggaa tagctgaggc cgggtaattt ataaagaaa gagatttaaa
 29161 ctgggtatgg cagtttatgc ctataatccc agaacttttg gaggctgagg caggaggatc
 29221 gcttgagtcc aggagtgtga gaccgagacc agcctggcca acatgacgaa actctgtctc
 29281 taaaaaaat aaaaaaagta ggccaggcac ggtggttcac gcctgtaatc ccagcacttt
 29341 gggaggccga ggcggcgga tcacgaggtc aggagatcga gaccatcctg gctaacacgg
 29401 tgaacccccg tctctactaa aaatacaaaa acaaaattag ccgggtgtgg tggcaggcgc
 29461 ctgtagtccc agctactcgg gaggctgagg cgggagaatg gcgtgaaccc gggaggcgga
 29521 gcttgagtg agccaagatc gcgccactgc actccagcct gggtgaccga gttgagactc
 29581 cgtctcaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaat aaaaaaagta gccaggtgtg gtggcaggca
 29641 cctgtaatcc tgggttctcg agaccgaggc atgagaattg cctgaccca ggaggtggag
 29701 gctgcagtga gccaagatca tgccactgca ctccagcctg ggcgacagag tgggactctg
 29761 tctcaaaaaa caacaaaaaa aaagtctctg aaatggatgg tgggtatggt gatacttcca
 29821 caacagcgtg aatctgctta aggccaccga actgtgact cacaatagt cgagatggta
 29881 cattttatgt tatgtgtatt tcaccacaat taaaaactag ttgtgggcca ggtgtggtg

ES 2 547 015 T3

29941 ttcatgcctg taatcccagc actttgggag gtcagagga ggtggatcat gaggtcagca
 30001 gttcgagacc agccaggcca acatggtgaa accccatctc tactaaaaat acaaaaatta
 30061 gccaggcctg gtggcacatg cctgtagtcc cagctacttg agaggctgaa gcaggagaat
 30121 cgcttgaacc tgggaggcta agattgcagt gagccgagat cgtgccactg cactccagcc
 30181 tggacgacag agtgagactt cgtctcaaaa aaaaaaccaa aaaaaaatt agctgtgggt
 30241 caggcactgt ggctcacgcc tgtaatccca gcactttggg agaccgaggt aggtggatgg
 30301 cctgaggtaa ggagttcga tccagcctgg ccaacatggt gaaagcccgt ctctactaaa
 30361 aatacaaaaa attagtccag tatgttgga cacctgtaat cccagctact cgggaggtgt
 30421 aagcaagaga atcgtttga cccaggaggt ggacgttgca gtgagccgag attgggccac
 30481 tgtactccag cctgggcaac aaaagtgaaa ctctgtctga acaaaacaaa caaacaacaa
 30541 aacagacaaa caaaaaaact agttgtggag agagggtggc ctgtgtctca tcccagtggt
 30601 taacgggatt tgtcatcttc ctgtctgcct gtttaggaca aagtattttg gacagatc
 30661 atcaacgaag ccattttcag tgccaaccgc ctcacaggtt ccgatgtcaa cttgtggct
 30721 gaaaacctac tgtccccaga ggatatgggt ctctccaca acctcaccca gccaaagaggt
 30781 aagggtgggt cagccccacc ccccaacct tgaaacctcc ttgtggaaac tctggaatgt
 30841 tctggaatt tctggaatct tctggtatag ctgatgatct cgttctctcc ctgactccgc
 30901 ttcttctgcc ccaggagtga actggtgtga gaggaccacc ctgagcaatg gccgctgcca
 30961 gtatctgtgc etccctgcc cgcagatcaa cccccactcg cccaagtta cctgcccctg
 31021 cccggacggc atgctgtctg ccagggacat gaggagctgc ctcacaggtg tggcacacgc
 31081 cttgtttctg cgtcctgtgt cctccaactg cccctcctg agcctctctc tgctcatctg
 31141 tcaaatgggt acctcaaggt cgttgtaagg actcatgagt cgggataacc atacttttct
 31201 tggatggaca catcagcacc gggcttgaca tttaccaggt tccccttga tgccctgtt
 31261 cctctttccc ggccccctga agaggtgatc tgatttctga caggagccct gagggaggaa
 31321 atggctccct ttgttgactt ttcttttctc ttattttttt cttttgagat ttgctgtcac
 31381 ccagcctgga atgcagtgtg gccatcttgg ctcactgcta cctctccac tgggttcaag
 31441 caattctcct gcctcagcct cccaagtagc tgggattaca agcatgogcc accatgcctg
 31501 gctaagtgtt gtatttttag tacagacagg gtttctccat ggtggccagg ctggtcttga
 31561 actcctgacc tcaggtgatc ctcccacctc tgccctccga agtgctacga ttacaggtat
 31621 gagccaccgc gccatcccc ctttgttgac ttttctcctc ctctgagaaa gtctcagttg
 31681 aggccagcac ctccctcaag tgaattgaat ctcccttttg aacaacaaca aataacaata
 31741 tgaccagac gtggtggctc acacctgtgg tcccagctac tcgggaggct gaggtgtgag
 31801 gattgcttga gccaggagg tcaaggctac agagagctat aatcacacca ctactcaca
 31861 gcctggggga caaagtgaaa ccctgtctga aaaaaacaaa aaaaagaaaa ggaaaaagaa
 31921 acaatacagat cacaagtag atattcatag tgtttatttt cagtactctt ttttttttt
 31981 ttttttttt ttgagacgga gtcttgcctc gttgccagc ctggagtgca gtggcacgat
 32041 cttggctcac tgcagcctct gcctcccagg ttcaagcgtc tggctcactg caacctccgc
 32101 ctccctgggt caagcgttc ttctgcctca gcctcccag tagctgggac tataggcacg
 32161 tcccactacg cccagctaat ttttgtatt ttttagtaga gatggggttt cactatgta
 32221 gccaggatgg tctcgatctc ctgacctcgt gatctgcctg ccttgggctc ccaaagtgtt
 32281 gggattatgg gcatgagcca ctgcacctgg cttttttttt tttttttttt gagatggagt
 32341 ttgcctcttg ttgccaggc tggagtgcaa tgggtgtgatc tcggctcact gcaacctctg
 32401 cctcctgggt tcaagcaatt ctctgcctc agcctcccga gtagctggga ttacaggcac
 32461 ctgccaccac gcctggctaa ttttgtact ttttagtagag acgggggttc tccatgttg
 32521 tcaggctggt ctcaactcc tgacctcagg tgatccacc acctcggcct cccaaagtcc

ES 2 547 015 T3

32581 tgggattaca gacatgagcc accgcgcctg gccgtgtctg gcctttttta gttatttctt
 32641 tttttttttt tttttttttt gagacagagt cttactccgt cgcccaggct ggagtgcage
 32701 ggtgcgatgt ctgcgactg caagctccgc cccctgggtt catgccattc tcctgcctca
 32761 gccttctgag tagctgggac tgcaggcgcc tgccactacg cccggctact tttttgtata
 32821 tttagtagag atggagtttc actgtgttag ccaggatggt ctcgatctcc tgactttgtg
 32881 atccgcccgc ctgcgcctcc caaagtgtctg ggattacagg cgtgagccac catgccaggc
 32941 tttttttttt tttttttttt ttgagacgga gtcttgtctt gtcgcccagg ctggagtgca
 33001 gtgccatgat ctcagctcac tgcaagctcc acttcccagg ctcacgccat tctccagcct
 33061 cagcctccca agtagctgag actacagggg cccgccacca cactcggcta atttttttgt
 33121 attttttagta gagacgggtt ttcacatgt tagccaggct ggtcttgaac tcctaacctc
 33181 aggcgattca cctgcctcgg cctcccaaag tgctgggatt aaaggtatga gccacctcgc
 33241 ctggtgtgag ccacctcgc cagcctgagc cacctcacc agcctaagcc actgtgcctg
 33301 gcctgatttt ggacttttta aaaattttat taataattat ttttgggttt cttttttttg
 33361 agacagggtc ttactctgtc atccaggcca tcctgtctgt ctgtcatccc agtgatggga
 33421 tcataccttg ctgcagcctc tacctcctgg gctcaagcga tcctccccc tcagcctcct
 33481 gagtagctgg gactacaggt gtgaccacc acacctggct aatttttttt tttttttttg
 33541 tatatagaga tggatttttg ccatgttgac caggctagtc ttaaactcct ggactcactc
 33601 aagagatcct cctgccttgg cctcccaagg tcatttgaga ctttcgtcat taggcgcaca
 33661 cctatgagaa gggcctgcag gcacgtggca ctcagaagac gtttatttat tctttcagag
 33721 gctgaggctg cagtggccac ccaggagaca tccaccgtca ggctaagggt cagctccaca
 33781 gccqtaagga cacagcacac aaccaccga cctgttcccg acacctcccg gctgcctggg
 33841 gccaccctg ggctcaccac ggtggagata gtgacaatgt ctcaccaagg taaagactgg
 33901 gccctcccta ggcccctctt caccagaga cgggtccctt cagtggccac gaacattttg
 33961 gtcacgagat ggagtccagg tgctctctc actcccttgc tgaccttctc tcacttgggc
 34021 cgtgtgtctc tgggccctca gtttcctat ctgtaaagtg ggtctaataa cagttcttgc
 34081 cctctttgca aggattaaat gggccaaatc atatgagggg ccaggtcctt caggctcctg
 34141 gttcccaaag tcagccagc accgtgtggg tcccaaaatt ttatcaagge acattcgttg
 34201 cctcagcttc aggcacttgc caaaaaaggc caggactaag gcaaggagag ggagggatc
 34261 ctcagtactc agcttttcc agaggtcca aaaggctaag gaatccagta acgttttaac
 34321 acaattttac aatttttttt tttgagacgg agttttgtc ttgttgcca ggctggagtg
 34381 cagtggcagc atctcggctc actgcaacct ctggctcccg ggttcaagcg attctcctgc
 34441 ctcagtctcc cgagtagctg ggattacagg catgcgccac cacgctcggc taattttgta
 34501 tttttagtac agaaggggct tctctgttgg tcaggctggt cgtgaactct caacctcagg
 34561 tgagccaccc gcctgagcct cccaaagtgc tgggattaca ggtgtgagcc accacgcctg
 34621 gccttttttt tgagacagag tctcgtctc gcccatgctg tactgcagtg acgcagtctg
 34681 ggctcactgt aacctcgcgt tcccagggtc aagtattct tctgccgag cctccatgt
 34741 agagttagctg ggattacagg caccgccac catgcctggc taattcttgc atttttagta
 34801 gagatggggt ttcacagtgt tggccaggct ggtctcaaac ttctgacctc aagtcactg
 34861 cctgccttgg ccctgcaaaa gtgctgggat tatagatgtg agccaccgag cctggcctac
 34921 agtttattct ttggtggctc acacctgtaa tctcagcact ttgggaggcc aaggtgggag
 34981 aatggcttga gccagggagt tcaagtccag cctgggcaac atagcaagac cctatctcta
 35041 ctacaaaata aataataaat aaactaattt tttttctttt aaaaccaac tattcaacat
 35101 ggcaatgcaa tatattaaaa aaattttttt tttctttgaa acggagtctc tcactgtcac
 35161 ccgggctgga gtgcagtgtc gccatcttgg ctactgcaa cctccgcctc ccaggctcaa

ES 2 547 015 T3

35221 gtgattctcc tgcttcagcc tcccagtag ctgggattac aggcaaccac caccataccc
 35281 agctaataatt tttgtatatt tagtagagat ggggtttcac tatgttgggc aggctggtct
 35341 ggaactcctg acctcgtgat ctgccggagg atcggcggcc tcccaaagtg ctggggattg
 35401 caggcatgag ccaccgtgcc cagccaaaac ttttttattt ttattttttt gggacacggc
 35461 ctcaactgtg accccagact ggagtgatag agtgctgtca tggctcactg cagcctcaac
 35521 ctccctgggc tcaggtgatc ttcctgcttc agtctcccag gtagctggga ctacaggcat
 35581 gagccaccac acccagctaa tttttgaatt tttttgtaga gacagggttt caccttgtgg
 35641 cccagacttg tctctaactc cagggctcaa gcgatctgcc caccttggcc tcccaaagtg
 35701 ctgagattaa tgcaatttaa aaaatTTTTT ggccaggcct ggtggctcat gcctgtattc
 35761 acaacacctt gggaggcaaa ggtgggcaga tcaactgagg tcaggagtgc gagactagcc
 35821 tggccaacat ggtgaaaccc cctgtctact aaaaaaatac aaaaattacc tgggcacagt
 35881 ggtgggtgcc tgtaatccca gctacttggg atgtctgagg tggagaattg cttgaaacctg
 35941 ggaggcagaa gttgcagtaa gccaaagatca tgccactgga ctccagcctc agtgacagag
 36001 caaaactctg tctccaaaaa aattgttttt tttttttttt tttcaaatca tcacactaca
 36061 gccaggcctt ggccacttac ttttgtaaat aaagtTTTTT tggagccagt ggaccagtga
 36121 ggccgaatct tgcaggtgta agatcacagt ctatccttga aaatTTTgat attttgttca
 36181 ttgggtggtt tttcattaat ttaaattTTT aaaaataaca tattaaaggc tgggtgtggag
 36241 gtgcacgctt gcagtcctag ctactcccag aggctgaggc gggagacttg cttgagccca
 36301 agagttgaag tccagcctgg gcaacatagc gagaccccca tctctaaaaa taaaaataat
 36361 gcattagaat attattggat tcctgggcag ggcacagtgg ctcacacctg taatcccagc
 36421 actttgggag gctgaggtgg gtggatcacc tgaggtcagg agtttgagac cagcctggcc
 36481 aacatggtga aacccctct ctactaaaaa tacaaaaatt agccaggcgt ggtggcaggc
 36541 gcctgtaate ccagctactc gggaggctga agcacgagaa tcgcttgaat ccaggaggcg
 36601 gaggttcgag tgagctgaga ttgcccatt gcactccagc ctggaggaca agagtgaaac
 36661 tccattcccc tctgcaaaga aaaggaaat tatcagattc ctaagctttt tggctcccc
 36721 tttagtttgg gggctggggg ggtgagtgtc tgacctggcc tcaactgtcct ccctggatgt
 36781 gatgagaccc aggtgtgggt caggatgtca ttcgtttgtc caccagaggc cgccaaact
 36841 gctttgagct gctgggaaat ggtgctccta gacttttagc aaacaaaca aaaaaatgg
 36901 cacatcgga aatttcagac cattcttttt tttttttttt ttggtccag agtagctgaa
 36961 atctttgttc agttacaagc aggataaaat ggaaactgcc tgggagaggc tgagaaacct
 37021 tcttgcttgg gggagggtgg gcaactgctag aattaatcgc ttcacagacc agcccatcca
 37081 ggactcctca aatttggcaa aaaagccatt cattcattca ttcatttatg tagagacgag
 37141 ggggatctgg ctatattgcc tagattggtc tcaaattcct ggcctcaagt gatcctcctg
 37201 ccttggtcta ctaatgtgct gcgattacag gcatgagcca ccgtgcctag ctctagtggg
 37261 cttgaaatgt tgccttgccc agggccctta tgttgaatgg cccaggcca cttgtatggt
 37321 tctgtaccaa ggtaaacccc atcccataat gcctgggaca gttgatgagc gacaatcagc
 37381 ttctgtgcca ttcaacctca ggactgagca tgctgggcat tgtggggctc gaagggtggc
 37441 ccctgtccc cttcaaaata ccctcttttt ctttcttct tttttttttt tttttttttt
 37501 tgagacgaag tcttgctctg ttgccccagc tagagtgcag tggtgagatc tcagctccc
 37561 gcaacctctg cttcccgggt tcaggcgatt ctctgcctc agcctcctga gtagctggga
 37621 ttacaggtgc ccaccgccac agctggctaa tttttgtatt ttttagtagac acagggtttc
 37681 accgtgttgg ccaggctggt cttgaaactc tgacctcagg caacctgcc acctcagcct
 37741 cccaaagtgc tgggattaca ggtttgagcc actgggcctg gccttttttt tttttttttg
 37801 agagggagtc tcaactctgtt gccaggctg gagtgcaatg gcgcgatctt gactcactgc

ES 2 547 015 T3

37861 aactccattt cccgggttca agtgattctc ctccctcagc ctcccaagta gctgggatta
 37921 cagggtgatg ccaccacggc cagctaattt tgtattttta gtagagacag ggtttacta
 37981 tgttgatcat gctggctca aactcctgac cttaggtgat ctgcccgcct tagcctccca
 38041 aagtgttgag attacagggtg tgagccaccg cgcccagacc aaaatatgct cattttaata
 38101 aaatgcacaa gtagggtgac aagaatttca cctgcaacct tgtcaaccac ctagaataaa
 38161 agcctctgca gccctcccct aaagactcat caatgtgagg ctcaagaacc ttcttaggct
 38221 gggctcggtg gctcatttct gtaatccctg cactttggaa ggctgaggca ggaggatctc
 38281 ttgagccag gatttcaaga caagcctggg caacatagcc agacctctgt ttctatcccc
 38341 cacaaaaaga accttcttaa accggaattg agtcctacaa cctcgataac tcacaaataa
 38401 gccctgtgag cctctcacag acttgggaag ttctccaagt gtccagggag atgtgccagg
 38461 cgctttcctg ccgtgaccac cgtcctctgc ctgctccatt tcttggtggc cttcctttag
 38521 acctgggct cactcttctg tctctcctgc agctctgggc gacgttctg gcagagggaa
 38581 tgagaagaag ccagtagcg tgagggctct gtccattgtc ctccccatcg gtaagcgcgg
 38641 gccggtcccc cagcgtcccc caggtcacag cctcccgcta tgtgacctcg tgcctggctg
 38701 gttgggctg ttcaactttt ctctggaca gggaacagcc ccactggtgt ctttatcac
 38761 ccccacggc tctcctggtg tgggctgac agtgacaaga tcagacagct aaggggtcag
 38821 atggaggatg tggagctggg tcccgtctg tggaatagcc tcaccgagat ttgagtgcct
 38881 tctggggaac tggttccctt gcagggggct gtgtggagag gcgcgctctc cctgcctcac
 38941 ccatgctcat cctaactcgg ttaccatcac atctctttt tcttttttc ttaaatttta
 39001 agaaaaaaga aatttaattt ttttgagaga cagagtcttg ctctgtcacc caggctggag
 39061 tgcaagtggc ccatcatgcc tcgctgcagc ctcaatgtct gggctcaagc gatcctccca
 39121 cctcagcctc ctgagtagct ggtgcaagcc actatacccc acttctctatt tcttaaaaag
 39181 tcacagccct gtgtgtggct aatcctggac agaaatctag aagaagtcag ctacttctg
 39241 ggcgtggctc acccagtggg cttcagggtta gatatttctt atacttatga ggctgggtgt
 39301 ggtggcctat gcctgtaatc ccagcacttt gggaggctga agtgggtgga ttgctgggc
 39361 tcaggagttc gagaccaacc tgggcaacat ggcgaaaccc tgtttctaga aaaggtacaa
 39421 aaattagctg ggcaggtggc acgtgcctgt ggtaccagct acttgagggc ctgaggcagg
 39481 aggatcgctt gaacctggga ggtcgagggt gcagtgaaact gagatcatgt cactgcactc
 39541 cagcctggtg acagagcaag accccgtctc aaaaaaaaaa aaagaaagaa aaaaattctt
 39601 atgcatagat ttgcctctt tctgtttgtt tgttttgaga tggagtctcg ctctgtcgcc
 39661 caggctggag tacagtggct caacctcggc tcaactgcaac ctctgcctcc cgggttcaag
 39721 caattctcct gcctcagcct cctgagtagc tgggactaca ggcgccgcc accatgccca
 39781 gctaattttt gtatttttag tagagactga ctgggtttca tcatgttggc caggctggct
 39841 tcgaactctt gacctatga tccgccgcc tcagcctccc aaaatgctgg gattacaggg
 39901 gtgagccacc aggccaggc cgcaaggcga tctctaaaca aacataaaag accaggagtc
 39961 aaggttatgg tacgatgccc gtgttttcaac tccagccacg gagctgggtc tctgtctcg
 40021 ggggcagctg tgtgacagag cgtgcctctc cctacagtgc tcctcgtctt cctttgctg
 40081 ggggtcttcc ttctatggaa gaactggcgg ctaagaaca tcaacagcat caactttgac
 40141 aacccgtct atcagaagac cacagaggat gaggctccaca tttgcccaa ccaggacggc
 40201 tacagctacc cctcggtag tgaccctctc tagaaagcca gagcccatgg cggccccctc
 40261 ccagctggag gcatatgat ctcaaggac caggccgagg cttccccagc cctccagatc
 40321 gaggacagca ttaggtgaat gcttctgtgc gctcattcag aatgtcagcg gacaatggcc
 40381 ttggtgtgt agaggaatgt tggataagca aatagagagc tccatcagat ggtgacaggg
 40441 caaagaaagt caaaaggagt tcagaggccg ggcgcggtgg ctcatgcctg taatcccagg

ES 2 547 015 T3

40501 actttgggag gccgaggctg gcggatcacc tgaagtcagg agtttgagac cagcttggcc
 40561 atcatgacaa aacccccgtct ctattaaaaa tacaaaaaat tagccaggcg tgggagtggg
 40621 cgctgtaat ccagctact cgggaggccg aggtagaaaa atcgcttga cctaggaggc
 40681 agaggttgca gtgagccgag atcggccac tgcattccag cccgggaggc aagagcaaaa
 40741 ctccatctca aaaaaaaaaa aaaaaggagt tcagaggccc ggcattggtg ttcacacatg
 40801 tgatcccaga acttggggag gttgaggcag gagaatcacc tgagctcaga gttcaagacc
 40861 agcctgggca gcacagcaag accccatctc tgcaaaaaat aaaaatttag cccagtgtgg
 40921 tgatgagcgc ctagtccag ctactagga ggctaaggca ggaggattgc ttgaggctaa
 40981 ggtaggagat tgagactgca gtgactgtg attgctcac tgcgctccag cctgggtgac
 41041 agagcaagcc ctgtctctt aaaaaaaaaa aaaaattcaa agaagggtt ccagagggcc
 41101 agggaggagg aagggagagg aggtgtttta ttttttgct tttattttt attttgagac
 41161 agagtctctc tctgtcacc aggttgaggt gcagtgctgt gatcttggct cactgcaact
 41221 tctgcctctc gggttcaagc aattctatg cctcagctc agcctcctga gtagctggga
 41281 ttacaacact atgcccgggt aatttttgta tttttagtag agacgaggt tcccatggt
 41341 gccagactg gtctcgaact cctgacctca agtgatccac cgccttggc ctcccacgt
 41401 gctgggattg caggcgtgag cactgccc cgccttgatc tttacacaag gggtttaggg
 41461 taggtagcct tctctgaacc aggagaacag cctgtgcgaa ggccctgagg ctggaccgtg
 41521 cctgttgggt ttgaggccgt tgtagctgga gcaaacagag agaggggtaa aaaggcagga
 41581 ggctaccagg caggttgtgc agagcctgt gggccactgg ggaggacttt ggcttttggc
 41641 ctgagagcgc tgggaagtga ctgaatccg tactcaccgt ctccctctg cggctcctg
 41701 gggaaatgc ttggggatca ggctggggga ggctgccagg cccaggagggt gagaagtagg
 41761 tggcctccag ccgtgttcc tgaatctg actgatagtt tccgctgtt accatttgtt
 41821 ggcagagaca gatggtcagt ctggagatg acgtggcgtg aacatctgcc tggagtcccg
 41881 tccctgcca gaacccttcc tgagacctcg ccggccttgt tttatcaaa gacagagaag
 41941 accaaagcat tgcctgcag agctttgttt tatatattta ttcactctggg aggcagaaca
 42001 ggcttcggac agtgcccag caatggctt gggtgggatt ttggttctt ccttctctc
 42061 tgaaggataa gaaaaacagg cccgggggga ccaggatgac acctccatt ctctccagga
 42121 agttttgagt ttctctccac cgtgacaaa tcctcaaaa tggaaagtga aaggggaggg
 42181 gatgtcaggc ccagagaagc aagtggctt caacacaaa cagcagatgg caccaacggg
 42241 acccctggc cctgcctcat ccaccaatct ctaagccaaa cccctaaact caggagtcaa
 42301 cgtgtttacc tcttctatgc aagccttgt agacagccag gttagcctt gccctgtcac
 42361 cccgaatca tgaccaccc agtgtcttc gaggtgggt ttgtacctc ttaagccagg
 42421 aaagggatc atggcgtcgg aatgatctg gctgaatccg tgggtggcacc gagaccaaac
 42481 tcattacca aatgatgcca ctccagag gcagagcctg agtcaactgt caccctaat
 42541 atttattaag tgcctgagac acccggttac cttggccgtg aggacacgtg gcctgcacc
 42601 aggtgtggct gtcaggacac cagcctgggt cccatcctc cgaccctac ccactccat
 42661 tcccggtgct tccttgact ttctcagttc agagttgtac actgtgtaca tttggcattt
 42721 gtgtattat tttgactgt tttctgtcgt gtgtgtggg atgggatccc aggccaggga
 42781 aagccctgt caatgaatgc cggggacaga gaggggcagg ttgaccggga cttcaaagcc
 42841 gtgatcgtga atatcgagaa ctgccattgt cgtctttatg tccgccacc tagtgcttcc
 42901 acttctatgc aaatgcctcc aagccattca cttcccaat cttgtcgtt atgggtatgt
 42961 gtttaaaaca tgcacggtga ggccgggccc agtggctcac gcctgtaac ccagcacttt
 43021 gggaggccga ggccgggtga tcatgagtc aggagatcga gaccatcctg gctaacacgt
 43081 gaaacccct ctctactaaa aatacaaaaa attagccggg cgtgggtggc ggccactgta

ES 2 547 015 T3

43141 gtcccagcta ctcgggaggc tgaggcagga gaatggtgtg aaccgggaa gcggagcttg
 43201 cagttagacc agattgcgcc actgcagtc gcagctctggc ctggcgaca gagcgagact
 43261 ccgtctcaaa aaaaaaaaaac aaaaaaaaaac catgcatggt gcatcagcag cccatggcct
 43321 ctggccaggc atggcgaggc tgagggtgga ggatggtttg agctcagga ttgaggctg
 43381 tcgttagcta tgattatgcc actgctttcc agcctgggca acatagtaag acccatctc
 43441 ttaaaaaatg aatttgcca gacacaggtg cctcacgcct gtaatcccag cactttggga
 43501 ggctgagctg gatcacttga gttcaggagt tggagaccag gcctgagcaa caaagcgaga
 43561 tcccattctc acaaaaacca aaaagttaa aatcagctgg gtacgggtggc acgtgcctgt
 43621 gatcccagct acttgggagg ctgaggcagg aggatgcct gagcccagga ggtggaggtt
 43681 gcagttagcc atgatcgagc cactgcactc cagcctgggc aacagatgaa gaccctattt
 43741 cagaaataca actataaaaa aataaataaa tcctccagtc tggatcgttt gacgggactt
 43801 caggttcttt ctgaaatcgc cgtgttactg ttgactgat gtccggagag acagtgacag
 43861 cctccgtcag actcccgcgt gaagatgtca caaggattg gcaattgtcc ccagggacaa
 43921 aacactgtgt cccccagc gcagggaacc gtgataagcc tttctggtt cggagcacgt
 43981 aatgctgc ccgtacagat agtggggatt tttgttatg tttgacttt gtatattgtt
 44041 tgaaactgtt atcacttata tatatatata tacacacata tatataaaat ctatttattt
 44101 ttgcaaaccc tggttgctgt attgttcag tgactattct cggggccctg tgtaggggtt
 44161 tattgcctct gaaatgcctc ttctttatgt acaaagatta tttgcacgaa ctggactgtg
 44221 tgcaacgctt tttgggagaa tgatgtccc gttgtatgta tgagtggctt ctgggagatg
 44281 ggtgtcactt ttaaacacc tgtatagaag gttttgtag cctgaatgtc ttaactgtgat
 44341 caattaaatt tcttaaatg

Sekvens del ADNc del receptor de LDL humano (NM_000527)

Zona codificante subrayada.

1 gccccgagtg caatcgcggg aagccagggt tccagctag gacacagcag gtcgtgatcc
 61 ggtgctggac actgcctggc agaggctgag agcatggggc cctgggctg gaaattgcgc
 121 tggaccctc ccttgcctc ccgcccggc gggactgca tggcgacag atgtgaaaga
 181 aacgagttcc agtgccaaga cgggaaatgc atctcctaca agtgggtctg cgatggcagc
 241 gctgagtgcc aggatggctc tgatgagtcc caggagacgt gcttgcctgt cacctgcaa
 301 tccggggact tcagctgtg gggccgtgc aaccgctgca ttcctcagtt ctggaggtgc
 361 gatggccaag tggactgca caacgctca gacgagcaag gctgtcccc caagacgtgc
 421 tcccaggacg agtttcctc ccacgatggg aagtgcctc ctccggcagtt cgtctgtgac
 481 tcagaccggg actgcttggc cggctcagc gaggcctc gcccgtgct cacctgtggt
 541 cccgccagct tccagtgcaa cagctccacc tgcaccccc agctgtgggc ctgcgacaac
 601 gaccccagct qcgaagatgg ctccgatgag tggccgcagc gctgtagggg tctttacgtg
 661 ttccaagggg acagttagcc ctgctcggc ttcgagttcc actgcctaag tggcaggtgc
 721 atccactcca gctggcctg tgatggtggc cccgactgca aggacaaatc tgacgagga
 781 aactgcctg tggccacctg tcgccctgac gaattccagt gctctgatgg aaactgcac
 841 catggcagcc ggcagtgtg ccgggaatat gactgcaagg acatgagcga tgaagttggc
 901 tgcgttaatg tgacactctg cgagggaccc aacaagtcca agtgtcacag cggcgaatgc
 961 atcacccctg acaaaagtct caacatggct agagactgcc gggactggtc agatgaaccc
 1021 atcaaaagat gcgggacca cgaatgctt gacaacaacg cgggctgtc ccacgtctc

ES 2 547 015 T3

1081 aatgacctta agatcgqcta cgagtgcctg tgccccgacg gcttccagct ggtggcccag
1141 cgaagatgcg aagatatcga tgagtgtcag gatccccgaca cctgcagcca gctctgcgtg
1201 aacctggagg gtggctacaa gtgccagtgt gaggaaggct tccagctgga cccccacacg
1261 aaggcctgca aggctgtggg ctccatcgcc tacctettct tcaccaaccg gcacgaggtc
1321 aggaagatga cgctggaccg gagcgagtac accagcctca tccccaacct gaggaacgtg
1381 gtcgctctgg acacggagggt ggccagcaat agaatctact ggtctgacct gtcccagaga
1441 atgatctgca gcaccagct tgacagagcc cagggcgtct cttcctatga caccgtcacc
1501 agcagggaca tccaggcccc cgacgggctg gctgtggact ggatccacag caacatctac
1561 tggaccgact ctgtcctggg cactgtctct gttgcggata ccaagggcgt gaagagggaa
1621 acgttattca gggagaacgg ctccaagcca agggccatcg tgggtgatcc tgttcatggc
1681 ttcattgact ggactgactg gggaaactcc gccaaagatca agaaaggggg cctgaatggt
1741 gtggacatct actcgctggt gactgaaaac attcagtggc ccaatggcat caccctagat
1801 ctctcagtg gccgcctcta ctgggtgac tccaaacttc actccatctc aagcatcgat
1861 gtcaatgggg gcaaccggaa gaccatcttg gaggatgaaa agaggctggc ccacccttc
1921 tccttgccg tctttgagga caaagtattt tggacagata tcatcaacga agccattttc
1981 agtgccaacc gcctcacagg tcccgatgac aacttgttgg ctgaaaacct actgtcccca
2041 gaggatattg tctcttcca caacctcacc cagccaagag gactgaaactg gtgtgagagg
2101 accaccctga gcaatggcgg ctgccagtat ctgtgcctcc ctgccccgca gatcaacccc
2161 cactcgccca agtttacctg cgctgcccg gacggcatgc tgctggccag ggacatgagg
2221 agctgcctca cagaggtcga ggctgcagtg gccacccagg agacatccac cgtcaggcta
2281 aaggctcagct ccacagccgt aaggacacag cacacaacca cccggcctgt tcccacacc
2341 tcccggctgc ctggggccac ccctgggctc accacggctg agatagtac aatgtctcac
2401 caagctctgg gcgacgttg tggcagagga aatgagaaga agcccagtag cgtgagggtc
2461 ctgtccattg tcttccccat cgtgctctc gtcttctctt gcctgggggt cttccttcta
2521 tggagaact ggcggcttaa gaacatcaac agcatcaact ttgacaaccc cgtctatcag
2581 aagaccacag aggatgaggt ccacatttgc cacaaccagg acggctacag ctaccctcg
2641 agacagatgg tcagtctgga ggatgacgtg gcgtgaacat ctgcctggag tcccgccct
2701 gcccagaacc cttcctgaga cctgcccggc cttgttttat tcaaagacag agaagaccaa
2761 agcattgcct gccagagctt gttttatat atttattcat ctgggaggca gaacaggctt
2821 cggacagtgc ccatgcaatg gcttgggttg ggattttggt ttcttcttt cctgtgaagg
2881 ataagagaaa caggcccggg gggaccagga tgacacctcc atttctctcc aggaagtttt
2941 gagtttctct ccaccgtgac acaatcctca aacatggaag atgaaagggc aggggatgac
3001 agggccagag aagcaagtgg ctttcaacac acaacagcag atggcaccaa cgggaccccc
3061 tggccctgcc tcatccacca atctctaagc caaaccccta aactcaggag tcaacgtgtt
3121 tacctctct atgcaagcct tgctagacag ccaggtagc ctttgccctg tcacccccga
3181 atcatgaccc acccagtgct tttcgaggtg ggtttgtacc ttccttaagc caggaaaggg
3241 atctatggcg tcggaaatga tctggctgaa tccgtggttg caccgagacc aaactcattc
3301 accaaatgat gccacttccc agaggcagag cctgagtcac cggtcaccct taatatttat
3361 taagtgcctg agacaccggg ttaccttggc cgtgaggaca cgtggcctgc acccaggtgt
3421 ggctgtcagg acaccagcct ggtgccctc ctcccagacc ctaccactt ccattcccgt
3481 ggtctccttg cactttctca gttcagagtt gtacactgtg tacatttggc atttgtgta
3541 ttattttgca ctgtttctg tcgtgtgtgt tgggatggga tcccaggcca gggaaagccc
3601 gtgtcaatga atgccgggga cagagagggg caggttgacc gggacttcaa agccgtgatc
3661 gtgaatatcg agaactgcca ttgtcgtctt tatgtccgcc cacctagtgc ttccacttct

ES 2 547 015 T3

3721 atgcaaatgc ctccaagcca ttcacttccc caatcttgtc gttgatgggt atgtgtttaa
3781 aacatgcacg gtgaggccgg gcgcagtggc ctcacgcctg taatcccagc actttgggag
3841 gccgagggcg gtggatcatg aggtcaggag atcgagacca tcctggctaa caaggtgaaa
3901 ccccgctctc actaaaaata caaaaaatta gccgggcgcg gtgggtgggca cctgtagtcc
3961 cagctactcg ggaggctgag gcaggagaat ggtgtgaacc cgggaagcgg agcttgacgt
4021 gagccgagat tgcgccactg cagtcccgag tctggcctgg gcgacagagc gagactccgt
4081 ctcaaaaaaa acaaaaacaaa aaaaaacat gcatggtgca tcagcagccc atggcctctg
4141 gccaggcacg gcgaggctga ggtgggagga tggtttgagc tcaggcattt gaggctgtcg
4201 tgagctatga ttatgccact gctttccagc ctgggcaaca tagtaagacc ccatctctta
4261 aaaaaatgat ttggccagac acaggtgcct cacgcctgta atcccagcac tttgggaggg
4321 tgagctggat cacttgagtt caggagttgg agaccaggcc tgagcaacaa agcgagatcc
4381 catctctaca aaaaccacaaa agttaaaaat cagctgggta tgggtggcacg tgcctgtgat
4441 cccagctact tgggaggctg aggcaggagg atcgcctgag cccaggagggt ggaggttgca
4501 gtgagccatg atcgagccac tgcactccag cctgggcaac agatgaagac cctatttcag
4561 aaatacaact ataaaaaaaa taaataaatc ctccagtctg gatcgtttga cgggacttca
4621 ggttctttct gaaatcgccg tgttactgtt gcactgatgt ccggagagac agtgacagcc
4681 tccgtcagac tcccgcgtga agatgtcaca agggattggc aattgtcccc agggacaaaa
4741 cactgtgtcc cccccagtgc agggaaaccgt gataagcctt tctggtttcg gagcacgtaa
4801 atgcgtccct gtacagatag tggggatttt ttggtatgtt tgcactttgt atattggttg
4861 aaactgttat cacttatata tatatataca cacatatata taaaatctat ttatttttgc
4921 aaaccctggg tgctgtatatt gttcagtgc tattctcggg gccctgtgta gggggttatt
4981 gcctctgaaa tgcctcttct ttatgtacaa agattatttg cacgaactgg actgtgtgca
5041 acgctttttg ggagaatgat gtccccgttg tatgtatgag tggcttctgg gagatgggtg
5101 tcaactttta aaccactgta tagaaggttt ttgtagcctg aatgtcttac tgtgatcaat
5161 taaatttctt aaatg

Proteinsekvens del receptor del LDL humano

NP_000518

Secuencia proteínica de la proteína precursora (1-860).

1 mgpwwkrlw tvalllaag tavgrcern efqcqdgkci sykwwcdgsa ecqdsdesq
61 etclsvtcks gdfscggrvn rcipqfwrce gqvdcnngsd eqgcppkctcs qdefrhdgk
121 cisrqfvcds drdcldgsde ascpvlctgp asfgcnsstc ipqlwacdnd pdcedgsdew
181 pqrcreglyvf qgdsspsaf efhclsgeci hsswrtdgpp dckdksdeen cavatcrpde
241 fqcsdgnclh gsrqcdreyd ckdmstdevgc vnvtlcegnp kfkchsgeci tldkvcnmar
301 dcrdwsdepi kecgtnelc nnggcshvcn dlkigyelc pdgfqlvaqr rcedidecqd
361 pdtcsqlcvn leggykqce egfqlphtk ackavgsiay lfftnrhevr kmtldrseyt
421 slipnlrnvv aldtevasnr iywsdlsqrm icstqldrah gvssydtvis rdiqapdgla
481 vdwihsniyw tdsvlgtvsv adtkgvkrkt lfrenskpr aivvdpvhgf mywtdwgtpa
541 kikkglngv diyslvteni qwpngitldl lsgrlywvds klhsissidv nggnrktilc
601 dekrpahpfs lavfedkvfw tdiineaifs anrltgsdvn llaenllspe dmvlfhnlq
661 prgnwcert tlnnggcqyl clpapqinph spkftcacpd gmlardmrs clteaeaava
721 tqetstvrk vsstavrtqh tttrpvpdts rlpgatpqlt tveivtmshq algdvagrqn
5 781 ekkpssvral sivlpivllv flclgvllw knwrlknins infdnpyyqk ttdevhich
841 nqdgyspsr qmvsleddva

Secuencias de ARNhc

ARNpi con sitios diana en la secuencia del ARNm del receptor de LDL porcino.

ES 2 547 015 T3

	Base de inicio en la secuencia AF065990 del ADNc porcino	Secuencia
Diana 1	763	TGTEAAAGCGCGGAGTCCA
Diana 2	889	TCCCATATCGGGCAATGAGC
Diana 3	1150	ACCCCTCGCCCGTACTCAGT
Diana 4	1308	TGAAATCATTATGGGCGAA
Diana 5	1309	GAGACCAATATGGGCGAAG
Diana 6	1439	AGACTCTTTCCAAASAGAA
Diana 7	1553	TGAAAGGAGTCGACCGTTA
Diana 8	1814	TCGAGAGCTCGGACATACA

Secuencia pSUPER.retro.puro

Sitios de restricción utilizados

BglII:1447

5 XhoI: 1420

Los números se refieren a la secuencia original pSuper.retro.puro

SECUENCIA pSUPER.retro.puro:

```

1   TGAAAGACCC CACCTGTAGG TTTGGCAAGC TAGCTTAAGT AACGCCATTT TGCAAGGCAT
61  GGAAAATACA TAACTGAGAA TAGAGAAGTT CAGATCAAGG TTAGGAACAG AGAGACAGCA
121 GAATATGGGC CAAACAGGAT ATCTGTGGTA AGCAGTTCCT GCCCCGGCTC AGGGCCAAGA
181 ACAGATGGTC CCCAGATGCG GTCCCGCCCT CAGCAGTTTC TAGAGAACCA TCAGATGTTT
241 CCAGGGTGCC CCAAGGACCT GAAATGACCC TGTGCCITAT TTGAACTAAC CAATCAGTTC
301 GCTTCTCGCT TCTGTTCGCG CGTCTCTGCT CCCCGAGCTC AATAAAAGAG CCCACAACCC
361 CTCACTCGGC GCGCCAGTCC TCCGATAGAC TGCCTCGCCC GGGTACCCGT ATTCCCAATA
421 AAGCCTCTTG CTGTTTGCAT CCGAATCGTG GACTCGCTGA TCCTTGGGAG GGTCTCTCTA
481 GATTGATIGA CTGCCACCT CGGGGGTCTT TCATTGGAG GTTCCACCGA GATTTGGAGA
541 CCCCTGCCCA GGGACCACCG ACCCCCCCGC CGGGAGGTAA GCTGGCCAGC GGTCTTTTCG
601 TGTCTGTCTC TGTCTTTGTG CGTGTTTGTG CCGGCATCTA ATGTTTGGCG CTGCGTCTGT
661 ACTAGTTAGC TAACTAGCTC TGTATCTGGC GGACCCGTGG TGGAACTGAC GAGTCTGTAA
721 CACCCGGCCG CAACCCTGGG AGACGTCCA GGGACTTTGG GGGCCGTTTT TGTGGCCCGA
781 CCTGAGGAAG GGAGTCGATG TGGAAATCCGA CCCCGTCAGG ATATGTGGTT CTGGTAGGAG
841 ACGAGAACCT AAAACAGTTC CCGCTCCGT CTGAATTTT GCTTTCGGTT TGGAACCGAA
901 GCCGCGCGTC TTGTCTGCTG CAGCGCTGCA GCATCGTTC TGTGTGCTC TGTCTGACTG
961 TGTTTCTGTA TTTGCTGAA AATTAGGGCC AGACTGTTAC CACTCCCTTA AGTTTGACCT
1021 TAGGTCAC TGAAAGATGTC GAGCGGATCG CTCACAACCA GTCGGTAGAT GTCAAGAAGA
1081 GACGTTGGGT TACCTTCTGC TCTGCAGAA GGCCAACCTT TAACGTCGGA TGGCCGCGAG
1141 ACGGCACCTT TAACCGAGAC CTCATCACCC AGGTTAAGAT CAAGGTCTTT TCACCTGGCC
1201 CGCATGGACA CCCAGACCAG GTCCCCTACA TCGTGACCTG GGAAGCCTTG GCTTTTGACC
1261 CCCCTCCCTG GGTCAAGCCC TTTGTACACC CTAAGCCTCC GCCTCCTCTT CCTCCATCCG
1321 CCCCGTCTCT CCCCTTGAA CCTCCTCGTT CGACCCCGCC TCGATCCTCC CTTTATCCAG
1381 CCCTCACICC TTCTTAGGC GCCGGAATTA GATCGATCTC
    
```

a) Secuencia original pSUPER.retro.puro TCGAGGTCGA CGGTATCGAT AAGCTTA

10 b) Después de la división (BglII y XhoI) y la inserción de oligo ADN en T1

```

TCGAGAAAAA TGTCAAAGCG GCGAGTGCAT TCAAGAGATG CACTCGCCGC
TTTGACAGGG
    
```

c) Similar para T2-T8

GAT CTGTGGTCTC ATACAGAACT TATAAGATT CCAAATCCAA AGACATTTCA
 1501 CGTTTATGGT GATTTCCAG AACACATAGC GACATGCAA TATTGCAGGG CGCCACTCCC
 1561 CTGTCCCTCA CAGCCATCTT CCTGCCAGGG CGCACGCGCG CTGGGTGTTC CCGCTAGTG
 1621 ACACTGGGCC CGCGATTCTT TGGAGCGGGT TGATGACGTC AGCGTTCGAA TTCTACCGGG
 1681 TAGGGGAGGC GCTTTTCCCA AGGCAGTCTG GAGCATGCGC TTTAGCAGCC CCGCTGGGCA
 1741 CTGGGCCTA CACAAGTGGC CTCTGGCCTC GCACACATTC CACATCCACC GGTAGGCGCC
 1801 AACCGGCTCC GTTCTTTGGT GGCCCTTCG CGCCACCTTC TACTCCTCCC CTAGTCAGGA
 1861 AGTTCCTCCC CGCCCCGAG CTCGCGTCGT GCAGGACGTG ACAAATGGAA GTAGCACGTC
 1921 TCACTAGTCT CGTGCAGATG GACAGACCCG CTGAGCAATG GAAGCGGGTA GGCCTTTGGG
 1981 GCAGCGGCCA ATAGCAGCTT TGCTCCTTCG CTTTCTGGGC TCAGAGGCTG GGAAGGGGTG
 2041 GGTCCGGGGG CGGGCTCAGG GGCGGGCTCA GGGCGGGGG GGGCGCCGA AGGTCTCTCC
 2101 GAGGCCCGGC ATTCTGCACG TTTCAAAAGC GCACGTCTGC CGCGCTGTTC TCCTTTCCT
 2161 CATCTCCGGG CCTTTCGACC TGCAGCCCAA GCTAGCTTAC CATGACCGAG TACAAGCCCA
 2221 CGGTGCGCCT CGCCACCCGC GACGACGTC CCAGGGCCGT ACGCACCTTC GCCCGCGCT
 2281 TCGCCGACTA CCCCCGACG CGCCACACCG TCGATCCGGA CCGCCACATC GAGCGGGTCA
 2341 CCGAGCTGCA AGAACTCTTC CTCACGCGCG TCGGGCTCGA CATCGGCAAG GTGTGGGTCG
 2401 CGGACGACGG CGCCGCGGTG GCGGTCTGGA CCACGCCGGA GAGCGTCGAA GCGGGGGCGG
 2461 TGTTCGCCGA GATCGGCCCG CGCAIGCCG AGTTGAGCGG TTCCCGGCTG GCCGCGCAGC
 2521 AACAGATGGA AGGCCTCTG GCGCCGACCC GGCCCAAGGA GCCCGCGTGG TTCTGGCCA
 2581 CCGTCGGCGT CTCGCCGAC CACCAGGGCA AGGGTCTGG CAGCGCCGTC GTGCTCCCCG
 2641 GAGTGGAGGC GGCCGAGCGC GCCGGGGTGC CCGCTTCCT GGAGACCTCC GCGCCCCGA
 2701 ACCTCCCTT CTACGAGCGG CTCGGCTTCA CCGTCACCGC CGACGTCGAG GTGCCGAAG
 2761 GACCGCGCAC CTGGTGCATG ACCCGCAAGC CCGGTGCCTG ACGCCCGCC CACGACCCGC
 2821 AGCGCCCGAC CGAAAGGAGC GCACGACCCC ATGCATCGAT AAAATAAAG ATTTTATTTA
 2881 GTCTCCAGAA AAAGGGGGA ATGAAAGACC CCACCTGTAG GTTTGGCAAG CTAGAGAACC
 2941 ATCAGATGTT TCCAGGGTGC CCCAAGGACC TGAATGACC CTGTGCCTTA TTTGAACTAA
 3001 CCAATCAGTT CGCTTCTCGC TTCGTCTCGC GCGCTCTGC TCCCAGAGT CAATAAAGA
 3061 GCCACAACC CCTACTCGG CGCGCCAGTC CTCCGATAGA CTGCGTCGCC CGGGTACCCG
 3121 TGTATCCAAT AAACCTCTT GCAGTTGCAT CCGACTTGTG GTCTCGCTGT TCCTTGGGAG
 3181 GGTCTCCTCT GAGTGATTGA CTACCCGTC CCGGGGGTCT TTCATGGTA ACAGTTCTT
 3241 GAAGTTGGAG AACACATTC TGAGGGTAGG AGTCGAATAT TAAGTAATCC TGACTCAATT
 3301 AGCCACTGTT TTGAATCCAC ATACTCCAAT ACTCCTGAAA TAGTTCATTA TGGACAGCGC
 3361 AGAAGAGCTG GGGAGAAATTA ATTCTAATC ATGGICATAG CTGTTTCCTG TGTGAAATTG
 3421 TTATCCGCTC ACAAATCCAC ACAACATACG AGCCGGGAAG ATAAAGTGTA AAGCTTGGGG
 3481 TGCTAATGA GTGAGCTAAC TCACATTAAT TCGGTTGCGC TCACTGCCCG CTTTCCAGTC
 3541 GGGAAACCTG TCGTGCCAGC TGCATTAATG AATCGGCCAA CGCGCGGGGA GAGGCGGTTT
 3601 GCGTATTGGG CGCTCTTCCG CTTCTCGCT CACTGACTCG CTGCGCTCGG TCGTTCGGCT
 3661 GCGGCGAGCG GTATCAGCTC ACTCAAAGC GGTAATACGG TTATCCACAG AATCAGGGGA
 3721 TAACGCAGGA AAGAACATGT GAGCAAAAGG CCAGCAAAAG GCCAGGAACC GTAAAAAGGC
 3781 CGCGTTGCTG GCGTTTTTCC ATAGGCTCCG CCCCCTGAC GAGCATCACA AAAATCGACG
 3841 CTCAAGTCAG AGGTGGCGAA ACCCGACAGG ACTATAAAGA TACCAGGCGT TTCCCCTTGG
 3901 AAGTCCCTC GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC CTTGCGGCTT ACCGGATACC TGTCGCCTT
 3961 TICCCCTTCG GGAAGCGTGG CGTITCTCA TAGTTCACGC TGTAGGTATC TCAGTTCGGT
 4021 GTAGGTCGTT CGTCCAAAGC TGGGCTGTGT GCACGAACCC CCCGTTACAG CCGACCGCTG
 4081 CGCCTTATCC GGTAACATC GTCTTGAGTC CAACCCGGTA AGACACGACT TATCGCCACT
 4141 GGCAGCAGCC ACTGGTAACA GGATTAGCAG AGCGAGGTAT GTAGGCGGTG CTACAGAGTT
 4201 CTTGAAGTGG TGGCCTAACT ACGGCTACAG TAGAAGGACA GIATTTGGTA TCTGCGCTCT
 4261 GCTGAAGCCA GTTACCTTCG GAAAAAGAGT TGGTAGCTCT TGATCCGGCA AACAAACCAC
 4321 CGCTGGIAGC GGTGGTTTTT TTGTTTCAA GCAGCAGATT ACGCGCAGAA AAAAAGGATC
 4381 TCAAGAAGAT CCTTTGATCT TTTCTACGGG GTCTGACGCT CAGTGAACG AAAACTCACG
 4441 TTAAGGGATT TTGGTCATGA GATTATCAA AAGGATCTTC ACCTAGATCC TTTTAAATTA
 4501 AAAATGAAGT TTTAAATCAA TCTAAAGTAT ATATGAGTAA ACTTGGTCTG ACAGTTACCA
 4561 ATGCTTAATC AGTGAGGCAC CTATCTCAGC GATCTGTCTA TTTCGTTTAT CCATAGTTGC
 4621 CTGACTCCCC GTCGTGTAGA TAACTACGAT ACGGGAGGGC TTACCAICTG GCCCCAGTGC

4681 TGCAATGATA CCGCGAGACC CACGCTCACC GGCTCCAGAT TTATCAGCAA TAAACCAGCC
4741 AGCCGGAAGG GCCGAGCGCA GAAGTGGTCC TGCAACTTTA TCCGCCTCCA TCCAGTCTAT
4801 TAATTGTTGC CGGGAAGCTA GAGTAAGTAG TTCGCCAGTT AATAGTTTGC GCAACGTTGT
4861 TGCCATTGCT ACAGGCATCG TGGTGTACG CTCGTGTTTT GGTATGGCTT CATTACGTC
4921 CGGTTCCTCAA CGATCAAGGC GAGTTACATG ATCCCCATG TTGTGCAAAA AAGCGTTAG
4981 CTCCTTCGGT CCTCCGATCG TTGTGAGAAG TAAGTTGGCC GCAGTGTAT CACTCATGGT
5041 TATGGCAGCA CTGCATAATT CTCTACTGT CATGCCATCC GTAAGATGCT TTCTGTGAC
5101 TGGTGAGTAC TCAACCAAGT CATTCTGAGA ATAGTGTATG CGGCGACCGA GTTGTCTTTG
5161 CCCGGCGTCA ATACGGGATA ATACCGGCC ACATAGCAGA ACTTTAAAAG TGCTCATCAI
5221 TGGAAAACGT TCTTCGGGGC GAAAACCTC AAGGATCTTA CCGCTGTTGA GATCCAGTTC
5281 GATGTAACCC ACTCGTGCAC CCAACTGATC TTCAGCATCT TTTACTTTCA CCAGCGTTTT
5341 TGGGTGAGCA AAAACAGGAA GGCAAAATGC CGCAAAAAG GGAATAAGGG CGACACGGAA
5401 ATGTTGAATA CTCATACTCT TCCTTTTTCA ATATTATTGA AGCATTATC AGGGTTATTG
5461 TCTCATGAGC GGATACATAT TTGAATGTAT TTAGAAAAAT AAACAAATAG GGGTTCGCG
5521 CACATTTCCC CGAAAAGTGC CACCTGACGT CTAAGAAACC ATTATTATCA TGACATTAAC
5581 CTATAAAAAT AGGCGTATCA CGAGGCCCTT TCGTCTCGCG CGTTTCGGTG ATGACGGTGA
5641 AAACCTCTGA CACATGCAGC TCCCGGAGAC GGTACAGCT TGCTGTAAAG CGGATGCCGG
5701 GAGCAGACAA GCCCGTCAGG GCGCGTCAGG GGTGTGGC GGTGTGGC GCTGGCTTAA
5761 CTATGCGCAA TCAGAGCAGA TTGTACTGAG AGTGCACCAT ATGCGGTGTG AAATACCGCA
5821 CAGATGCGTA AGGAGAAAAT ACCGCATCAG GCGCCATTCC CCATTCAGGC TGCGCAACTG
5881 TTGGGAAGGG CGATCGGTGC GGGCCTCTTC GCTATTACGC CAGCTGGCGA AAGGGGGATG
5941 TGCTGCAAGG CGATTAAGTT GGGTAACGCC AGGGTTTTCC CAGTCACGAC GTTGTA AAC
6001 GACGGCGCAA GGAATGGTGC ATGCAAGGAG ATGGCGCCA ACAGTCCCC GGCACGGGG
6061 CCTGCCACCA TACCCAGGCC GAAACAAGCG CTCATGAGCC CGAAGTGGCG AGCCCCATCT
6121 TCCCATCGG IGATGTCGGC GATATAGGCG CCAGCAACCG CACCTGTGGC GCCGGTGATG
6181 CCGGCCACGA TGCTCCGGC GTAGAGGCGA TTAGTCCAAT TTGTTAAAGA CAGGATATCA
6241 GTGTCCAGC CTCTAGTTT TACTCAACA TATCACCAG TGAAGCCTAT AGAGTACGAG
6301 CCATAGATAA AATAAAGAT TTTATTTAGT CTCAGAAAA AGGGGGGAA

pSBT/SV40-GFIP.loxP, secuencia

Repeticiones invertidas SB
Promotor SV40
Codón de iniciación
Sitio FRT
eGFP
Puro

tcgctggttcgggtgatgacgggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacgggtcacagcttctgtgaagcggat
gccggggagcagacaagcccgtcagggcggctcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggcttaactatgcccgcac
gagcagattgtactgagagtcaccatattcgggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcacagg
cgccattcgccattcaggctgcgcaactgttgggaagggcgtatcggtgctgggctcttcgctattacgccagctggcgaa
agggggatgtctgcaagggcattaaagtgggtaacgccaggggtttcccagtcacgacgttgtaaacgacggccagt
gaattcgactcggtaacctcagttcaagtcgggaagttaatacacttaagttggagtcattaatactcgttttaactac
tcacaaattctgttaacaaacaaatagtttggcaagtcagttaggacatctacttggcagtcacaaagtcattttcaaa
caattgtttacagacagattattccttaataatcactgacacaaatccagctggcagaagtttaacataacactaagttgact
tgcccttaaacagcttggaaaattccagaaaatgatgtcatggccttagaagcttctgatagactaattgacatcattgagt
caattggagggttacctgtggatgtattcaagggaaattctgtggaatgtgtgtcagttagggtgtggaagtcgccaggctc
cccaggcaggcagaagtatgcaaacatcaggatgtacggggcagatataccgataaacttcgtataatgtatgctat
accgaagtatcgcgtgaggtttaccgctcatcaccgaaacggcggagggttccttggaaatgcttcaattggccttgg
aaagttcccagcttcccagcaggtcaaggtatcacaagcagatcacaatggcctcaatggcctcaatggcctcaatggc
cccagcttcccagcaggtcaaggtatcacaagcagatcacaatggcctcaatggcctcaatggcctcaatggcctcaatgg
cccagcttcccagcaggtcaaggtatcacaagcagatcacaatggcctcaatggcctcaatggcctcaatggcctcaatgg
cccagcttcccagcaggtcaaggtatcacaagcagatcacaatggcctcaatggcctcaatggcctcaatggcctcaatgg
taccatggagaagttactatccgaa

gttcctattctctagaaagtataggaacttcaagcttggcactgggtgagcaagggcgaggagctgtaccggggtgtg
ccatctctggtcgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgaggcgatgccac
ctacggcaagctgacctgaagttcaltctgaccaccggcaagctgcccgtgcccggcccaccctcgtgaccacctg
acctacggcgtgacgtgtcagccgtaccaccgaccacatgaagcagcagcacttctcaagtcggccatgccgaag
gtctacgtccaggagcgcaccatcttctcaaggacgacggcaactacaagaccggcgccgagggtgaagttcgagggc
gacaccctggggaaccgatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatctctggggcacaagctgg
agtacaactacaacagccacaacgtctataatcattggccgacaagcagaagacggcaltcaaggtgaacttcaagatc
cgccacaacatcgaggagggcagcgtgacgtcggcggaccactaccagcagaacacccccatcggcgacggcccc
gtgctgctgcccagacaaccactactgagcaccagtcggccctgagcaagacccccaacgagaagcggcgtacacat
ggfctctgtggagtctgtgacggcgccgggacactctggccatggacgagctgtacaagtaagcggcgccggcca
attgggcccaccggtgctagccccctaacgttactggccgaagccgctlgaalaagccgggtgtgctgtatgtat
ttccaccatattgcccgtctttggcaatgtgagggcccggaacctggccctgcttctgacgagcattctagggtctttc
ccctctcgcaaaaggaatgcaaggtctgtgaatgctgtgaaggaagcagttcctctggaagcttctgaagacaacaa
cgtctgtagcgacccttgcaggcagcggaaacccccaccctggcgacaggtgcctctgcccgaaaagccacgtgat
aagatacacctgcaaaaggcggcacaaccccagtgccacgtgtgagttggatgtgtggaagagtcaaatggctctc
cctaagcgttatacaaaaggggtgaaggtgcccagaaggtaccctattgtatgggatctgatctggggccctgggtc
acatgctttacatgtgttttagtcgaggttaaaaacgtctagcccccccgaaaccacggggagctgtgttcttgaaaaac
acgataataaccatgaccgagtacaagcccacgggtggccctggccaccggcgacgagctccccggggcgtaccgac
cctcggcgccgggtgctggcgaactaccggcaccggccacacccgtctgaccggaccacatcgagcgggtcaccg
agctgcaagaactctctcagcggcggcggcctgacatcgcaaggtgtgggtggcggcagcagcggcgccggggtg
gcccgtctggaccagcgggagagcgtcgaagcggggggcgggtgtggcggagatggcccgccatggccgagttga
cgggttccccggctggccgacagcaacagatggaagggcctctggccggcaccggcccaaggagccccgctggtt
ctggccaccgtggcgtctggccgaccaccagggcaagggctggccagcggcgtgtgtctccccggagttggagg
ggccggagcggcgggggtgcccggcctctggagacctccggcccggcaacctccccctctacgagcggctggctt
caccgicaccggccgagctgaggtggccgaaggaccggcaccctgggtgcaagaccgcaagcccgggtgctgacgc
ccgcccacaagaccgagcggccggaccgaaaggagcgcacgaccctatgcatgaatcgatctgcccggccgga
ctctagatcataatcagcccgggggtgatcagcctgactgtcttctagtggccagccatctgttgttcccctccccgt
gccitcttgaccctggaaggtgccactcccactgtcttctctaataaaatgaggaaattgcatcgcatgtctgagtaggt
gtcattctattctggggggtgggggtggggcaggacagcaagggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggg
gatgcgggtgggctctatggaaccagctggggctgcacattctagtgtgtgttgcacaaactcatcaatgtatctatct
ggatcccatcacaagctctgaccicaatctatagaaaggaggaatgagccaaaatcaccacaactattgtgggaag
ctgtggaaggctactcgaatgtttgacccaagttaaacaatttaaaggcaatgctaccaataactaattgagttatgtta
actctgaccctctgggaatgtgataaaagaaataaaagcgtgaaatgaatcattctctactatttctgatacttcaatc
taaaaataaagtggtgaltactgacttaagacagggaaatcttactgggallaatgtcaggaalgtgaaaaagtgga
gtttaaattgatttccctaaaggtgtatgtaaacctccgactcaactglaaggatcctctagagtcgacctgcaggcatgca
gcttggcgtaatcatggtcatagctgttccctgtgtgaaattgtatccgctcacaattccacacaacatacagagccggaagc
ataaagttaaagcctgggggtgccaatgatgagtgagctaacacattaattgcggtgcccactgcccgttccagctgg
gaaacctgctgcccagctgcattaatgaatggcccaacggcgccgggagagggcgggttgcgtattgggcgctctccgctt
cccagctactgactcgtcggctggctggctgcccggcagcggatcagctactcaaggcggtaatacgggtat
ctacgaaatcagctgacgataacgcaggaagaaatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaa
ggccgctgtgctggcgtttttccataggctccgccccctgacgagcatcaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggc
gaaaccggacaggactataaagataaccagcgcttccccctggaagctcccctgctgctctcctgttccgacctggc
cttaccggatacctgcccgttctccctcgggaagcgtggcgttctcaatgctcacgctgtaggtatctcagttcgggtg
aggctgtcgtccaaagctgggctgtgtgcacgaacccccgttcagcccaccgctgcccctatccggtaactatcgtct
tgagtcaacccggtaagacacgactatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcaggtatgt
agggcgtgctacagagttctgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagatttggatctgcccctgctg
aagccagttaccctcggaaaagagttgtagctcttggatccggcaaaacacaccggctgtagcgggtgtttttgtttg
caagcagcagattacggcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacggggtctgacgctcagtgga
acgaaaactacgttaagggatthttgctatgagattataaaaaggatctcacctagatccttttaataaaaaatgaagt
tttaaatcaatcaaaagtataatgagtaaaacttggtctgacagttaccaatgcttaaatcagtgaggcacctatctcagc
gtctatttctcattcagttgctgactccccgtctgtgtagataactcagatagggagggttaccatctggccccag
gctgcaatgataccggagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaacagccagccgggaaggccga
gcccagaagtggtcctgcaactttatccgctccatccagcttattaattgttggccggaagctagagtaagtagttccca

gtaaatagtttgcgcaacgtgtgtgccaattgctacaggcactggtgtcagcctcgtgttggatggctcattcagctcgg
ttcccaacgatcaaggcagttacatgatccccatgtttgcaaaaagcgggttagctcctcggctcctccgatcgtgtc
agaagtaagttggcgcagttatcactcatggttatggcagcactgcataattctctactgcatccatccgtaagatg
ctttctgtgactggtgagtaactcaaccaagctctctgagaatagttatgcccggaccgagttgctcttggccggcgtcaat
acgggataataaccggccacatagcagaacttaaaagtgctcatattggaaaacgttcttggggcgcaaaactctca
aggaacttaccgctgttgatccagttgatgaaccacacgtgcaaccaactgatcttcagcatctttactttaccagc
gtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgcccgaaaaaagggaataagggcgacagggaaatgtgaatac
tcaactcttctttcaatattgaagcattatcaggggtattgtctatgagcggatataatgtatgtattagaaaaat
aaacaaataggggtccgacatttccccgaaaagtgccaccctgacgtctaagaaaccattattatcatgacattaac
ctataaaaataggggtatcaccagggcccttctg

agcttgccacaaccatgaccgagiacaaagcccacgggtgcgcctcggccaccccgagcagctcccggggccgctacg
caccctcggccggcggttcggccgaactacccccgccacggccacacccgtcgatccggaccgccaacatcgagccgggca
ccgagctgcaagaactctcctcaccggcgtcgggctcgacatcggcaagggtggtggtcgggacgacggcgccgg
gtggcggctcggaccacggcggagagcgtcgaagcgggggggggtgtcggccgagatcggccggcgcctggccgagtt
gagcgggtcccggtcggcggcgcagcaacagatggaaggcctcctggcggccgacccggccaaggagcccgctg
gttccctggccaaccgctcggcgtcctcccccaccaccagggcaagggtcgggacgccggctcgtcctccggagtgga
ggcggccgagcggcgggggggtgcccggcttcctggagacctccggcggccgcaacctcccctctacgagcggctcgg
cttcacccgtcaccggcagctcggaggtggccggaaggaccggcaccctgggtgatgacccggcaagccgggtgctgaa
gatccccgggggatcagcctcgactgctccttctagtggccagccatctgttgttggccctcccccgctccttacc
tggagggtgccactcccactgctccttctcaataaaaatgaggaaattgcatcgacattgctctgagtaggtgtcattctatctgg
gggggtgggtggggcaggacagcaagggggaggattggaagacaatagcaggcatgctggggatgctgggtgggct
ctatggaaccagctggggctcgacattctagtgtggtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgctggatcccatca
aagctctgacctcaatcctatagaaggaggaatgagccaaaattcaccaacttattgloggaactgtggaaggctca
ctcgaatgtttgacccaagttaaacaattaaagccaatctaccaaataactaattgactgtatgtaactctgaccact
gggaatgtagaagaagaaataaagctgaaatgaatcctcctcctactatctcctgattcaccatctcaataaagtg
gtgctcctcactgacctaagcagggaatcttactcggatcaatctcagggaattgaaagagtgagttaaatgattt
gctaagggtatgtaactcggactcaactgaggatcctctagagctgacctgcaggcatgcaagctggcgtaatc
atggtcatagctgttccgtgtgaaattgtatccgctcacaattccacacacaacatacagcggcgggaagcataaagtgtaa
gctcgggtgctcaatgagtgagctaacctacattaattcggtgctcactgcccgttccagctgggaaacctgctg
gccagctgcatatgaatcggccaacgcgggggagaggcgtttgctgattggcgctcttccgcttctcgtcactg
actcgtcgcctcggctcgttccgctcggcgagcggatcagctcactcaaaaggcggtaatacgggtatccacagaatca
ggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccggttgct
ggcgttttccataggtcggccccctgacgagcacaacaaatcgacgctcaagtcagagggtggcgaaccggc
aggactataaagatacaggcgggttccccctggaagctccctcgtgctcctcgttccgacctcggcttaccggatac
ctgcccgttctccctcgggaagcgtggcgttctcaatctcagcgtgtaggtatctcagctcgggtgtaggtcgtcgtc
caagctgggtgctgacgaacccccgtcagccgaccgctgctccttaccgtaactatcgtctgagccaacc
ggtagacacgactatcggcactggcagcagccactggaacaggattagcagagcagggtatgtagggcgtgctac
agagttctgaagtggtggcctaactacggctacactagaaggacagatttggatctcgtcgtgtaggaccagttacc
ttcggaaaaagagttgtagctctgatccggcaacaaaccaccgctgtagcgggtggttttttggatgcaagcagcaga
ttacggcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttaccggggtgacgctcagtggaacgaaaactca
cgttaagggtttggtcagatgattcaaaaaggatctcactagatccttttaataaaaatgaagtttaaatcaatct
aaagtataatgagtaaaactggtcagagttaccaatgcttaacagtgaggcactatctcagcagatctctattctg
atccatagttgctgactccccgtgtagataactcagatacgggagggttaccatctggccccagtgctgcaatgat
accgcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaaggccgagcgcagaagt
ggtcctgcaactttaccgctccatccagcttattaattgttccgggaagctagagtaagtagttcccggttaatagttg
gcaacgittgtgcaattgctacaggcatcgtggtgacgctcgtcgttggatggcttattcagctccgggtcccaacgat
caaggcaggtatcatgatccccatgttggcaaaaaagcgggttagctcctcggctcctccgatcgttgcagaagtaagt
ggccgcagtgattactatggttatggcagcactgcataattcttactgtcagccatccgtaagatgcttttctgactg
gtgagfctcaaccaagctattctgagaatagtgatgcccggaccgagttgctctggccggcgtcaatacgggataata
ccgcccacatagcagaactttaaagtgctcatcattggaaaacgttctcggggcgaactctcaaggatcttaccg
ctgtgagatccagttcagtaaccactcgtgcaccaactgatctcagcatctttacttaccagcgttctgggtgag
caaaaacaggaaggcaaaaatgccgcaaaaagggaataaggcgacacggaaatgtgaatactcactctccttt
ttcaatattatgaagcattatcagggattatgtctatgagcggatacatattgaaatgattagaaaaataacaaatagg
ggttccggcacattccccgaaaagtgccacctgacgctcaagaaaccattatcatgacattaacctataaaaatag
cggtatcacgaggcccttctc

pSBT/SV40-GFIP, secuencia

Repeticiones invertidas SB
Promotor SV40
Codón de iniciación


```

cagggaalcttactcggatlaaaagtcaggaaatgtgaaaaagtgagttaaatgttttggctagggtgatglaaacctcc
gacttcaactgtagggatcctctagagtcgacctgcaggcatgcaagcttggcgtaatcatggcatagctgttccctgtgtg
aaatgttatccgctcacaattccacacaacatacgagccggaagcatalaaagtgtaaagcctgggggtcctaatagagtg
agtaactcacattaatggcttgcctcactgccgcttccagtcgggaaacctgtctgtccagctgcattaatgaatcg
gccaacgcggggagagggcgtttgctattggcgctctccgcttccctcgtcactgactcgtcgcctggctgttccg
gctgcgggcagcggatagctcacicaaaggcggtaatacgggtatccacagaatacggggataacgcaggaaaga
acaigtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaacctgaaaaaggccgctgtctggcgtttttccataggctccgcc
ccccgacgagcatcacaanaatcgagcctcaagtcagaggtggcgaaacctgacaggactataaagataaccaggc
gttccccctggaagctcctcgtcgcctcctgttccgacctgcccgttaccggataacctgtccgcctttccctcggga
agcgtggcgcttctcaatgtctacgctgtaggatctcagttcgggtgtaggtcgttccgctccaagctgggctgtgtgcacga
acccccgttccagcccagccgctgccccttatccggtaactatcgtctgagtcgaacctggtaagacacgacttatcgcc
actggcagcagccactggtaacaggattagcagagcagggatgttagggcgtctacagagttctgaagtggtggcct
aactacggctacactagaaggacagatttggatctgcgctcgtcgaagccagttacctcggaaaaagagttggtagc
tcttgatccggcaaaacaccaccgctggtagcgggtgggtttttgttcaagcagcagattacgcgcagaaaaaagg
atcctaagaagatcctttgatctttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggatlttggatga
gattaacaaaaggatctcacctagatccttttaaatataaaatgaagtttaaatcaatctaaagtatatatgagtaaactg
gtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcagctgtctatcttctcatccatagttgcctgactcccc
gtcgtgtgataactcagatacgggagggctaccatctggccccagtgctgcaatgataaccgagaccaccagctcac
cggctccagattatcagcaataaacagccagccggaaggccgagcgcagaagtggtcctgcaactttatccgctc
catccagctataaattgttccgggaagctagagtaagtagttccgcaagtaaatgtttgcgaacctgttgcattgtctac
aggcatcgtgggtgcacgctcgtctgttggatggctcattcagctccggttccaacgatcaaggcgagttacatgatccc
cctatgttgcaaaaaagcgggttagctcctcggctcctccgatcgtgtgcagaagtaagttggcccgagtgattacactcatg
gttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgcttctgtgactgggtgagtactcaaccaagtcatt
ctgagaatagtgtatgcccgcaccgagttgctcttggccgctcaatacgggataataaccgcccacatagcagaactt
taaaagtctcatcattggaaaacgcttctcggggcgaaaactcgaaggatcttaccgctgttgagatccagttcagatga
accactcgtgcaccaactgatctcagcacttttaccctaccagcgttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaa
tggcgcaaaaagggaataaggggcagacggaaatgttgaatactatactctccttttcaatattatgaagcatttacc
agggtattgtctatgagcggatacatattgaaatgtattgaaaaataaacaataaggggtccgcgcacatttccccg
aaaagtccacctgacgctaaagaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgtatcacgagcccttccg
tc
    
```

pSBT/SV40-GFIP.loxP, secuencia

Repeticiones invertidas SB
 Promotor SV40
 Codón de iniciación
 Sitio FRT
 eGFP
 Puro

```

tcgcccgttccggtgatgacgggtgaaaacctctgacacatgcagctccccggagacgggtcacagctgtctgtaagcggat
gcccgggagcagacaagcccgtcagggcgctcagcgggtgttggcgggtgtcggggctggcctaactatgcggcatca
gagcagattgtactgagagtgaccatagtcgggtgtgaaataccgcacagatgctgtaaggagaaaaatccgcatcagg
cgccattcgcattcaggctcgcgaactgttgggaaggggcagatcgggtcggggccttctcgtattacggccagctggcgaa
agggggatgtctgcaaggcgalttaagttgggtaacgccagggtttccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagt
gaattcagcctcggatccctcagcttgaagtcgggaagttacatcaccttaagttggagtcataaaactcgtttcaactac
tcccacaaattctgttaeaaacaaatgttggcaagtcagttggacattcactttgtcagacacaagtcattttccaa
caatgtttacagacagatattcacttalaattcagctatcacaattcagttgggtcagaagttacatacacfaagttgact
gtgccttaaacagcttggaaaatccagaaaatgatgcatggcittagaagcttctgatagactaaatgacatcattgagt
caattggagggtaccctgtggaigtattcaagggaaattctgtggaatgtgtcagttaggggtggaaggtccccaggctc
cccaggcaggcagaagatgcaaaagcatcgaggatgacgggagatatacgcgataacttcgtataatataatctat
acgaagttatcggcgtgaggtttcaccgtcatcaccgaaacgcgcgagg
    
```

aaagtcaccaggctcccagcaggcagaagratgcaagaalgcatacaallagiacqcaaccagggtggaaagtc
cccaggctcccagcagccagaagratgcaaaagcagatgcatacaallagiacagcaaccaagtcaccgcccactaaccc
gcccaccccggcccaactccgcccagtcgcccacatcccccagtgactaattttttatllalgcagagggcga
ggccgctcggccctagctatccagagtaglgaggggtttttggaggelaccatggagaagttactatccgaa
gttcctatctctagaaagrataggaactcaagcttggcactggtagcaagggcaggagctgtcaccgggggtgtgc
ccatcctggctgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgagggcgagggcgatgccac
ctacggcaagctgaccctgaagttcatctgcaccaccggcaagctgcccgtgcccggccaccctcgtgaccaccctg
acctacggcgtgacgtgttcagccgctacccccaccacatgaagcagcagcactctcaagtcggccatgcccgaag
gctacgtccaggagcaccatcttctcaaggacgagcgaactacaagaccggcggcagggtgaagttcaggggc
gacacccctggtagaccgcatcagctgaaggccatcagctcaaggaagcaggcaacatcctggggcacaagctgg
agtaacaactacaacagccacaacgtctatcatggccgacaagcagaagaacggcatcaagggtgaactcaagatc
cgccacaacatcgaggagcggcagctgtcagctgcggaccactaccagcagaacaccccccagggcagggcccc
gtgctgtgcccgcacaaccactacctgagcaccagtcggcccagcaaaagaccccacagagaagcggatcacat
ggctcctgctggagttcgtgaccggcgccgggatcactctggcatggacgagctgtacaagtaaacggccgcccga
attggggccaccgggtgtagcccccaactgtactggccgaagccgctggaaalaaggccgggtgtcgtttgtctatggtat
ttccaccatattggcctttttggcaatgtgagggcccggaaaccctggcctgtctcttgacgagcattctaggggtcttc
ccctcgcgcaaaaggaatgcaaggtctgtgaatgctggaaggaagcagttcctctggaagcttctgaagacaacaa
cgtctgtagcagccctttgaggcagcggaacccccactggcgacaggtgcccctcgcggccaacaaaggccagtgtat
aagatacacctgcaaaaggcggcacaacccccagtgccagctgtgagttggaatagttgtggaagagtcaaatggctctc
ctcaagcgtattcaacaagggggcgaaggatgccagaaggtaccatgtatgggatctgatctggggcctcggtgc
acatgctttacatgtttagtcgaggttaaaaaacgtctaggcccccgaaaccagggggacgtggttttctttgaaaac
acgataataccatgaccgagtagaacccccagctgcccacccggcagcagctccccggggcggtagccac
ccctcggcgccggttgcggactaccocggccacggccacaccgltcgalccggaccggccacatcgagcgggtcacgg
agctgcaagaactctctcaccgctgctggctcgacatcggcaaggtgtgggtcgggacgacggcggcggggtg
ggcctctggaccacgcccggagagctcgaagcggggggcgggtgttccggcgagatccggccccggcagggccagttga
ggcgtttccgggtggcggcagcaacagatggaaaggcctctggcgccgcaccggccccaggagcccggtggttt
ccctggccaccgtggcgctcggccgaccaccagggcaagggctcgggcaggcggctgtcctcccggagtgaggg
cggccgagcggcggggggccggccttctggagactcggcggccggcaacctcccctctacgagggctggctt
caccgtcaccggcagctgaggtgcccgaaggaccggcgacctggtagatgaccggcaagcccgggtgcctgagcgc
ccgccacaagaccggcagcggccgaccgaaaggagcgcacgcccccagatcgaatcgatcggcgccggcga
ctctatgataatacagccgggggtgtagcctcagctgtgcttctagttgccagccactgtttttggcccctccccctg
gccttcttgaccctggaaggtgacactcccactgtccttcaataaaatgaggaattgcacgctgctgtgaggtg
gtcattctattctgggggtggggggggcaggacgcaagggggaggtgggaagacaatagcaggcatgctggg
gatgcggtgggctctatggaaccagctggggcggcattaactctgtataaagctctctatacgaagtatcggccattct
gttgggtttgtccaaactatcaatgtatctatcatgtctggatcccatcacaagctctgacctcaatctatagaagga
ggaatgagccaaaattaccaacttattgtgggaagcttgggaaggctactcgaatgtttgaccaagttaaacaatt
aaaggcaatgctaccaataactaattgagttgatgttaactctgaccacatgggaatgtgaaagaaataaaaggctg
aaatgaatcattctctactattatctgatattcacaactctaaatgaaggtgtgactaacctgaccoltaagacagggaa
ctttactggatfaatgtcaggcaattgtgaaagagtgattaaatglatggcgaaggtgtagtaactccgactcaac
gttagggatcctctagagtcgacctgagggcatgcaagcttggcgtatcatggatagctgtttcctgtgtaaattgttat
ccgtcacaaattcacacaacatacagcgggaagcataaagttaaaaggcctggggtgcctaatgagtgagctaactc
acattaattgctgtcactgcccgtttccagtcgggaaacctgctgtgccagctgcattatgaatcgcccaacggc
cggggagaggcggtttgcgtattggcgctctccgctcctcgtcactgactcgtcgtcgtcgtcgttccgctggggc
agcgtatcagctcactcaaaaggcggtaatacggttatccacagaatcaggggataacgcagggaagaacatgtgag
caaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgctgtcggcgttttccataggctccgccccctgacg
agcatcacaanaatcgagcctcaagtcagaggtggcgaaaccggacaggactataaagataaccaggcggttccccc
ggaagctcccctgtgctcctctcgttccgacctggccttaccggataccgtcggcctttcctccctgggaagcgtggc
gctttctcaatgctcagcgttaggtatctcagttcgggttaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgt
tcagcccagcgtcggccttaccggtaactatgctttagtccaaccggtaagacacgacttatgccactggcag
cagccactggtaacaggattagcagagcaggtatgtaggcgggtctacagagttctgaagtggtggcctaactacgg
ctacactagaaggacagtttggatctctgcctctgtgaagccagttaccttcggaaaagagttggtagctctgatcc
ggcaaaacaaccaccgctggtagcgggtgggtttttgtttgcaagcagcagattaccggcagaaaaaaaggatctcaag
aagaicctttgatcttctaccggggtctgacgctcagttgaacgaaaactcacgttaagggatttggctatgagattca

ccigtgtgcccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcgggttgcgtattgggcgctctccgcttctc
gctcactgactcgcctgctcggctcgttcggctcggcgagcgggtatcagcicactcaaaggcggtaatacgggtatccac
agaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggcc
gctgtgctggcgttttccataggtcctcggccccctgacgagcatcacaataatcagcgtcaagtcagagggtggcgaa
accogacaggactataaagataaccagggcttccccctggaagctccctcgtgctcctcgttccgaccctgcccctta
ccggataacctgicccgcttctccctcgggaagcgtggcgcttctcaatgctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggt
cgttgcctcaagctgggctgtgtgcacgaacccccctcagccogaccgctgocctatccggtaactatcgtctgag
tccaaccoggaagacacgactatcggcactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgagggtatgtaggc
gggtctacagagttcttgaagtgggtggcctaactacggctacactagaaggacaglatttggatctcgcgctcgtgaagc
cagttacctcggaaaaagagttggtagctctgaicgggcaaaaccaccgcggtagcgggtggtttttgittgcaag
cagcagattacgocgagaaaaaaggatctcaagaagatcctttagcttttctacggggtcagcgtcagtggaacga
aaactcacgttaagggatttggctatgagattcaaaaaggatctcacctagatcctttaaataaaaatgaagtttaa
atcaatctaagatataatagataaacttggctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgtctgtct
atttgcctatccatagttgctgactccccctgctgtagataactacgatacgggaggcctaccatctggccccagtgctg
caatgataccgcgagaccacgctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagccggaagggccogagcg
cagaagtgctcgaacttaccgctccatccagctalttaattgtgcccgggaagctagagtaagtagttcggcagttc
atagttgocgaacgttgttgcattgctacaggcatcgtggtgacagctcgtcgtttggtaiggctcattcagctccggttc
caacgatcaaggcgagtiacatgatccccatgtgtgcaaaaaagcggtagctcctcggctcctccgatcgtgtgcaga
agtaagttggccgaggttactcactcatggtatggcagcactgcataaattccttactgcatgccatccgtaagatgctttc
tgtactggtgagactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgctggcgaccgagttgctcttggccggcgtcaatcag
ggataataccgcgccacatagcagaactttaaagtgctcatatggaaaacgttcttggggcgaaaaacttcaagg
atcttaccgctgtgagatccagttgatgtaacccacictgctgacccaactgatcttcagcatcttttacttaccagcgttc
tgggtgagcaaaaaacaggaaggcaaaatgccgcaaaaaaggggaataagggcgacacggaaatgtgaatactcat
actctcttttcaataattatgaagcattatcaggggtattgtctcatgagcggatacataattgaaatgatttagaaaaataaa
caaataggggtccgcgcacatttccccgaaaagtgccaccctgacgctcaagaaaccattattatcatgacattaacctat
aaaaataggcgtatcacagggcccttctgct

Repetición invertida izquierda

hAAT-promotor alfa-antitripsina humana
PCSK9-Secuencia codificante de proproteína convertas subtilisin/kexin tipo 9 (PCSK9)
con etiqueta FLAG en terminal C
BGH pA-zona poliA de la hormona de crecimiento bovino
PGK-promotor fosfoglicerato quinasa
Puro-secuencia codificante para puromicin-N-acetil-transferas (PAC)
Repetición invertida derecha

pSBT/cHS4.Htp.PGK.puro.U6p.cHS4, secuencia
Repeticiones invertidas SB
Aislador cHS4
Promotor H1 con ligador (orientación inversa)
Promotor PGK
Puro ORF
Promotor U6 con ligador

tcgctggttccggtgatgacgggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacgggtcacagcttctgtaagcggat
gccgggagcagacaagcccctcagggcgcctcagcgggtgttggcgggtgctggggctggcttaactatgcggcatca
gagcagattgactgagagtgacacatgctgggtgtgaaataccgcacagatgctgtaaggagaaaataccgcatcagg
cgccattcggcattcaggctcgcgaactgttgggaagggcagatcgggtcggggcctctcgtattacgccagctggcgaa
agggggatgtctgcaaggcattatagttgggtaacgccaggggttccagctcagcagctttaaacgacggccagt
gaattcagctcggtagccctatgctgacatggaagttcactaacctgagttgagctttaaactcgtttcactca

iccacaaalifcflgltzacaacaaalagtlifggcaagcagflgggacatctactiflgtgcaifgacacaagtcalfittccaa
caaltglttacagacagaltatitcaclitafatitcacltcaacaaifccaglgggfcagaaqflfacatacaactaaigtgact
gigccflltaaacagctlggaaaatccagaaaatgaltgcatggctllagaagcttctgatagactaaltgacatcatttgagt
caaltggagggtgactctggatgtattcaagggaaattctgtggaatgtgtgcaqlltagggtgtggaaagccccaggctc
cccaggcaggcagaaatgcaaaagcatgcatactgatactagtgccctccggggacagcccccccccaaggcc
ccagggaifgtaatlacgltcccccggclaggggggcagccagccggccggccggggcccgctccggcccccggcctc
ccccgcctccccgagccggcaggggtgggggacagccggggcaccgggaaggtggccaggggacggggtcccltga
acgcttctcgtgclctllgagccctgcaaacacclgggggggafaccggggaaaagcccltaggclgaaagagagatllag
atgacagaalcatagaaagccclgggllgcaangggccacagltgctatccagatccaaaccccctgctatgctcagggt
catcaaccaggcagccagcglgctcagagccacalcccagccctggccllgaalggctgcagggaifggggcctccacag
ccclctggggcaaccclgtcagltggclaccaccclctgggggcaaaaactggcctccatataccaacccaaaccicccccl
tclagglgaaagccalcccctgtcctalcaagggggaglltggclgacatllggclgggggtgacacatglltggca
atlcagltgcctaccgggagggccagatllgggataaggaaggtgcaggccagcatggacgtgggacatccagggtgtg
agggcctctggpacactlcccaagltcagccgtlccagaaagcccttaagggataagaggalaggaaggggacaagga
gcaaghtaaaccccagcatggagaggggcaaaaagggccacagacactgctgggccccgtgtgclgagccclgcalgt
gatgtgtctggatgcaagcagaaggggtgaaagagcttgcctggagagatccagclgggctcagtaggactgggaca
ggcagclgggaaattgcaatgtagatllcalacaalctgcacatcagaaaggtcggaaagccclccaagatcccga
ggccaaaccacccaccacccagltggccactggccatggccatggccacatcccacaglttcltccaccccltag
ggaggggtgacccccaccclgggggagcttggccactgcagcaccgclctgggagaggglaaatctgclaaatcc
agcccagcccclcccgggcaaaaglaagggcattatctctcctccaacccaggaagggagcagtgagataatlltaatt
aacclagggtgacaggcgcccaagcttagatctgggtctcatacagaactlataagattcccaaatccaaagacatllc
acgttatgtgtattlcccagaacacatagcagatgcaaaatattgcaggggccaccctccccctgccccacagccatctc
ctgccaggggcagccggcgtgggtgtlcccgcctaglgacactggggcccgcgaltctclggagcgggtgatgacgtca
gcgtlctgaatlltaattaaatctcagacctgaaalctaccgggglagggggagccgcllftcccgaaggcagltgggagca
ggcctllagccggcccccgggcacltggcgtctccacagltggcctctggcctccacacatllccacatcccacgggtlag
cggcaaccgggctccgcltllggggcccccctggccacttccctccctccctccctccctccctccctccctccctccctcc
agclccggclctgcaggacgtgacaalaggaagltgacagclctactagltctggcagatgggacagcaccgclgaggc
aatggaagcgggtaggcctllggggcagccgcccataagcagcltgggctccctgcltctgggctcaagggclgggagg
gggtggctccggggggcgggclcaggggcgggclcagggggggggcgggcccgaaggclcccccggaggccccc
galltggcaagcltcaaaagggcagcgtlcccccggclgtlcccttctctcctcccccggcctllggacctgcacatctag
atctcgagcagctgaagcttaccatgaccgagltacaagcccacggltggcctctggccaccggcagcagclccccgg
ggcgaagcaccctccggcggcgtlccggcactaccggccagccggccacaccgctgatccggaccgcccacatcgga
gggggacaccggagclcaagaactlctccagccgctccgggclctgacatgggcaaggtgtgggtcgccggagcag
gcggccgggtggcggcltggaccacggcgggagagcgtcgaagcgggggggggtgttccggagatcggcccggccl
ggccgagttgaggggtccgggtggcggcggcagcaacagatggaagggcclctggcggcaccggcccaaggag
cccgggtgtlctggccaccggclggcgtctcgccgaccaccagggcaaggggtcgggacggcggclgtctcccc
ggagtgaggggcggccgagcggcgggggtgcccggcttctggagacctccggcccccgaacctccccctctacga
ggggctgggcltaccgltaccggcagcgtcgaggltcccgaaggaccggcaccctggltgcalgaccggcaagccgg
gtgctgacggcccccacaagaccgcagcggccgaccgaaggagcgcacgaccctatgcatgaaatcgatc
cccggccgtctgtagtctgcagaaattgatgatctaltaacaataaagatgtccactaaaatggaagttttctctgca
tacttggtaagaagggtagagaacagagttacctatcttgaatggaaggattggagctacgggggtgggggtgggggtg
gattagataaaltgcltcttactgaaggctcttactattgcttlatgataatgltcatagttggatataataatlaacaag
caaaccaaaattaaggggcagctcaltctcccactcatgatctatagatctatagatctctctgggatcattgttttctctg
attcccactlttgggttctaagtactgtggttccaaatgtgtcagttcatagcctgaagaacgagatcagcagccctgtlcc
acatacacctcattctcagttattgtttgcaagttlaattccatcagaagcgtgtgcagctagcggatccgaccggccat
ctctaggcccggccggcccccctgcacagactlgtgggagaagclgggctacccccctggcccggtaattgcatataa
fattlcttaglaaciatagaggcltaatgtcggataaaagacagataactlgtlctlltaataclagctacattllacatgatag
gcttggattlclataagagatacaataactaaattatlltaaaaacagcacaagaaggaaactcaccctaaactotaaa
glaattgtgtllttagactataaatalcccltgggaaaagcctgtttacggcgtgggcccccaatgggctagcagccac
ggggacagcccccccgaagccccagggaatgtaattacgltccctcccgttagggggcagcagcagcagccggc
ggggclccgtccgclccggcclcccggcaltcccagcggggcagclgtcgggggacagccggggcaggggga
agctccacagggatggatllctllgaaccltccctctctctggagcctccacacccctgggggataagggaaaad
agcltaggtgaagggagcltgaalgaagcagcctccagcaggggtgtllcagaagggaagcgtgcltacc

Referencias

- (1) Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2005;352:1685-1695.
- (2) Mackay J, Mensah GA. The Atlas of Heart Disease and Stroke. WHO and CDC, http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/; 2004.
- 5 (3) Law MR, Wald NJ, Morris JK. The performance of blood pressure and other cardiovascular risk factors as screening tests for ischaemic heart disease and stroke. *J Med Screen.* 2004;11:3-7.
- (4) Chu B, Ferguson MS, Underhill H, Takaya N, Cai J, Klot M, Yuan C, Hatsukami TS. Images in cardiovascular medicine. Detection of carotid atherosclerotic plaque ulceration, calcification, and thrombosis by multicontrast weighted magnetic resonance imaging. *Circulation.* 2005;112:e3-e4.
- 10 (5) Leber AW, Knez A, von ZF, Becker A, Nikolaou K, Paul S, Wintersperger B, Reiser M, Becker CR, Steinbeck G, Boekstegers P. Quantification of obstructive and nonobstructive coronary lesions by 64-slice computed tomography: a comparative study with quantitative coronary angiography and intravascular ultrasound. *J Am Coll Cardiol.* 2005;46:147-154.
- (6) Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science.* 1992;258:468-471.
- 15 (7) Ishibashi S, Goldstein JL, Brown MS, Herz J, Burns DK. Massive xanthomatosis and atherosclerosis in cholesterol-fed low density lipoprotein receptor-negative mice. *J Clin Invest.* 1994;93:1885-1893.
- (8) Holvoet P, Theilmeier G, Shivalkar B, Flameng W, Collen D. LDL hypercholesterolemia is associated with accumulation of oxidized LDL, atherosclerotic plaque growth, and compensatory vessel enlargement in coronary arteries of miniature pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18:415-422.
- 20 (9) Gerrity RG, Natarajan R, Nadler JL, Kimsey T. Diabetes-induced accelerated atherosclerosis in swine. *Diabetes.* 2001;50:1654-1665.
- (10) Panepinto LM, Phillips RW, Wheeler LR, Will DH. The Yucatán miniature pig as a laboratory animal. *Lab Anim Sci.* 1978;28:308-313.
- 25 (11) Hasler-Rapacz J, Ellegren H, Fridolfsson AK, Kirkpatrick B, Kirk S, Andersson L, Rapacz J. Identification of a mutation in the low density lipoprotein receptor gene associated with recessive familial hypercholesterolemia in swine. *Am J Med Genet.* 1998;76:379-386.
- (12) Rapacz J, Hasler-Rapacz J. *Animal Models: The Pig.* En: Lusic AJ, Sparkes RS, eds. *Genetic factors in atherosclerosis: Approaches and model systems.* Karger; 1989. p. 139-69.
- 30 (13) Greeve J, Altkemper I, Dieterich JH, Greten H, Windler E. Apolipoprotein B ARNm editing in 12 different mammalian species: hepatic expression is reflected in low concentrations of apoB-containing plasma lipoproteins. *J Lipid Res.* 1993;34:1367-1383.
- (14) Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein receptors in the liver. Control signals for plasma cholesterol traffic. *J Clin Invest.* 1983;72:743-747.
- 35 (15) Rohlmann A, Gotthardt M, Hammer RE, Herz J. Inducible inactivation of hepatic LRP gene by cre-mediated recombination confirms role of LRP in clearance of chylomicron remnants. *J Clin Invest.* 1998;101:689-695.
- (16) Ramsoondar JJ, Rucker EB, Vasquez JC, Gallagher DS, Grimm DR, Lunney JK, Schook LB, Piedrahita JA. Isolation and genetic characterization of the porcine apolipoprotein E gene. *Anim Genet.* 1998;29:43-47.
- 40 17. Abifadel, M. et al. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet.* 34, 154-156 (2003).
18. Zhang, D. W. et al. Binding of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 to epidermal growth factor-like repeat A of low density lipoprotein receptor decreases receptor recycling and increases degradation. *J. Biol. Chem.* 282, 18602-18612 (2007).
- 45 19. Park, S. W., Moon, Y. A. y Horton, J. D. Post-transcriptional regulation of low density lipoprotein receptor protein by proprotein convertase subtilisin/kexin type 9a in mouse liver. *J. Biol. Chem.* 279, 50630-50638 (2004).

REIVINDICACIONES

1. Un cerdo de tamaño miniatura genéticamente modificado como un modelo para estudiar la aterosclerosis, en el que el modelo de cerdo expresa al menos un fenotipo asociado con la aterosclerosis.
y comprende al menos una mutación en el
- 5 i. gen ApoE endógeno y/o
ii. gen receptor del LDL endógeno,
en la que dicho fenotipo al menos es hipercolesterolemia.
2. El cerdo modificado de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el cerdo de tamaño miniatura se selecciona del grupo constituido por Goettingen, Yucatán, Bama Xiang Zhu, Wuzhishan y Xi Shuang Banna, incluida cualquier
10 combinación de los mismos.
3. Un blastocisto porcino genéticamente modificado derivado del modelo de cerdo genéticamente modificado como se define en la reivindicación 1.
4. Un embrión porcino genéticamente modificado derivado del modelo de cerdo genéticamente modificado como se define en la reivindicación 1.
- 15 5. Un feto porcino genéticamente modificado derivado del modelo de cerdo genéticamente modificado como se define en la reivindicación 1.
6. Una célula y/o núcleo de célula donante porcina genéticamente modificada derivada del modelo de cerdo genéticamente modificado como se define en la reivindicación 1
- 20 7. Un procedimiento para evaluar el efecto de un tratamiento terapéutico de la aterosclerosis, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de
i) proporcionar el modelo de cerdo de acuerdo con la reivindicación 1,
ii) evaluar el efecto observado en dicho modelo de cerdo tratado con una composición farmacéutica.
8. Un procedimiento para cribar la eficacia de una composición farmacéutica, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de
- 25 i) proporcionar el modelo de cerdo de acuerdo con la reivindicación 1,
ii) que expresa en dicho modelo de cerdo dicho determinante genético y que utiliza dicho fenotipo de dicha enfermedad,
iii) evaluar el efecto, si lo hay, en dicho modelo de cerdo tratado con dicha composición farmacéutica.

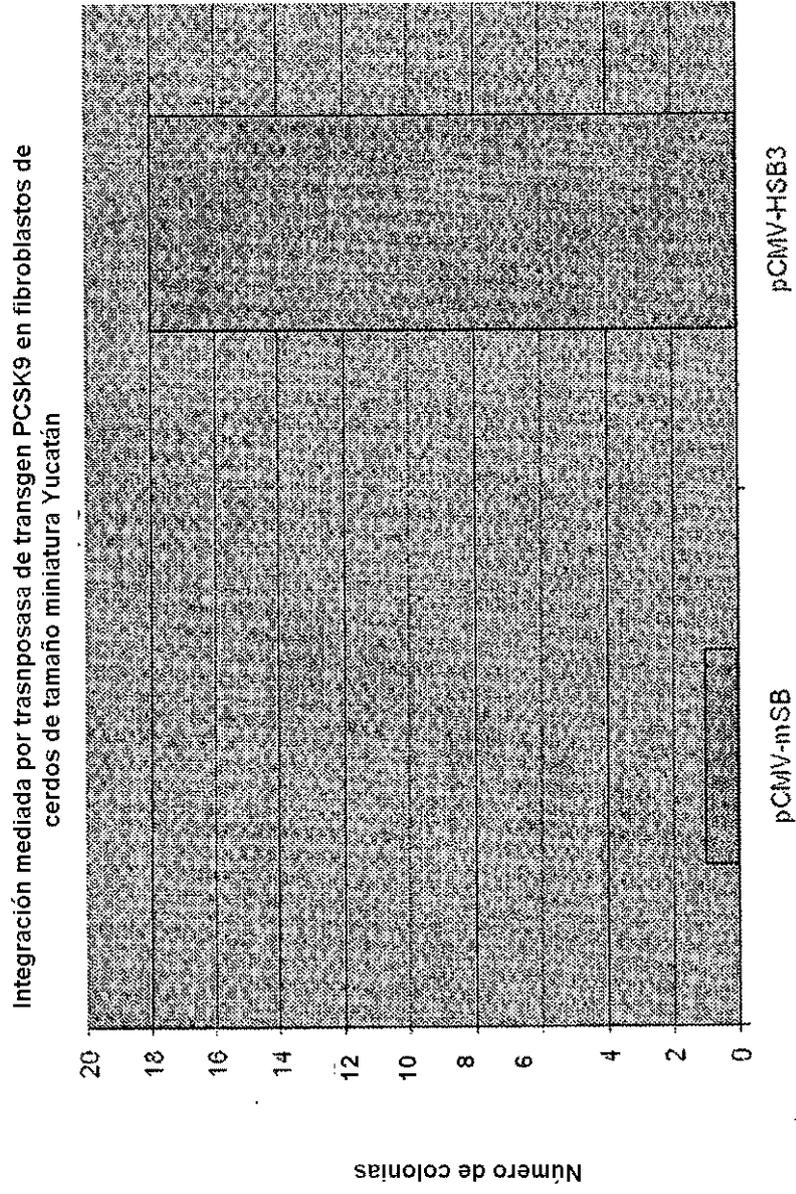


Fig. 1

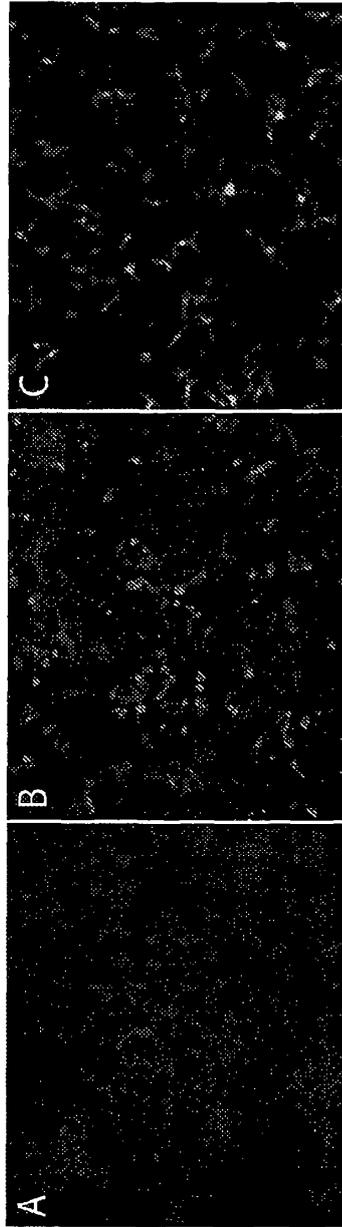


Fig. 2

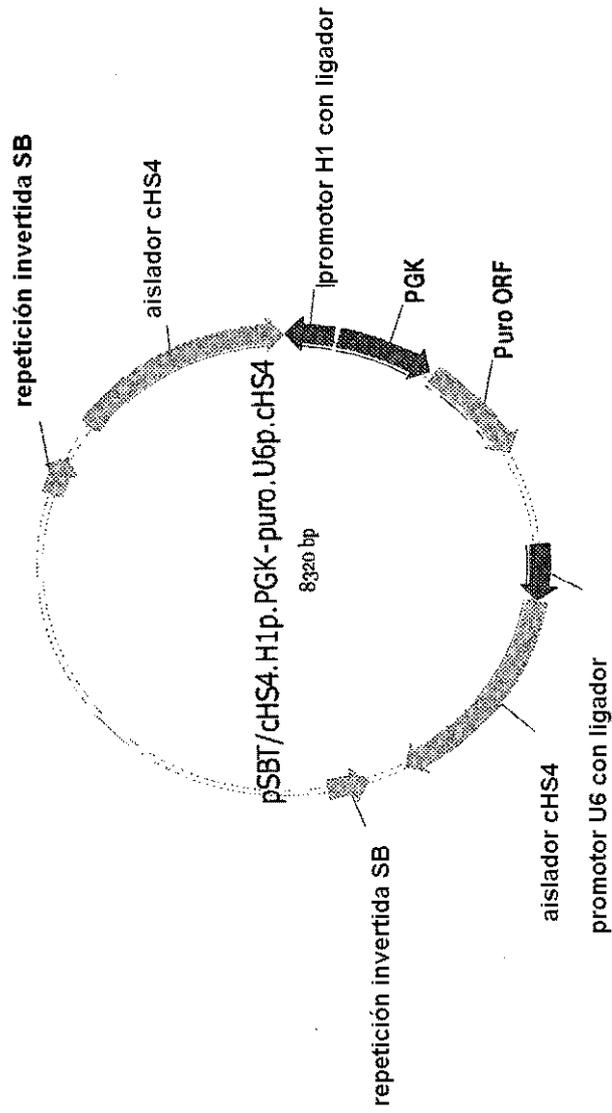


Fig. 3

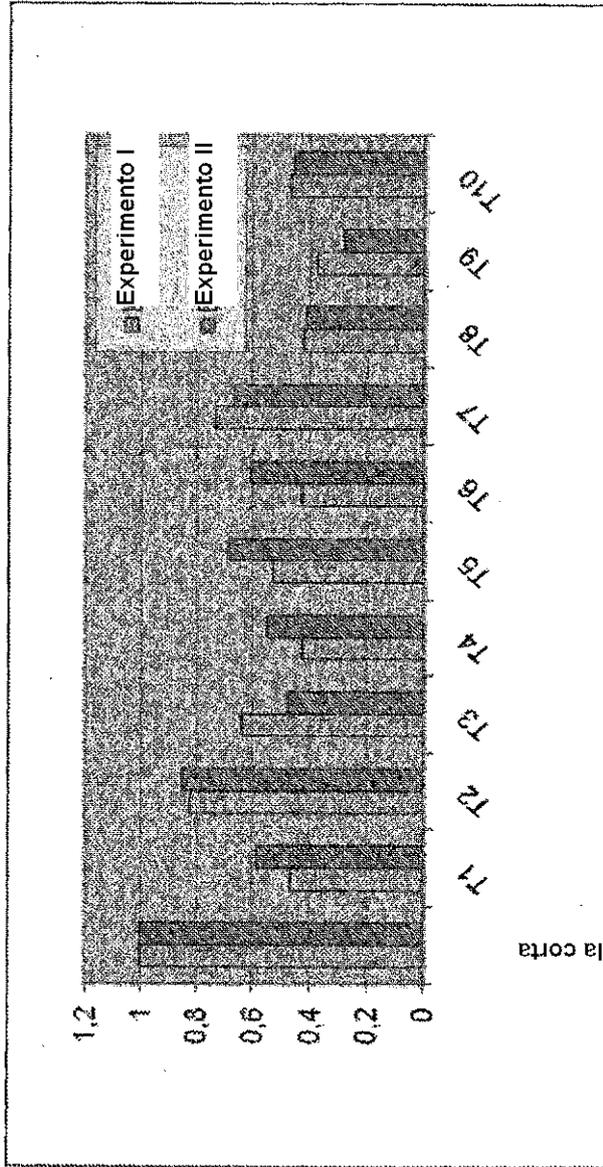


Fig. 4

Codificado de horquilla corta

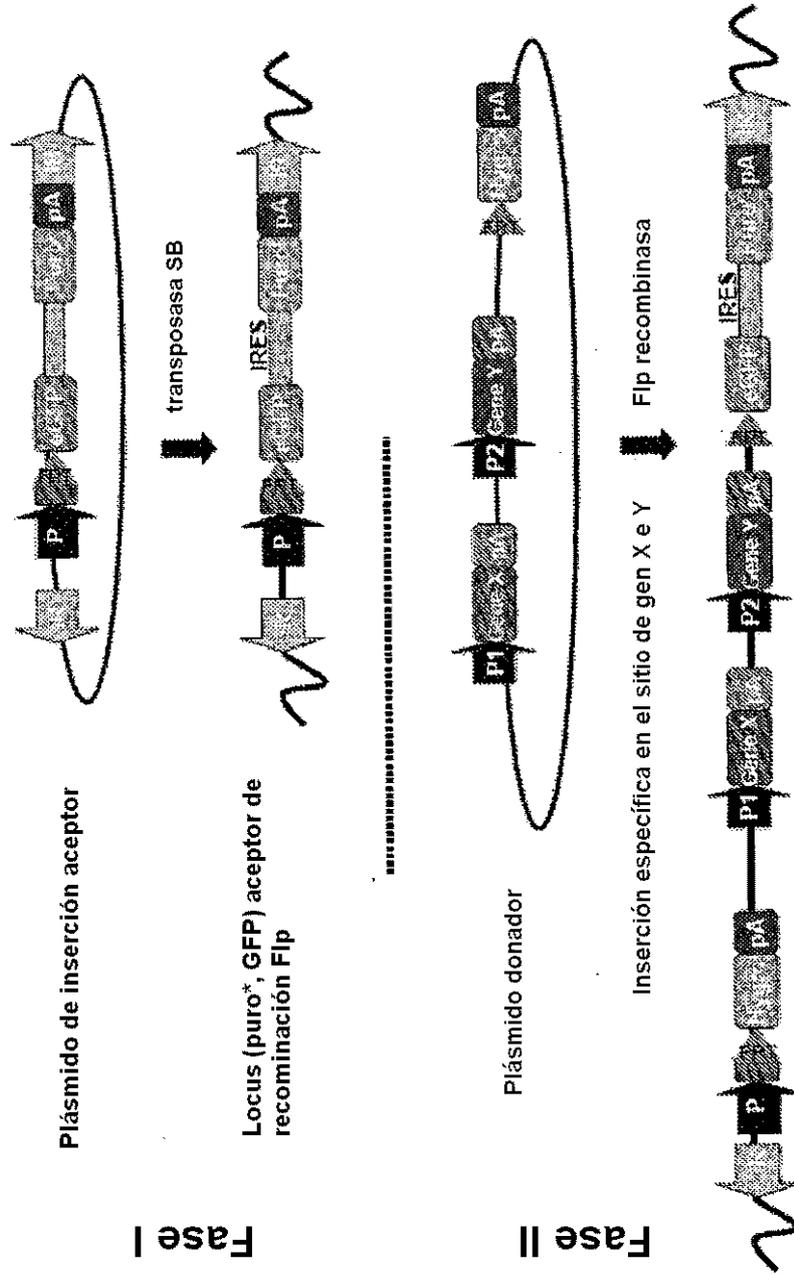


Fig. 5

Mapa de pSBT/RSV-GFIP

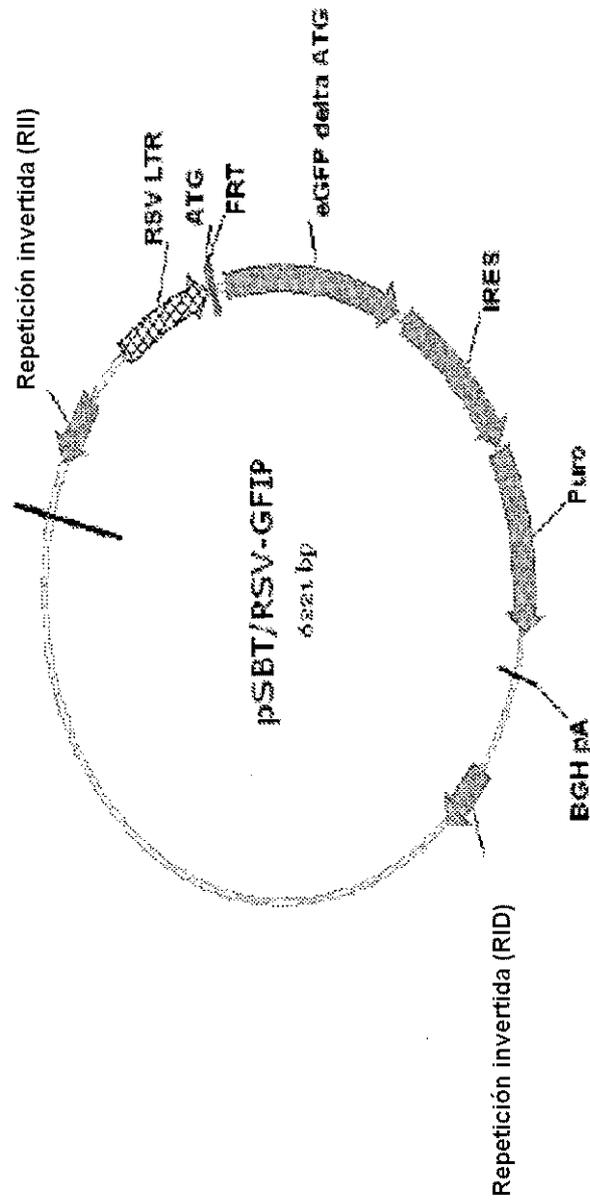


Fig. 6

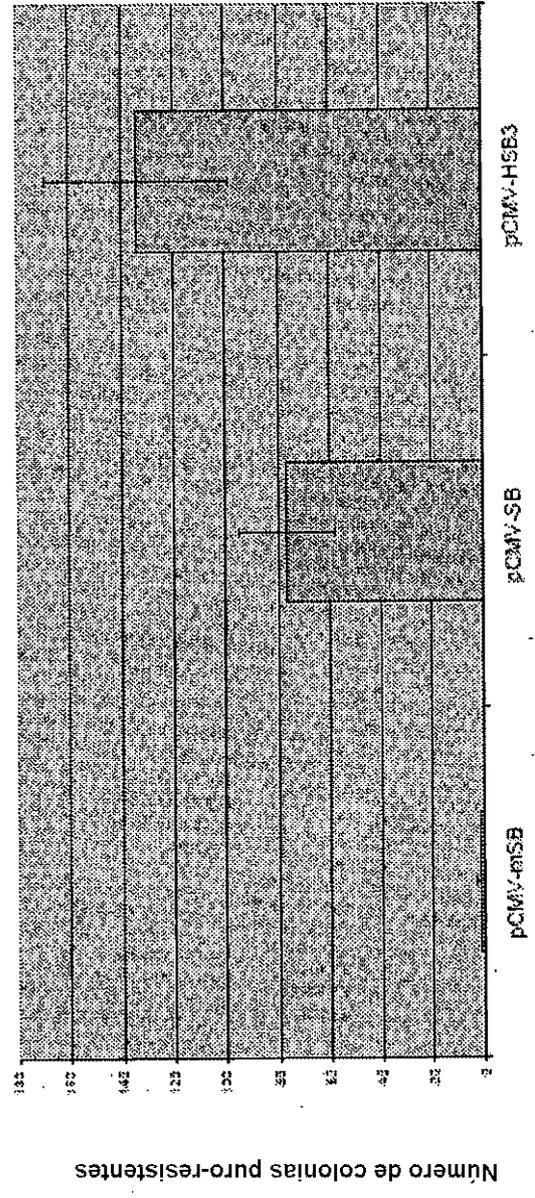
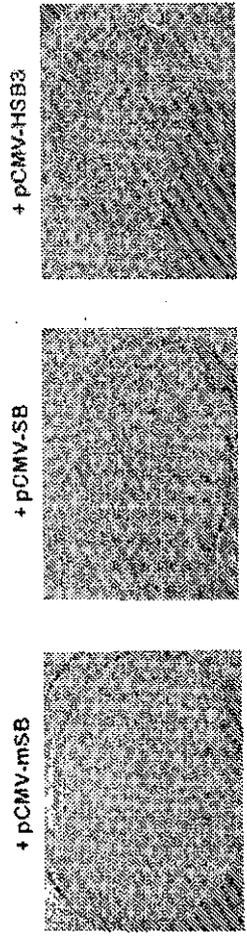


Fig. 7

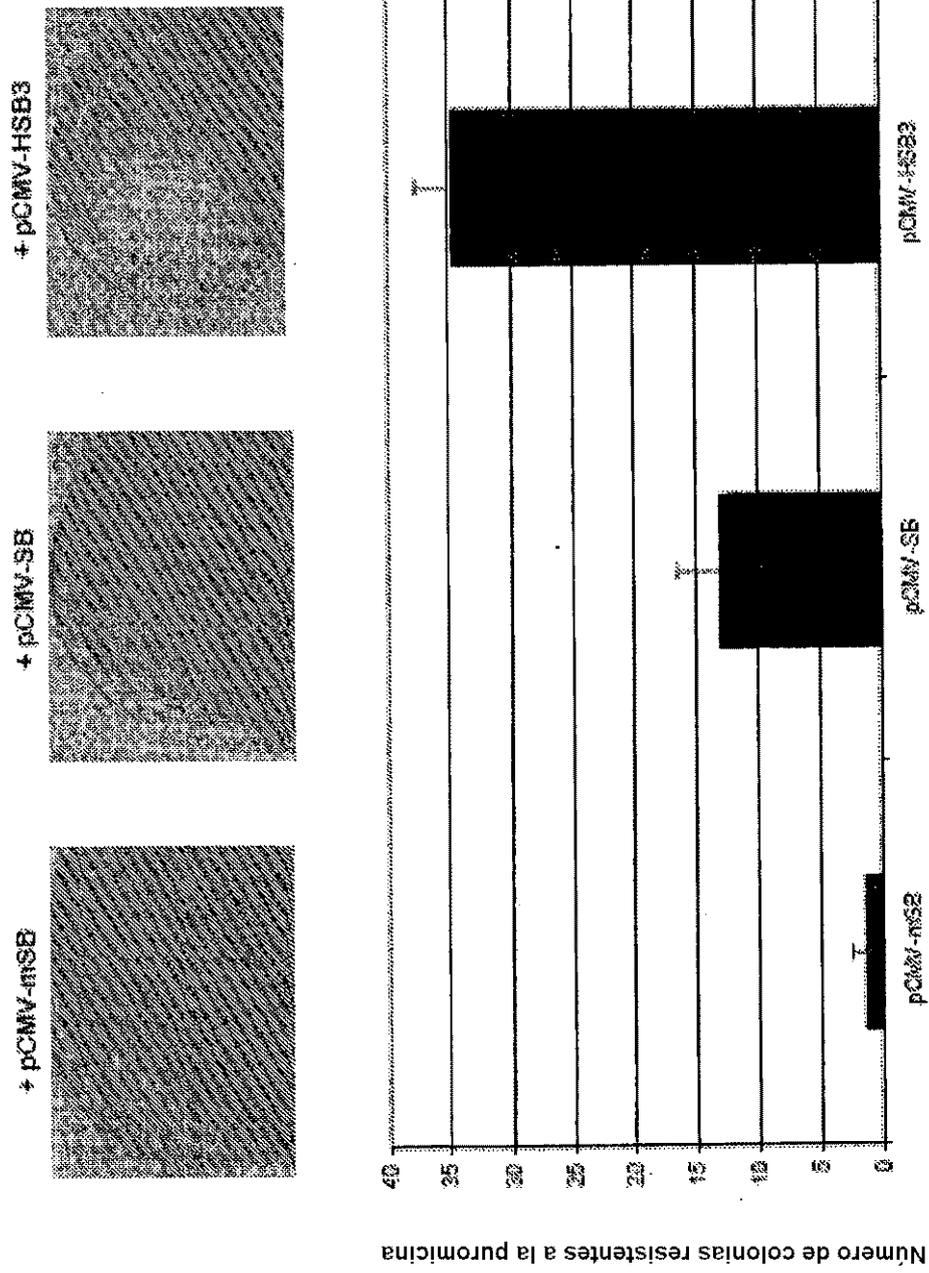


Fig. 8

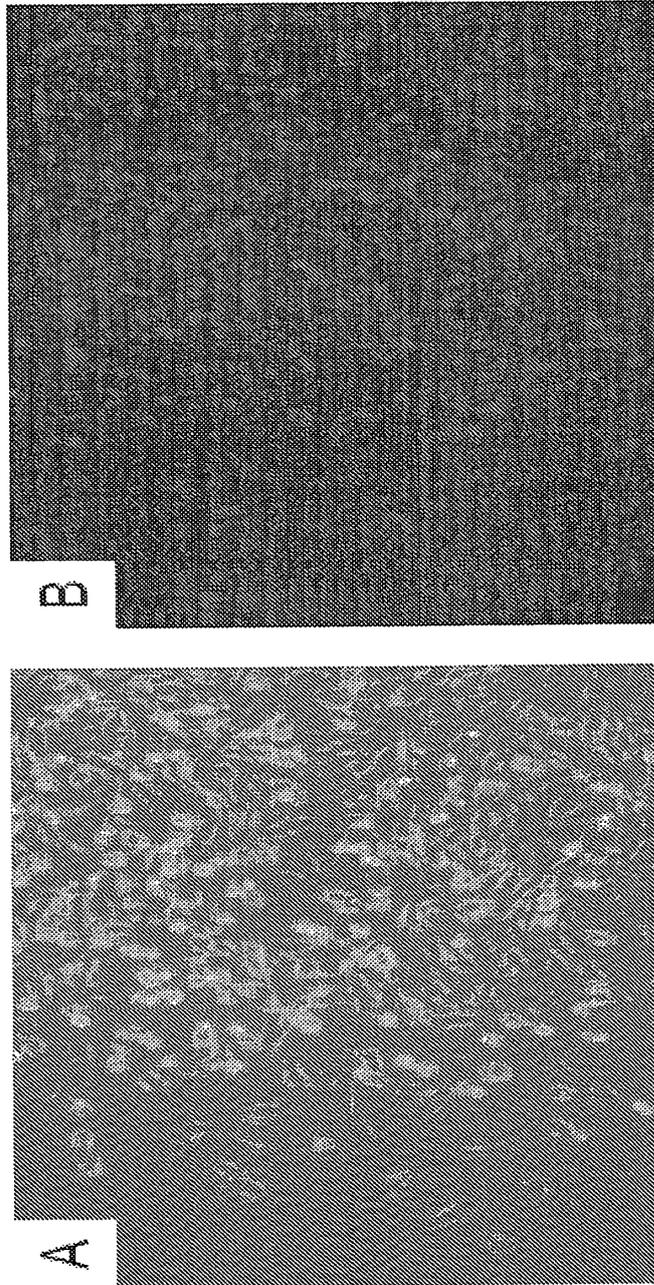


Fig. 9

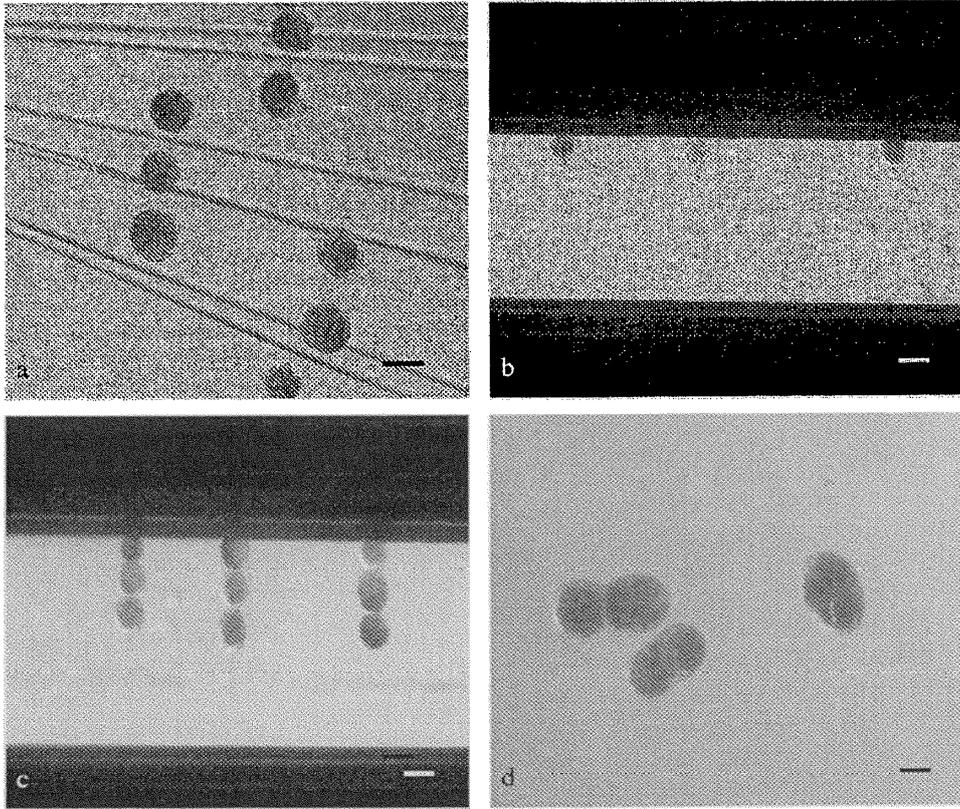


Fig. 10

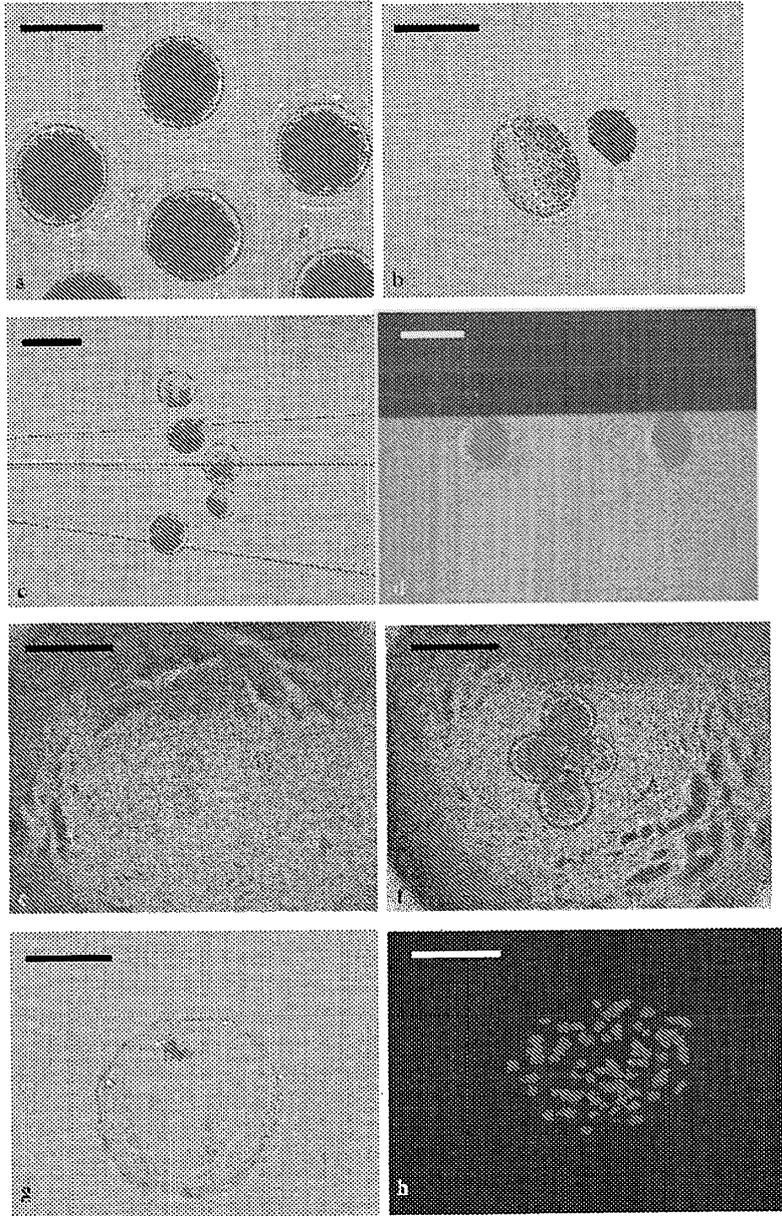


Fig. 11

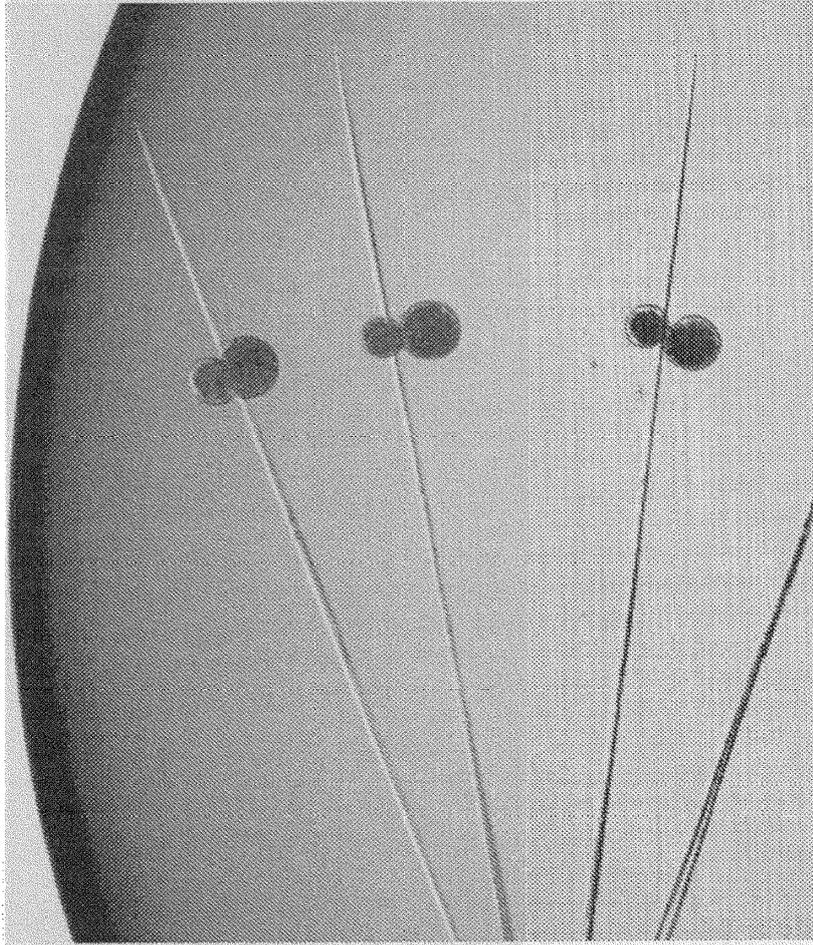
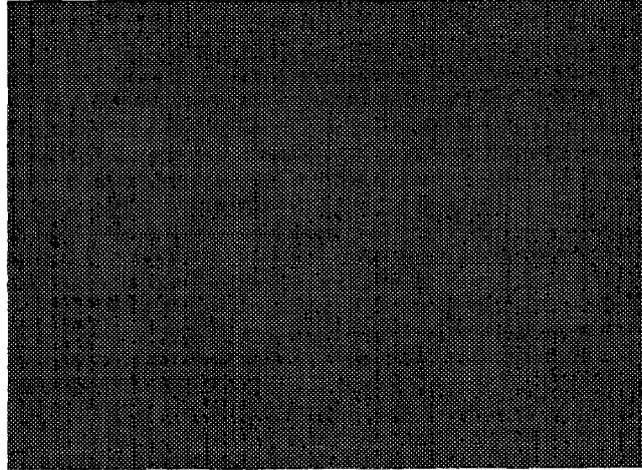


Fig. 12

A



B

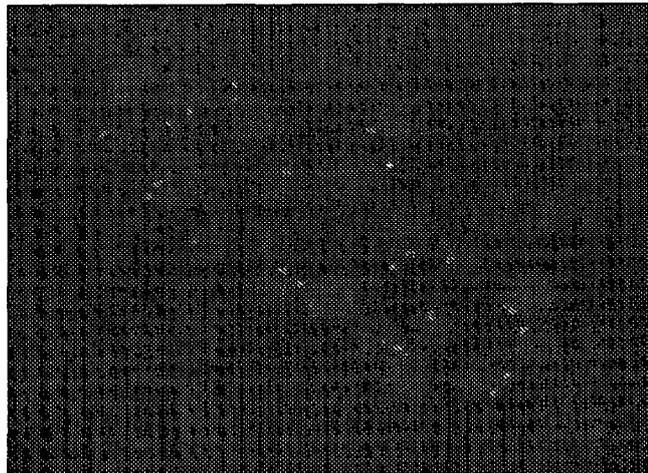


Fig. 13

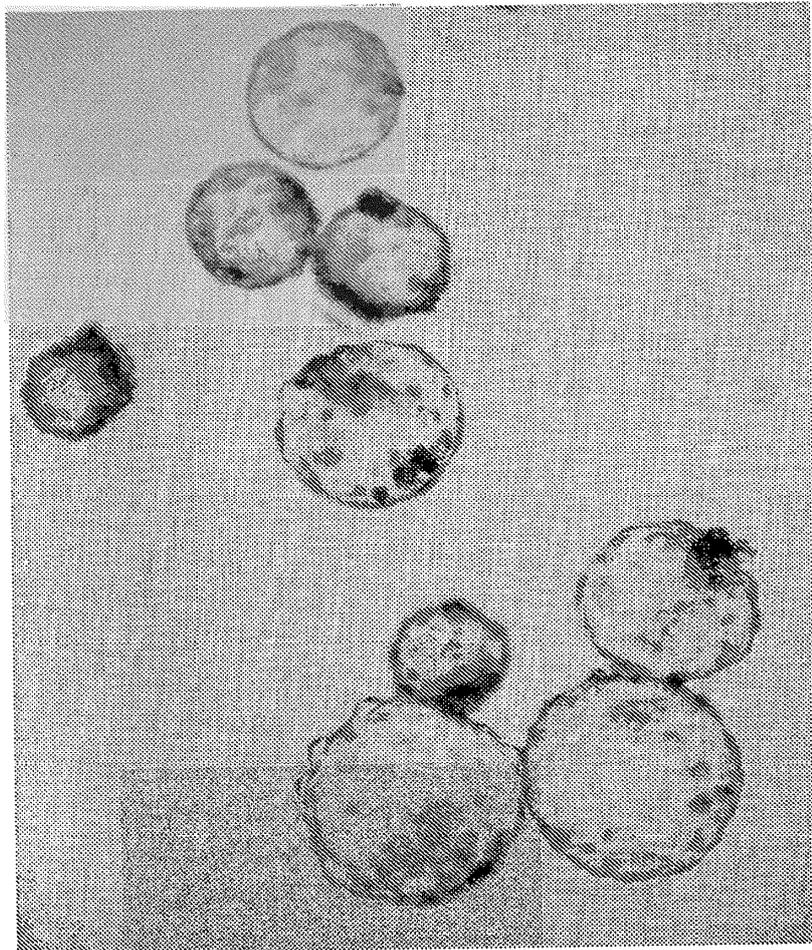


Fig. 14

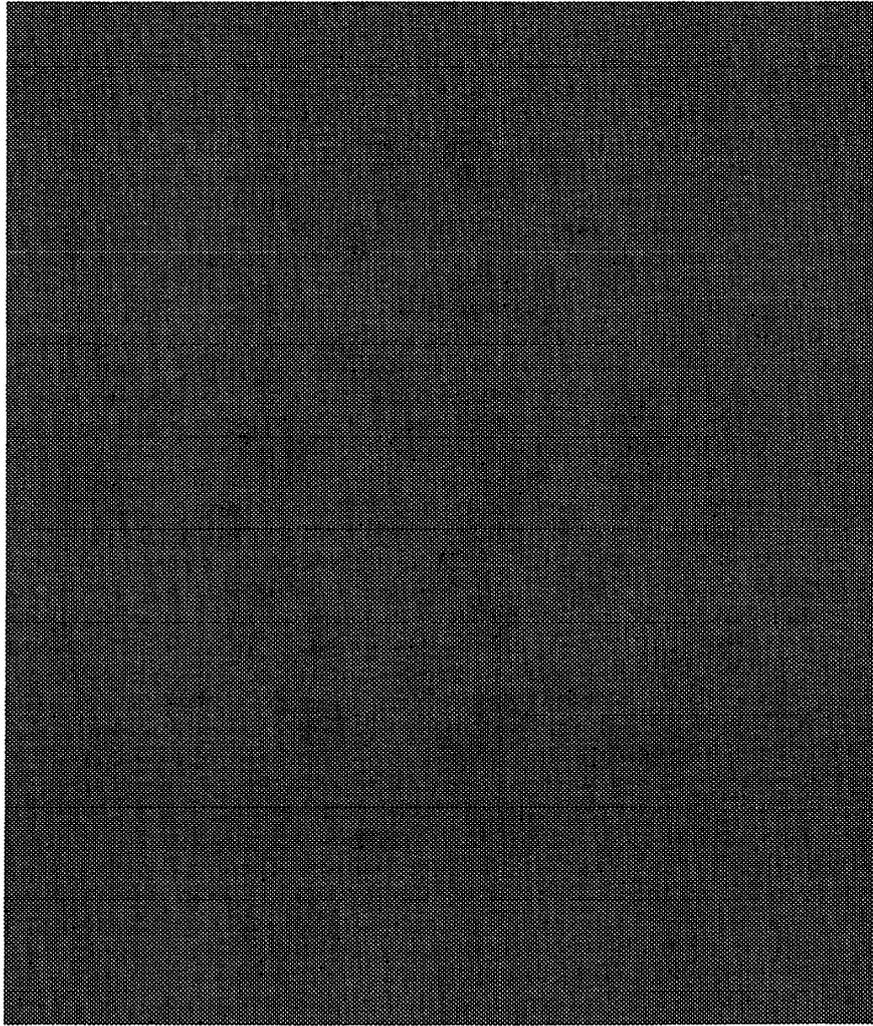


Fig. 15