

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 643**

51 Int. Cl.:

**A01K 67/027** (2006.01)

**C07K 14/575** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**C12N 15/877** (2010.01)

**C12N 15/90** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2015 PCT/DK2015/050253**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.03.2016 WO16029919**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2015 E 15770441 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2020 EP 3185678**

54 Título: **Modelo de cerdo para la diabetes**

30 Prioridad:

**28.08.2014 DK 201470518**

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

**29.09.2020**

73 Titular/es:

**AARHUS UNIVERSITET (100.0%)**

**Nordre Ringgade 1**

**8000 Aarhus C, DK**

72 Inventor/es:

**BOLUND, LARS y**

**LUO, YONGLUN**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 784 643 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 cerdo para la diabetes

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un cerdo transgénico que comprende un gen de IAPP mutado humano y muestra un fenotipo asociado a la diabetes mellitus tipo 2. La invención también se refiere a un blastocisto, un embrión, un feto, una célula donante y/o un núcleo celular transgénicos derivados de dicho cerdo transgénico. La invención se refiere además al uso del cerdo transgénico como un sistema modelo para el estudio de la terapia, el tratamiento y/o la prevención de la diabetes mellitus tipo 2.

**Antecedentes de la invención**

15 La diabetes es un grupo complejo de enfermedades con una variedad de causas. Las personas con diabetes tienen altos niveles de glucosa, a lo que también se conoce como altos niveles de azúcar en sangre o hiperglucemia. La diabetes es un trastorno del metabolismo que se desarrolla cuando el cuerpo no produce suficiente insulina o no es capaz de usar efectivamente la insulina, o ambos casos. La insulina se produce en el páncreas, un órgano situado detrás del estómago. El páncreas contiene grupos de células llamados islotes. Las células beta dentro de los islotes producen insulina, la cual se libera en la sangre.

La diabetes tipo 1 es causada por una falta de insulina debido a la destrucción de células productoras de insulina en el páncreas. En la diabetes tipo 1, una enfermedad autoinmune, el sistema inmunitario del cuerpo ataca y destruye las células beta. Normalmente, el sistema inmunitario protege al cuerpo de las infecciones mediante la identificación y la destrucción de bacterias, virus y otras sustancias extrañas potencialmente dañinas. Sin embargo, en las enfermedades autoinmunes, el sistema inmunitario ataca a las células propias del cuerpo. En la diabetes tipo 1, la destrucción de las células beta puede tener lugar durante varios años, pero los síntomas de la enfermedad suelen desarrollarse en un período corto de tiempo.

30 La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un trastorno complejo y heterogéneo que involucra muchos factores de riesgo fisiológicos y factores de susceptibilidad genética. Desde hace tiempo, se ha observado que los seres humanos, los primates no humanos y los gatos son susceptibles al desarrollo espontáneo de DM2, caracterizada por depósitos amiloides de los islotes, mientras que la DM2 espontánea es rara en roedores y cerdos. Una hipótesis es que la formación de amiloides de los islotes del polipéptido amiloide de los islotes (IAPP) es un factor patógeno para la degeneración y la apoptosis de las células  $\beta$ , lo que provoca gradualmente DM2 (Matveyenko y Butler, 2006, ILAR J 47(3): 225-33). El principal componente amiloide de los islotes está formado por fibrillas del IAPP, un polipéptido monomérico de 37 aminoácidos sintetizado por las células  $\beta$  pancreáticas. Los residuos 20 a 29 del IAPP son la región más crítica para las propiedades amiloidogénicas (Westermarck y col., 1990, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 87(13): 5036-40). En los seres humanos, los monos y los gatos, el IAPP es propenso a formar agregados amiloides tóxicos, mientras que el IAPP de los roedores y los cerdos es más refractario a la formación de amiloides (Zhang y col., 2011, FEBS Lett 585(1): 71-7). Además, se ha hallado que una variante de susceptibilidad del gen del IAPP humano (S20G) se asocia a la aparición temprana de la diabetes tipo 2 (DM2) en poblaciones asiáticas (Morita y col., 2011).

Los modelos animales, tales como los de roedores, conejos, perros, gatos, cerdos y primates, han sido ampliamente usados en la investigación de la DM2, en la investigación de la patogénesis de la enfermedad y la prueba de prevenciones y terapias. Con los avances en las tecnologías transgénicas, se han generado muchos ratones recombinantes completos y ratones recombinantes condicionales para la investigación de la diabetes. Recientemente, se han generado ratas recombinantes para el gen con nucleasas Zinc-Finger (ZFNs) para la investigación de la diabetes (Geurts y col., 2009, Science 325(5939): 433). Sin embargo, los roedores son todavía considerados como inadecuados para reflejar la patogénesis de la DM2 en los seres humanos. Por consiguiente, la mayoría de las investigaciones clínicas y traslacionales, incluyendo las pruebas de estrategias de prevención y fármacos, requiere de grandes modelos animales, tales como los de cerdos.

Se han creado varios modelos de ratón que expresan el IAPP humano (hIAPP) para estudiar la patogénesis de la DM2 asociada al IAPP. Estos ratones transgénicos hIAPP fueron generados mediante el direccionamiento del IAPP a las células  $\beta$  pancreáticas usando el promotor de insulina de rata 2 (RIP2) (Couce y col., 1996, Diabetes 45(8): 1094-101; Janson y col., 1996, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 93(14): 7283-8). La DM2 de aparición espontánea se observó en ratones homocigotos de hIAPP. Sin embargo, los ratones hemicigotos de hIAPP no desarrollan diabetes, a menos que tengan antecedentes de obesidad o sean tratados con la hormona de crecimiento. En los ratones de hIAPP diabéticos, se observaron varios fenotipos patológicos de los islotes, como los depósitos amiloides intra y extracelulares, el aumento de la apoptosis de células  $\beta$  y la disminución de la masa de células  $\beta$ . En base a los estudios de modelos de ratón de hIAPP, se sugiere que la expresión de hIAPP dependiente de la dosis es un factor crítico para la toxicidad de

las células  $\beta$  y la patogénesis de la DM2 (Matveyenko y Butler, 2006, *ILAR J* 47(3): 225-33). Adicionalmente, un estudio realizado por Hiddinga y col. halló que la expresión fisiológica de hIAPPWT y hIAPPS20G en ratones C57Bl/6 produce intolerancia leve a la glucosa con una secreción inadecuadamente normal de insulina (Hiddinga y col., 2012, *Journal of Diabetes Investigation* 3(2): 138-147).

5

Se generó un modelo de ratas transgénicas para el IAPP humano (ratas de HIP) para el estudio de la patogénesis de la DM2 asociada a la formación de amiloides de los islotes (Butler y col., 2004, *Diabetes* 53(6): 1509-16). De manera similar a los ratones de hIAPP, el procedimiento patogénico dependía de la dosis de la expresión de hIAPP y la rata de HIP homocigota desarrolló diabetes entre los 5 y los 10 meses de edad, mostrando amiloides de los islotes y un déficit de aproximadamente el 60% en la masa de células  $\beta$ . Por consiguiente, tanto el modelo de ratones como el de ratas de hIAPP diabéticas desarrolló la patología de islote relacionada con aquella que se observa en los seres humanos. Sin embargo, los modelos de hIAPP de roedores no pueden abordar plenamente el procedimiento patogénico de la DM2 asociada a la formación de amiloides de los islotes por la agregación de IAPP. Aunque se informó que la patología de IAPP induce la resistencia a la insulina, esta última resistencia no se observó en los modelos de IAPP de roedores.

Una debilidad principal de los modelos de IAPP de ratón o rata es que estos modelos animales todavía expresan su propio gen de IAPP. Estudios anteriores han demostrado que la presencia de ningún agregado de péptido de IAPP (por ejemplo, el péptido IAPP porcino) puede retrasar/impedir la formación de amiloides. Esto sugiere que la discrepancia de los fenotipos diabéticos observados en los modelos de IAPP de roedores anteriores pueden deberse a efectos compensatorios y/o de antiagregación del IAPP endógeno. Por consiguiente, los nuevos modelos animales generados por la sustitución dirigida del gen de IAPP endógeno (desactivado) con forma amiloidogénica de hIAPP (activado) deben representar un mejor modelo para estudiar el rol del IAPP en la patología de los islotes de los pacientes con DM2.

25

Los cerdos han sido favorecidos como un modelo animal para la DM2 debido a las similitudes anatómicas y fisiológicas del páncreas y los islotes de cerdo y de seres humanos. Se han generado varios modelos de cerdo de diabetes inducida químicamente mediante la administración de estreptozotocina. Lo más importante es que la generación de cerdos transgénicos (GM) para la investigación de la diabetes ahora se ha hecho posible por medio de la clonación en función de la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT). El primer modelo de cerdo GM para la DM2 era un cerdo transgénico que expresaba una forma mutante dominante y negativa del receptor del polipéptido insulínico dependiente de la glucosa (GIP; GIPRdn) en las células pancreáticas. El mismo se generó en el laboratorio de Eckhard Wolf en Munich (Renner y col., 2010, *Diabetes* 59(5): 1228-38 y EP2077330). De manera similar a los ratones GIPRdn, los cerdos GIPRdn exhibieron una reducción de la tolerancia a la glucosa oral significativa y una reducción en la proliferación de células  $\beta$  a la edad de 11 semanas. En los cerdos GIPRdn, con el aumento de la edad, se observó el deterioro del control de la glucosa y la reducción de la masa de células  $\beta$  (Renner y col., 2010, *Diabetes* 59(5): 1228-38). Otro modelo de cerdo GM de diabetes exitoso fue el de un cerdo transgénico que expresaba un gen mutante del factor  $1\alpha$  nuclear de hepatocitos dominante y negativo (HNF1AP291fsinsC). Los cerdos HNF1AP291fsinsC desarrollaron diabetes a la edad de 20 a 196 días, caracterizada por un nivel de glucosa en sangre no en ayunas superior a los 200 mg/dl, así como también islotes Langerhans pequeños y formados de manera irregular (Umeyama y col., 2009, *Transgenic Res* 18(5): 697-706 y US2009271882). El modelado exitoso de la diabetes humana en los cerdos GIPRdn y HNF1AP291fsinsC ha proporcionado una prueba de concepto para el desarrollo futuro de otros modelos de cerdos GM para la enfermedad humana.

#### 45 Resumen de la invención

Un objeto principal de la presente invención es proporcionar un modelo animal que se pueda usar para el estudio de la diabetes mellitus tipo 2. El modelo animal presentado en esta invención es un cerdo transgénico que tiene un gen de polipéptido amiloide de los islotes (IAPP) mutado humano.

50

En un aspecto, la presente descripción se refiere a un cerdo transgénico que comprende un gen de polipéptido amiloide de los islotes (IAPP) mutado, o parte del mismo, y que presenta al menos un fenotipo asociado a la diabetes.

En una realización preferida, el gen de IAPP mutado es un gen de IAPP mutado humano o parte del mismo. En una realización particular de la misma, dicho gen de IAPP mutado humano, dicho gen de IAPP mutado comprende una mutación que resulta en la sustitución de aminoácidos S20G.

Se prefiere que el cerdo transgénico, como se describe en esta invención, no exprese un gen de IAPP de cerdo. En particular, se prefiere que el cerdo transgénico no exprese un gen de IAPP de cerdo endógeno. Más específicamente, se prefiere que dicho gen de IAPP de cerdo endógeno haya sido eliminado.

El cerdo transgénico de la presente invención puede ser cualquier cerdo. En una realización preferida de la presente

invención, el cerdo transgénico es un mini cerdo. En otra realización, el cerdo transgénico es un cerdo endogámico.

El cerdo transgénico proporcionado por la presente invención presenta al menos un fenotipo asociado a, o relacionado con, la diabetes mellitus tipo 2. Se prefiere que el cerdo transgénico muestre niveles de glucosa más altos, niveles de glucagón más altos, niveles de insulina más bajos y/o niveles de péptido C más bajos, en comparación con un cerdo de control. Se prefiere que dicho cerdo de control no comprenda un gen de IAPP mutado.

En una realización, dicho nivel de glucosa aumenta en al menos un 10%, en comparación con un cerdo de control, donde dicho cerdo transgénico y dicho cerdo de control reciben una dieta normal. En otra realización, dicho nivel de glucagón aumenta en al menos un 10%, en comparación con un cerdo de control, y donde dicho cerdo transgénico y dicho cerdo de control reciben una dieta normal. En incluso otra realización, dicho nivel de insulina disminuye en al menos un 10%, en comparación con un cerdo de control, y donde dicho cerdo transgénico y dicho cerdo de control reciben una dieta normal. En una realización adicional, dicho nivel de péptido C disminuye en al menos un 10%, en comparación con un cerdo de control, y donde dicho cerdo transgénico y dicho cerdo de control reciben una dieta normal.

Se prefiere que el cerdo transgénico, como se describe en esta invención, muestre hiperglucemia. Por consiguiente, en una realización, el menos un fenotipo es la hiperglucemia. En otra realización, el cerdo transgénico muestra una degeneración de células  $\beta$ . Por consiguiente, en otra realización, el menos un fenotipo es la degeneración de células  $\beta$ .

En una realización, el cerdo transgénico, como se describe en esta invención, muestra un fenotipo seleccionado de entre el grupo que consiste en ceguera, inflamación, infección y deformación de órganos. Por consiguiente, en una realización adicional, dicho al menos un fenotipo se selecciona de entre el grupo que consiste en ceguera, inflamación, infección y deformación de órganos.

La presente invención también se refiere a un blastoquiste, un embrión, un feto una célula donante y/o núcleos celulares transgénicos que derivan de un cerdo transgénico según la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para producir el cerdo transgénico, como se describe en esta invención, comprendiendo dicho procedimiento:

- i. producir un ovocito que tiene una zona pelúcida parcialmente modificada,
  - ii. separar el ovocito en al menos dos partes, obteniendo un ovocito que tiene un núcleo y al menos un citoplasto,
  - iii. producir una célula donante que comprende un gen de IAPP mutado o parte del mismo,
  - iv. fusionar al menos un citoplasto con la célula donante o el núcleo celular rodeado de membrana,
  - v. obtener un embrión reconstruido,
  - vi. activar el embrión reconstruido para formar un embrión, cultivar dicho embrión y
  - vii. transferir dicho embrión cultivado a un mamífero huésped,
- donde el embrión se desarrolla en un cerdo transgénico.

Se aprecia que dicho procedimiento no involucra una etapa quirúrgica. En una realización preferida, la célula donante comprende un gen de IAPP mutado, en el que el gen de IAPP mutado es un gen de IAPP mutado humano. En particular, dicho gen de IAPP mutado comprende una mutación S20G. Adicionalmente se prefiere que la célula donante no exprese n gen de IAPP de cerdo endógeno. En una realización específica, el gen de IAPP de cerdo endógeno ha sido eliminado.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de un cerdo transgénico como un sistema modelo para estudiar la terapia, el tratamiento y/o la prevención de la diabetes mellitus tipo 2.

Los cerdos también se pueden usar para identificar compuestos adecuados para la terapia, el tratamiento y/o la prevención de la diabetes. Dicho procedimiento preferentemente comprende las siguientes etapas

- (i) proporcionar un cerdo transgénico según la presente invención,
- (ii) proporcionar un compuesto a probar,
- (iii) administrar dicho compuesto a dicho cerdo transgénico,
- (iv) determinar el nivel de insulina, el nivel de glucosa y/o el nivel de glucagón de dicho cerdo transgénico,

determinando así el efecto de dicho compuesto en el nivel de insulina, el nivel de glucosa, el nivel de glucagón y/o el nivel de péptido C de dicho cerdo transgénico.

También se proporciona un procedimiento para el estudio de la terapia, el tratamiento y/o la prevención de la diabetes

mediante la aplicación del cerdo transgénico según la presente descripción.

En otro aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para el estudio de la terapia, el tratamiento y/o la prevención de la diabetes que comprende las etapas de

- 5
- i. proporcionar un cerdo transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16,
  - ii. proporcionar un compuesto a probar,
  - iii. administrar dicho compuesto a dicho cerdo transgénico,
  - iv. determinar los factores de riesgo asociados a la diabetes, como el nivel de insulina, el nivel de glucosa y/o el
- 10 nivel de glucagón de dicho cerdo transgénico, determinando así el efecto de dicho compuesto en el nivel de insulina, el nivel de glucosa, el nivel de glucagón y/o el nivel de péptido C de dicho cerdo transgénico.

### Descripción de los dibujos

15 Figura 1. Representación esquemática de la construcción de desactivación de pIAPP/activación de hIAPP (pIAPPKO;hIAPPKI). RIP: promotor de insulina de rata; PGK: promotor de fosfoglicerato quinasa I; Neo: fabricante de resistencia a la neomicina; EGFP: proteína fluorescente verde potenciada; pA: señal de poli A; HR: recombinación homóloga.

20 Figura 2. Generación y validación de las TALEN de pIAPP. (A) Ilustración de los dos pares de TALEN de pIAPP. Las secuencias resaltadas en azul son sitios diana de TALEN. (B) Ensayo basado en T7E1 de la eficiencia de escisión mediado por TALEN. El primer par de TALEN (TALEN1) tiene la más alta eficiencia, de alrededor del 5%, y fue seleccionado para el direccionamiento del gen.

25 Figura 3. Generación de cerdos HIP mediante HMC (clonación manual). (A) Se llevaron a cabo tres transferencias de HMC. Se obtuvo un total de cinco cerdos HIP (3 nacidos muertos y 2 nacidos vivos) de un total de 233 embriones. (b) Foto de los cerdos HIP 609 y 610. (c) Peso de nacimiento de los cerdos HIP. (d) Tasa de crecimiento de HIP 609 y HIP 610. (e y f) Genotipado de los cerdos HIP mediante PCR y transferencia de Southern. Los cebadores y las sondas de transferencia de Southern se indican en la figura ilustrada. Se halló que el HIP 609 estaba desactivado en un alelo y activado con el IAPP humano en el otro alelo.

30 Figura 4. Curso de tiempo de las mediciones de glucosa en sangre total y el peso corporal en algunos cerdos HIP. (A) Medición de glucosa en sangre total durante tres meses. (B) Medición del peso corporal para los tres primeros meses. (C) Medición de glucosa en sangre en ayunas y no en ayunas en cerdos HIP de 44 días de edad. Se detectó glucosa en las muestras de orina de dos cerdos HIP (HIP 543 y HIP 544).

35 Figura 5. Caracterización de los cerdos HIP. Se recolectaron muestras de plasma de 8 a 9 cerdos HIP y 8 cerdos de control de tipo salvaje sin un gen de IAPP mutado a la edad de 1, 2 y 3 meses. Se determinaron los niveles de glucosa, fructosamina (FRA), glucagón, insulina y péptido C. (A) El nivel promedio de glucosa aumenta en los cerdos HIP a la edad de 1, 2 y 3 meses, en comparación con los cerdos de control. (B) El nivel promedio de fructosamina aumenta en los cerdos HIP a los 3 meses, en comparación con los cerdos de control. (C) El nivel promedio de glucagón aumenta en los cerdos HIP, en comparación con los cerdos de control. (D) El nivel promedio de insulina disminuye en los cerdos HIP, en comparación con los cerdos de control. (E) El nivel promedio de péptido C disminuye en los cerdos HIP, en comparación con los cerdos de control. El nivel promedio de péptido C, en la mayoría de los cerdos HIP fue demasiado bajo como para ser medido desde la edad de 2 meses. Para la ilustración, estos resultados se representaron por debajo del nivel cero.

40 Figura 6. La modificación HIP suprime el nivel de hormona del péptido en el plasma. Curso de los niveles de glucosa en el plasma (a), fructosamina (b), glucagón (c), insulina (d) y péptido C (e) a partir de la edad de 1 mes hasta la edad de 9 meses. Para el estudio del curso del tiempo, se usaron ocho cerdos HIP (cuadro negro) y ocho cerdos de control de la misma edad (cuadro blanco). Los cerdos HIP elegibles para cada punto de tiempo fueron los cerdos 7, 8, 8, 6, 5 y 5 para la edad de 1, 2, 3, 5, 7 y 9 meses, respectivamente. Los asteriscos representan un valor estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ , ANOVA) entre el cerdo HIP y el control, en el punto de tiempo correspondiente.

### Descripción detallada de la invención

45 Está dentro del alcance de la presente invención proporcionar un modelo animal que pueda usarse para el estudio de la diabetes mellitus tipo 2. El modelo animal presentado en esta invención es un cerdo transgénico que tiene un gen de IAPP mutado humano. Estos cerdos transgénicos muestran fenotipos que se asemejan a los fenotipos observados en la diabetes humana. Los cerdos transgénicos que tienen un gen de IAPP mutado humano como se presenta en esta invención, por lo tanto, representan un modelo animal ideal para el estudio de diabetes mellitus tipo 2 humana.

Por consiguiente, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un cerdo transgénico que comprende un gen de polipéptido amiloide de los islotes (IAPP) mutado humano, o parte del mismo, y que muestra al menos un fenotipo asociado a la diabetes mellitus tipo 2.

5 El término "cerdo transgénico", como se usa en esta invención, se refiere a un cerdo que comprende un gen extraño o una secuencia genética modificada. Este gen puede estar presente en un plásmido. Sin embargo, se prefiere que el gen extraño esté insertado en el genoma del cerdo. También se prefiere que el gen se exprese, es decir, que el cerdo exprese la proteína codificada por el gen extraño. En la presente invención, el gen extraño o modificado sea un gen  
10 de IAPP mutado.

Se apreciará que la invención no comprende los procedimientos de modificación de la identidad genética de los cerdos de una manera, la cual probablemente cause sufrimiento a los animales sin ningún beneficio médico para el hombre o el animal, o animales, como resultado de dichos procedimientos.

15 Los procedimientos para producir el cerdo transgénico descritos en esta invención no necesitan abarcar una etapa quirúrgica efectuada en el cerdo.

#### El gen de IAPP

20 El cerdo transgénico de la presente descripción comprende un gen de polipéptido amiloide de los islotes (IAPP) mutado. El polipéptido amiloide de los islotes, también llamado amilina, es producido por las células  $\beta$  pancreáticas y es secretado en paralelo con insulina. En humanos, el polipéptido amiloide de los islotes es secretado conjuntamente con insulina desde las células  $\beta$  del páncreas en la relación de aproximadamente 100:1. Por ejemplo, en humanos, monos  
25 y gatos, el IAPP tiene una tendencia a agregarse y formar agregados amiloides tóxicos. La agregación parece ser tóxica, por ejemplo, llevando a la degeneración de las células  $\beta$  y la diabetes. El IAPP de roedores y cerdos, por ejemplo, es más refractario a la formación de agregados amiloides. Por consiguiente, en una realización preferida, el gen de polipéptido amiloide de los islotes (IAPP) mutado es de un organismo donde el gen de IAPP tiene una tendencia a formar agregados amiloides.

30 En la presente invención, el gen de IAPP mutado es un gen de IAPP mutado humano o parte del mismo. El gen de IAPP humano (SEQ ID NO:1) codifica una proteína de residuos de 89 aminoácidos (SEQ ID NO:4), que consiste en un péptido señal de 22 aminoácidos y un propéptido de 67 aminoácidos también conocido como proIAPP, proamilina o proteína de proislote (SEQ ID NO:5). Cuando se libera de los péptidos señal, la proamilina sufre modificaciones  
35 postraslacionales, incluyendo la escisión de la proteasa para producir la amilina biológicamente activa que consiste en 37 aminoácidos (SEQ ID NO:6).

La secuencia de nucleótidos del gen de IAPP humano de tipo salvaje que codifica el 89 amino péptido residuos de ácido tiene SEQ ID NO:1.

40 Por lo tanto, en una realización, el cerdo transgénico de la presente invención comprende un gen de IAPP mutado humano que tiene al menos el 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1, tal como, por ejemplo, al menos el 75% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1, tal como al menos el 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1, tal como, por ejemplo, al menos el 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1, tal como al  
45 menos el 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1, tal como al menos el 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1, tal como, por ejemplo, al menos el 97% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 o tal como al menos el 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 o parte del mismo.

La secuencia de nucleótidos del gen de IAPP de tipo salvaje humano que codifica la proteína de proamilina de 67  
50 aminoácidos tiene la SEQ ID NO:2.

Por consiguiente, el cerdo transgénico de la presente invención comprende un gen de IAPP mutado humano que tiene al menos el 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2, tal como, por ejemplo, al menos el 75% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2, tal como al menos el 80% de secuencia de identidad con la SEQ ID NO:2, tal como,  
55 por ejemplo, al menos el 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2, como al menos el 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2, como al menos 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2, tal como, por ejemplo, al menos el 97% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2 o tal como al menos el 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2 o parte del mismo.

60 La secuencia de nucleótidos del gen de IAPP de tipo salvaje humano que codifica la proteína de amilina de 37 aminoácidos tiene la SEQ ID NO:3.

Por consiguiente, en otra realización, el cerdo transgénico de la presente invención comprende un gen de IAPP mutado humano que tiene al menos el 70% de identidad de secuencia de la SEQ ID NO:3, tal como, por ejemplo, al menos el 75% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3, tal como al menos el 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3, tal como, por ejemplo, al menos el 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3, tal como al menos el 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3, tal como al menos el 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3, tal como, por ejemplo, al menos el 97% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3 o tal como al menos el 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3 o parte del mismo.

El cerdo transgénico de la presente invención puede comprender un gen de IAPP mutado humano que tiene al menos el 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1, la SEQ ID NO:2 o la SEQ ID NO:3, tal como, por ejemplo, al menos el 75% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1, la SEQ ID NO:2 o la SEQ ID NO:3, tal como al menos el 80% de secuencia de identidad con la SEQ ID NO:1, la SEQ ID NO:2 o la SEQ ID NO:3, tal como, por ejemplo, al menos el 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3, tal como al menos el 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1, la SEQ ID NO:2 o la SEQ ID NO:3, tal como al menos el 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1, la SEQ ID NO:2 o la SEQ ID NO:3, tal como, por ejemplo, al menos el 97% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1, la SEQ ID NO:2 o la SEQ ID NO:3, o tal como al menos el 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1, la SEQ ID NO:2 o la SEQ ID NO:3 o parte del mismo.

El gen de IAPP mutado puede comprender una o más mutaciones. El gen de IAPP comprende al menos una mutación. En una realización preferida, el gen de IAPP comprende una mutación. En otra realización, el gen de IAPP comprende dos mutaciones. El gen de IAPP también puede comprender 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 mutaciones.

La mutación puede ser cualquier tipo de mutación. En una realización, la al menos una mutación es una delección de uno o más nucleótidos, tales como, por ejemplo, al menos 1 nucleótido, tal como al menos 2 nucleótidos, al menos 3 nucleótidos, tal como, por ejemplo, al menos 4 nucleótidos, tal como al menos 5 nucleótidos, al menos 6 nucleótidos, tales como, por ejemplo, al menos 7 nucleótidos, tal como al menos 8 nucleótidos, al menos 9 nucleótidos, tal como, por ejemplo, al menos 10 nucleótidos, tales como al menos 11 nucleótidos, al menos 12 nucleótidos, tal como, por ejemplo, al menos 13 nucleótidos, tal como al menos 14 nucleótidos, al menos 15 nucleótidos o tal como, por ejemplo, al menos 20 nucleótidos.

En otra realización, la al menos una mutación es una inserción de uno o más nucleótidos, tal como, por ejemplo, al menos 1 nucleótido, tal como al menos 2 nucleótidos, al menos 3 nucleótidos, tal como, por ejemplo, al menos 4 nucleótidos, tal como al menos 5 nucleótidos, al menos 6 nucleótidos, tal como, por ejemplo, al menos 7 nucleótidos, tal como al menos 8 nucleótidos, al menos 9 nucleótidos, tal como, por ejemplo, al menos 10 nucleótidos, tal como al menos 11 nucleótidos, al menos 12 nucleótidos, tal como, por ejemplo, al menos 13 nucleótidos, tal como al menos 14 nucleótidos, al menos 15 nucleótidos o tal como, por ejemplo, al menos 20 nucleótidos.

En una realización preferida, la al menos una mutación es una mutación puntual. En una mutación puntual, un único nucleótido se intercambia por otro. La mutación puntual puede ser una mutación A>G, una mutación A>C, una mutación A>T, una mutación T>G, una mutación T>C, una mutación T>A, una mutación G>T, una mutación G>C, una mutación G>A, una mutación C>G, una mutación C>T o una mutación C>A. Una mutación A>G significa que la adenina es sustituida por guanina. En una realización más preferida, la mutación puntual es una mutación sin sentido en el que se cambia un solo nucleótido, dando como resultado un codón que codifica para un aminoácido diferente. Por consiguiente, en una realización preferida, el polinucleótido aislado según la presente invención comprende al menos una mutación que da como resultado una sustitución de aminoácidos.

En una realización particular, el polinucleótido aislado según la presente invención comprende una mutación que da como resultado la sustitución de aminoácidos S20G. La S20G significa que la serina en la posición de aminoácido 20 de la SEQ ID NO: 9 (amilina activa) ha sido sustituido con glicina. En la SEQ ID NO:8 el residuo de serina correspondiente se encuentra en la posición de aminoácido 30, mientras que en la SEQ ID NO:7 el residuo de serina correspondiente se encuentra en la posición de aminoácido 51.

Por consiguiente, en una realización preferida, el cerdo transgénico comprende un gen de IAPP mutado humano que comprende una mutación que da como resultado la sustitución de aminoácidos S20G, donde la serina en la posición de aminoácido 20 de la proteína de amilina de 37 aminoácidos es sustituida por glicina. El codón 157AGC posicionado en los nucleótidos 157 a 159 de la SEQ ID NO:1, el codón 91AGC posicionado en los nucleótidos 91 a 93 de la SEQ ID NO:2 y el codón 58AGC posicionado en los nucleótidos 58 a 60 de la SEQ ID NO:3 codifican dicha serina.

Los codones de glicina son GGT, GGC, GGA o GGG. Por consiguiente, se prefiere que el codón AGC que codifica la serina 20 de la amilina de tipo salvaje humana se sustituya por GGT, GGC, GGA o GGG.

En una realización preferida, el gen de IAPP mutado humano comprende la mutación A157G donde la adenina en la

posición 157 de la SEQ ID NO:1 se sustituye por guanina. La secuencia que comprende la mutación A157AG es la SEQ ID NO: 4.

5 Por consiguiente, el cerdo transgénico de la presente invención comprende un gen de IAPP mutado humano que tiene al menos el 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:4, tal como, por ejemplo, al menos el 75% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:4, tal como al menos el 80% de secuencia de identidad con la SEQ ID NO:4, tal como, por ejemplo, al menos el 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:4, como al menos el 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:4, como al menos 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:4, tal como, por ejemplo, al menos el 97% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:4 o tal como al menos el 99% de identidad de  
10 secuencia con la SEQ ID NO:4 o parte del mismo.

En la realización preferida, el gen de IAPP mutado humano comprende la mutación A91G donde la adenina en la posición 91 de la SEQ ID NO:1 es sustituida por guanina. La secuencia que comprende la mutación A91G es la SEQ ID NO: 5.

15 Por consiguiente, el cerdo transgénico de la presente invención comprende un gen de IAPP mutado humano que tiene al menos el 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:5, tal como, por ejemplo, al menos el 75% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:5, tal como al menos el 80% de secuencia de identidad con la SEQ ID NO:5, tal como, por ejemplo, al menos el 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:5, como al menos el 90% de identidad de  
20 secuencia con la SEQ ID NO:5, como al menos 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:5, tal como, por ejemplo, al menos el 97% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:5 o tal como al menos el 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:5 o parte del mismo.

En una realización preferida, el gen de IAPP mutado humano comprende la mutación 58A>G donde la adenina en la  
25 posición 58 de la SEQ ID NO:1 se sustituye por guanina. La secuencia que comprende la mutación 58A>G es la SEQ ID NO: 6.

Por consiguiente, el cerdo transgénico de la presente invención comprende un gen de IAPP mutado humano que tiene al menos el 70% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6, tal como, por ejemplo, al menos el 75% de identidad  
30 de secuencia con la SEQ ID NO:6, tal como al menos el 80% de secuencia de identidad con la SEQ ID NO:6, tal como, por ejemplo, al menos el 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6, como al menos el 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6, como al menos 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6, tal como, por ejemplo, al menos el 97% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6 o tal como al menos el 99% de identidad de  
35 secuencia con la SEQ ID NO:6 o parte del mismo.

En una realización, el cerdo transgénico de la presente invención comprende un gen de IAPP mutado humano que tiene al menos el 70% de identidad de secuencia de la SEQ ID NO:4, la SEQ ID NO:5 o la SEQ ID NO:6, tal como, por ejemplo, al menos el 75% de identidad de secuencia de la SEQ ID NO:4, la SEQ ID NO:5 o la SEQ ID NO:6, tal como al menos el 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:4, la SEQ ID NO:5 o la SEQ ID NO:6, tal como,  
40 por ejemplo, al menos el 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:4, la SEQ ID NO:5 o la SEQ ID NO:6, tal como al menos el 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:4, la SEQ ID NO:5 o la SEQ ID NO:6, tal como al menos el 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:4, la SEQ ID NO:5 o la SEQ ID NO:6, tal como, por ejemplo, al menos el 97% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:4, la SEQ ID NO:5 o la SEQ ID NO:6 o tal como al menos el 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:4, la SEQ ID NO:5 o la SEQ ID NO:6 o parte del  
45 mismo.

Se prefiere que el cerdo transgénico exprese un gen de IAPP mutado humano. Por consiguiente, se prefiere que el cerdo transgénico exprese la proteína codificada por el gen de IAPP mutado humano.

50 La proteína humana proIAPP y el péptido señal codificados por la SEQ ID NO:1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, la proteína humana proIAPP codificada por la SEQ ID NO:2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ IDE NO: 8 y la amilina de la proteína IAPP humana codificada por la SEQ ID NO:3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9.

55 Por consiguiente, en una realización preferida, el cerdo transgénico, como se describe en esta invención expresa una proteína mutada de IAPP mutada que tiene al menos el 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 9 tal como al menos el 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 9, tal como, por ejemplo, al menos el 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 9, tal como al menos el 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID  
60 NO: 8 o la SEQ ID NO: 9, tal como al menos el 97% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 9, tal como, por ejemplo, al menos el 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID NO: 8 o la SEQ ID NO: 9 o tal como al menos el 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7, la SEQ ID

NO: 8 o la SEQ ID NO: 9 o parte del mismo.

El péptido de señal y la proteína mutada de IAPP humana que comprende la mutación S20G como se describió anteriormente tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:10, la proteína mutada proIAPP humana que comprende la mutación S20G tiene la SEQ ID NO:11, mientras que la proteína mutada de amilina humana que comprende la mutación S20G tiene la SEQ ID NO:11.

Por consiguiente, en una realización preferida, el cerdo transgénico, como se describió en esta invención expresa la proteína mutada de IAPP humana que tiene una mutación S20G y tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12 tal como al menos el 85% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12, tal como, por ejemplo, al menos el 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12, tal como al menos el 95% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12, tal como al menos el 97% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12, tal como, por ejemplo, al menos el 98% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12 o como al menos el 99% de la identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 10, la SEQ ID NO: 11 o la SEQ ID NO: 12 o parte del mismo.

En una realización específica, el cerdo transgénico expresa la proteína de IAPP humana que comprende la S20G y tiene la SEQ ID NO:10, la SEQ ID NO:11 y/o la SEQ ID NO:12.

En una realización de la presente invención, el cerdo transgénico no expresa un polipéptido amiloide de los islotes de cerdo funcional. El cerdo transgénico puede comprender, por ejemplo, una o más mutaciones en el gen de IAPP endógeno que llevan a la expresión de una proteína disfuncional. El término "endógeno" se usa en esta invención para especificar un gen particular presente de forma natural en el genoma de una célula diana particular (por ejemplo, células de un cerdo). En una realización, el gen de IAPP de cerdo endógeno comprende una o más mutaciones que inhiben o suprimen la expresión del gen. En una realización preferida, el cerdo transgénico no expresa un gen de IAPP de cerdo. En otra realización preferida, el cerdo transgénico no expresa un gen de IAPP de cerdo endógeno. En una realización específica, el gen de IAPP de cerdo endógeno ha sido inactivado.

El gen de IAPP mutado humano puede insertarse en el genoma porcino usando técnicas de clonación tradicionales conocidas por el experto en la materia. En una realización, el gen de IAPP mutado puede dirigirse a una región específica en el genoma porcino mediante la recombinación homóloga de una construcción de direccionamiento. En una realización preferida, se usa una estrategia de activación en la que el gen de IAPP mutado se inserta en el genoma del cerdo.

La recombinación homóloga ocurre entre dos moléculas de ADN homólogas. También se le llama cruce de ADN. Mediante la recombinación homóloga, un segmento de ADN puede sustituir a otro segmento de ADN con una secuencia similar. El procedimiento involucra la ruptura y la reunión de las regiones homólogas de ADN, lo cual es mediado por enzimas especializadas tales como, por ejemplo, las recombinasas específicas de sitio. La técnica permite sustituir un alelo con una construcción de ingeniería sin afectar cualquier otro locus en el genoma. Usando la recombinación homóloga, es posible dirigir la inserción de un transgén a un locus conocido específico del genoma de la célula huésped. Conociendo la secuencia de ADN del locus diana, es posible sustituir cualquier gen con una construcción de ADN transgénico, sustituyendo o eliminando así la secuencia diana. Usando este procedimiento, un gen puede ser eliminado y sustituido por otro gen, el cual se activa a continuación. Este procedimiento se conoce como "activación genética", que permite el direccionamiento específico de genes aprovechando la recombinación homóloga.

En una realización preferida de la presente invención, el gen de IAPP de cerdo endógeno ha sido desactivado. Por lo tanto, una realización específica de la presente invención se refiere a un cerdo transgénico que comprende un gen de IAPP mutado humano que ha sido activado y donde el gen de IAPP endógeno ha sido desactivado. En particular, se prefiere que el gen de IAPP endógeno sea sustituido por el gen de IAPP mutado humano (véase la Figura 1).

En una realización, un vector o una construcción de direccionamiento de ADN que comprende sitios de reconocimiento de nucleasas de efector de tipo activador de la transcripción (TALEN) se usa para la desactivación y la activación del gen (Proc Natl Acad Sci EE.UU. 23 de octubre de 2012;109(43):17382-7). Esto se ejemplifica en el Ejemplo 1 que demuestra el uso de un vector de pIAPP-TALEN (SEQ ID NO:13) para la desactivación del gen de IAPP de cerdo y la activación del gen e IAPP humano.

En algunas realizaciones, sólo una modificación genética se introduce en el genoma. En otras realizaciones, sin embargo, el genoma puede modificarse en más de un sitio. Por ejemplo, el cerdo transgénico puede comprender un gen de IAPP mutado en combinación con otra mutación de genes relacionados con la diabetes. Por ejemplo, las mutaciones en el receptor de polipéptido insulino-trópico dependiente de la glucosa (GIP) y las mutaciones en el gen

mutante del factor 1 $\alpha$  nuclear de hepatocitos (HNF1A<sup>P291fsinsC</sup>) son conocidas por estar asociadas a la diabetes. Por lo tanto, en una realización, el cerdo transgénico comprende un gen de IAPP mutado y un gen mutado del receptor GIP. En otra realización, el cerdo transgénico comprende un gen de IAPP mutado y un gen mutado del factor 1 $\alpha$  nuclear de hepatocitos. En incluso otra realización, el cerdo transgénico comprende un gen de IAPP mutado y un gen mutado Cry1 (Cry1 Cys414Ala antimórfico; PLoS ONE Vol. 8, No. 10 (2013) e76098).

### Cerdos

La presente invención se refiere a un cerdo transgénico que comprende un gen mutado de polipéptido amiloide de los islotes (IAPP) humano o parte del mismo y muestra al menos un fenotipo asociado a la diabetes mellitus tipo 2. El cerdo transgénico de la presente invención puede ser cualquier cerdo.

El cerdo es genéticamente cercano a los humanos en comparación con, por ejemplo, los roedores. Además, el cerdo ha sido ampliamente usado en investigaciones biomédicas, debido a las similitudes entre la fisiología humana y la porcina (Douglas, 1972; Book & Bustad, 1974).

En una realización, el cerdo transgénico es un cerdo salvaje. En otra realización, el cerdo transgénico es el cerdo doméstico, *Sus scrofa*. En esta invención, se describe el *S. domesticus*. En incluso otra realización, la invención se refiere a los mini cerdos, así como también a los cerdos endogámicos. Los cerdos transgénicos descritos en esta invención se seleccionan de entre el grupo que consiste en Landrace, Yorkshire, Hampshire, Duroc, Meishan chino,

Berkshire y Pietrain, tal como el grupo que consiste en Landrace, Yorkshire, Hampshire y Duroc, por ejemplo, el grupo que consiste en Landrace, Duroc y Meishan chino, tal como el grupo que consiste en Berkshire, Pietrain, Landrace y Meishan chino, por ejemplo, el grupo que consiste en Landrace y Meishan chino. En una realización, el cerdo no es un mini cerdo. En otra realización, el cerdo transgénico de la presente invención es un cerdo endogámico.

Debido a su tamaño y peso de alrededor de 200 kg, el cerdo doméstico no se maneja fácilmente en un entorno de laboratorio. Por consiguiente, en una realización preferida de la presente invención, el cerdo transgénico es un mini cerdo. Los mini cerdos descritos en esta invención se seleccionan de entre el grupo que consiste en Goettingen, Yucatán, Bama Xiang Zhu, Wuzhishan y Xi Shuang Banna.

Los cerdos de la presente invención también incluyen la descendencia del cerdo transgénico que comprende un gen mutado de polipéptido amiloide de los islotes (IAPP) humano. En una realización, el cerdo transgénico de la presente invención es generado mediante clonación. Los cerdos clonados que comprenden el gen de IAPP mutado humano pueden usarse como animales de cría. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a la descendencia de los cerdos clonados. La descendencia puede tener diferentes genotipos, en comparación con los cerdos clonados, y ser heterocigotos con respecto al gen de IAPP mutado. Por consiguiente, en una realización, el cerdo transgénico es heterocigótico con respecto al gen mutado de polipéptido amiloide de los islotes (IAPP) humano. En otra realización, el cerdo transgénico es homocigoto con respecto al gen mutado de polipéptido amiloide de los islotes (IAPP).

La presente invención también se refiere a un blastoquiste, un embrión, un feto, una célula donante y/o un núcleo celular transgénicos derivados del cerdo transgénico, como se describe en esta invención.

Además, la presente invención se refiere a una célula o una línea celular transgénicas de un cerdo transgénico de la presente invención. Preferentemente, la célula o la línea celular transgénicas se obtienen de una célula germinal y/o una célula somática de dicho cerdo transgénico.

### Fenotipos

El cerdo transgénico de la presente invención muestra al menos un fenotipo asociado a la diabetes mellitus tipo 2. Por consiguiente, el cerdo transgénico puede mostrar cualquier fenotipo que está relacionado con la diabetes mellitus tipo 2. Una causa común de la diabetes es la incapacidad de las células beta del páncreas de producir suficiente insulina para impedir una hiperglucemia. El tipo 1 es generalmente debido a la destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas. El sello distintivo de tipo 2 es la resistencia a la insulina en todo el tejido. Inicialmente, las células beta pancreáticas intentarán compensar la resistencia a la insulina mediante el aumento de la producción de insulina. Como resultado, debido a la agotadora actividad de producir insulina, la diabetes mellitus tipo 2 a veces también progresa a la pérdida de la función de las células beta. La diabetes gestacional es similar a la diabetes mellitus tipo 2, en que involucra la resistencia a la insulina. En la diabetes gestacional, las hormonas del embarazo causan resistencia a la insulina en mujeres genéticamente predispuestas a desarrollar esta condición.

La resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2 se asocian a una serie de condiciones clínicas graves. Las condiciones asociadas a la resistencia a la insulina y/o la diabetes incluyen aterosclerosis, arteriosclerosis, arteriosclerosis,

hipertensión, trastornos cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, retinopatía, neuropatía, nefropatía, microangiopatía, macroangiopatía, hiperglucemia, hipercolesterolemia, hiperinsulinemia, hiperlipidemia, sobrepeso, obesidad visceral, dislipidemia, resistencia a la insulina, alteración de la tolerancia a la glucosa oral, glucosa alterada en ayunas, síndrome metabólico, síndrome de ovario poliquístico, hígado graso (esteatosis hepática), isquemia, enfermedad cardíaca  
 5 isquémica, accidente cerebrovascular trombótico, ictus hemorrágico, isquemia de las extremidades y/o claudicación. Se pretende que cada uno de los trastornos o condiciones especificadas anteriormente sea una realización individual.

La diabetes tipo 2 y la resistencia a la insulina también se asocian a una mayor incidencia del síndrome metabólico. El síndrome metabólico es un grupo de factores de riesgo metabólicos en una persona. Estos factores de riesgo  
 10 incluyen sobrepeso/obesidad, hipertensión/trastornos cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 y dislipidemia. Por consiguiente, se pretende que el término "síndrome metabólico", según la presente invención, comprenda esos factores de riesgo. A veces, se hace referencia al síndrome metabólico como el síndrome metabólico X, el síndrome X, el síndrome de resistencia a la insulina, el síndrome de Reaven o el síndrome obstructivo congénito de las vías respiratorias (CHAOS). Como es evidente a partir de lo anterior, los factores de riesgo individuales involucrados en el  
 15 síndrome metabólico también pueden constituir una condición clínica individual asociada a la diabetes tipo 2.

En una realización, el cerdo transgénico muestra al menos un fenotipo asociado a la diabetes tipo 2.

20 En una realización, el cerdo transgénico tiene diabetes tipo 2.

En general, los síntomas o fenotipos de la diabetes sin tratar incluyen: pérdida de peso, poliuria (micción frecuente), polidipsia (aumento de la sed) y polifagia (aumento del hambre). Por consiguiente, en una realización, el cerdo transgénico muestra al menos un fenotipo seleccionado de entre el grupo que consiste en pérdida de peso, poliuria y polifagia.

25 Las complicaciones microvasculares primarias de la diabetes incluyen daño en los ojos, los riñones y los nervios. El daño en los ojos, conocido como retinopatía diabética, es causado por el daño en los vasos sanguíneos de la retina del ojo, y puede resultar en una pérdida gradual de la visión y potencialmente ceguera. El daño a los riñones, conocido como retinopatía diabética, puede llevar a la cicatrización del tejido, la pérdida de proteína en la orina y finalmente la  
 30 enfermedad renal crónica, a veces requiere diálisis o un trasplante de riñón. El daño a los nervios del cuerpo, conocido como neuropatía diabética, es la complicación más común de la diabetes. Los síntomas pueden incluir entumecimiento, hormigueo, dolor y una alteración de la sensación de dolor, que puede llevar a daños en la piel. Pueden producirse problemas de pie relacionados con la diabetes (como las úlceras diabéticas en los pies) y pueden ser difíciles de tratar y, en ocasiones, requieren una amputación. Adicionalmente, la neuropatía diabética proximal causa la pérdida de  
 35 masa muscular y debilidad.

Por consiguiente, en otra realización, el cerdo transgénico muestra al menos un fenotipo seleccionado de entre el grupo que consiste en daño en los ojos, nefropatía diabética, neuropatía diabética, pérdida de proteínas en orina, daño en la piel, úlceras diabéticas en los pies y pérdida de masa muscular.

40 En una realización preferida, el cerdo transgénico muestra al menos un fenotipo seleccionado de entre el grupo que consiste en ceguera, inflamación, infección y deformación de los órganos.

La degeneración de las células  $\beta$  es la causa principal de la diabetes mellitus tipo I. Además, el curso clínico de la  
 45 diabetes tipo 2 se caracteriza por una disminución progresiva de la masa y la función de las células  $\beta$ . Las células  $\beta$  constituyen el tipo predominante de células en los islotes del páncreas y que son responsables de la secreción de insulina. Por lo tanto, la degeneración de las células  $\beta$  se asocia a una disminución en la secreción de insulina.

En otra realización preferida de la presente invención, el al menos un fenotipo mostrado por el cerdo transgénico es  
 50 la degeneración de las células beta. La degeneración de las células  $\beta$  puede determinarse, por ejemplo, mediante la evaluación de la masa de células beta en una muestra de tejido pancreático.

En una realización preferida el al menos un fenotipo mostrado por el cerdo transgénico es la intolerancia a la glucosa o la hiperglucemia. La intolerancia a la glucosa es un término general para condiciones metabólicas que resultan en  
 55 niveles de glucosa en sangre más altos de lo normal, es decir, hiperglucemia. La hiperglucemia, tal como se usa en esta invención, es una condición en la que una cantidad excesiva de glucosa circula en el plasma sanguíneo.

La intolerancia glucosa incluye a cualquier persona que tenga ya sea glucemia basal alterada (IFG) o tolerancia alterada a la glucosa (IGT).

60 Los fenotipos asociados a la diabetes también se pueden detectar como niveles anormales de glucosa, glucagón, insulina y/o péptido C del cerdo transgénico.

- La insulina es la hormona principal que regula la absorción de la glucosa de la sangre en la mayoría de las células del cuerpo, especialmente del hígado, los músculos y el tejido adiposo. Por lo tanto, la deficiencia de insulina o la insensibilidad de sus receptores juega un papel central en todas las formas de diabetes. La insulina juega un papel fundamental en el equilibrio de los niveles de glucosa en el cuerpo. La insulina puede inhibir la descomposición del glucógeno o el procedimiento de la gluconeogénesis, puede estimular el transporte de glucosa a las células adiposas y musculares, y puede estimular el almacenamiento de la glucosa en la forma de glucógeno. El péptido C, que también es conocido como péptido de conexión, conecta la cadena A de la insulina a su cadena B en la molécula de proinsulina. El péptido C es secretado junto con la insulina y normalmente se secreta en cantidades equimolares a la insulina.
- La insulina es liberada a la sangre a través de las células  $\beta$ , que se encuentran en los islotes de Langerhans en el páncreas, en respuesta al aumento de los niveles de glucosa en sangre, por lo general, después de comer. La insulina se usa en alrededor de dos tercios de las células del cuerpo para absorber la glucosa de la sangre para su uso como combustible, para la conversión a otras moléculas necesarias o para su almacenamiento. Los niveles de glucosa más bajos resultan en una disminución de la liberación de insulina desde las células  $\beta$  y en la descomposición del glucógeno en glucosa. Este procedimiento es controlado principalmente por la hormona glucagón, que actúa de manera opuesta a la insulina.
- Si la cantidad de insulina disponible es insuficiente, si las células no responden bien a los efectos de la insulina (insensibilidad a la insulina o resistencia a la insulina), o si la insulina en sí misma es defectuosa, entonces la glucosa no será absorbida adecuadamente por las células del cuerpo que la requieran, y no se almacenará adecuadamente en el hígado ni en los músculos. El efecto neto es la persistencia de altos niveles de glucosa en sangre, una pobre síntesis de proteína, así como también otros trastornos metabólicos.
- Por consiguiente, los niveles altos de glucosa y de glucagón y los niveles bajos de insulina y/o de péptido C se asocian normalmente a la diabetes.
- Los niveles de glucosa, glucagón, insulina y/o péptido C pueden determinarse, por ejemplo, mediante la medición de la concentración de glucosa, glucagón, insulina y/o péptido C en una muestra de orina o de plasma del cerdo. En una realización preferida, los valores obtenidos, es decir, los niveles medidos de glucosa, glucagón, insulina y/o péptido C se comparan con los niveles de glucosa, glucagón, insulina y/o péptido C en un cerdo de control. Se prefiere que el cerdo de control no comprenda un gen de IAPP mutado. En una realización preferida, el cerdo de control es un cerdo de tipo salvaje. Se aprecia que el cerdo de control sea de la misma raza que el cerdo transgénico.
- En una realización, el cerdo transgénico muestra niveles de glucosa más altos, niveles de glucagón más altos, niveles de insulina más bajos y/o niveles de péptido C más bajos, en comparación con un cerdo de control.
- Por consiguiente, en una realización preferida, el cerdo transgénico muestra niveles de glucosa más altos, en comparación con un cerdo de control. El término "nivel de glucosa", como se usa en esta invención, se refiere al nivel de glucosa en sangre o el nivel de glucosa en el plasma del cerdo. Por consiguiente, el nivel de glucosa es la concentración de glucosa en la sangre o en el plasma del cerdo. El nivel de glucosa de los cerdos depende de la dieta que reciben los cerdos. Los cerdos que recibieron una dieta normal mostrarán, por ejemplo, niveles de glucosa más altos que los cerdos en ayunas.
- Por consiguiente, en una realización, el cerdo transgénico muestra niveles de glucosa más altos, en comparación con un cerdo de control, y donde dicho cerdo transgénico y dicho cerdo de control reciben una dieta normal. Se prefiere que el cerdo transgénico y el cerdo de control reciban la misma dieta y que los niveles de glucosa en sangre se midan en los mismos puntos de tiempo después de una comida.
- En una realización, el nivel de glucosa del cerdo transgénico aumenta en al menos el 5%, tal como, por ejemplo, al menos el 15%, tal como al menos el 20%, tal como, por ejemplo, al menos el 30%, al menos el 40%, tal como, al menos, el 50%, tal como, por ejemplo, al menos el 60%, tal como al menos el 70%, tal como, por ejemplo, al menos el 80% o tal como al menos el 100%, en comparación con un cerdo de control, y donde dicho cerdo transgénico y dicho cerdo de control reciben una dieta normal.
- En una realización preferida, el nivel de glucosa del cerdo transgénico aumenta en al menos el 10%, en comparación con un cerdo de control, y donde dicho cerdo transgénico y dicho cerdo de control reciben una dieta normal.
- En incluso otra realización preferida de la presente invención, el cerdo transgénico descrito en esta invención muestra niveles de glucagón más altos, en comparación con un cerdo de control. El término "nivel de glucagón", como se usa en esta invención, hace referencia al nivel de glucagón en sangre o en el plasma del cerdo. Por consiguiente, el nivel de glucagón es la concentración de glucagón en la sangre o en el plasma del cerdo. El nivel de glucagón de los cerdos

depende de la dieta que reciban los cerdos. Los cerdos que reciben una dieta normal, por ejemplo, mostrarán niveles de glucagón más altos que los cerdos en ayunas.

5 Por consiguiente, en una realización, el cerdo transgénico muestra niveles de glucagón más altos, en comparación con un cerdo de control, y donde dicho cerdo transgénico y dicho cerdo de control reciben una dieta normal.

10 En una realización, el nivel de glucagón del cerdo transgénico aumenta en al menos el 5%, tal como, por ejemplo, al menos el 15%, tal como al menos el 20%, tal como, por ejemplo, al menos el 30%, al menos el 40%, tal como al menos el 50%, tal como, por ejemplo, al menos el 60%, tal como al menos el 70%, tal como, por ejemplo, al menos el 80% o tal como al menos el 100%, en comparación con un cerdo de control, y donde dicho cerdo transgénico y dicho cerdo de control reciben una dieta normal.

15 En una realización preferida, el nivel de glucagón en el cerdo transgénico aumenta en al menos el 10%, en comparación con un cerdo de control, y donde dicho cerdo transgénico y dicho cerdo de control reciben una dieta normal.

20 En otra realización preferida de la presente invención, el cerdo transgénico descrito en esta invención muestra niveles más bajos de insulina, en comparación con un cerdo de control. El término "nivel de insulina", tal como se usa en esta invención, hace referencia a la concentración de insulina en la sangre o en el plasma del cerdo. El nivel de insulina de los cerdos depende de la dieta que reciban los mismos. Los cerdos que reciben una dieta normal mostrarán, por ejemplo, niveles más altos de insulina que los cerdos que reciben una dieta con ayuno (véase la Figura 4C).

25 Por consiguiente, en una realización, el cerdo transgénico muestra niveles más bajos de insulina, en comparación con un cerdo de control, y donde dicho cerdo transgénico y dicho cerdo de control reciben una dieta normal.

30 En una realización, el nivel de insulina del cerdo transgénico disminuye en al menos el 5%, tal como, por ejemplo, al menos el 15%, tal como al menos el 20%, tal como, por ejemplo, al menos el 30%, al menos el 40%, tal como al menos el 50%, tal como, por ejemplo, al menos el 60%, tal como al menos el 70%, tal como, por ejemplo, al menos el 80% o tal como al menos el 100%, en comparación con un cerdo de control, y donde dicho cerdo transgénico y dicho cerdo de control reciben una dieta normal.

En una realización preferida, el nivel de insulina del cerdo transgénico disminuye en al menos el 10%, en comparación con un cerdo de control, y donde dicho cerdo transgénico y dicho cerdo de control reciben una dieta normal.

35 En otra realización preferida de la presente invención, el cerdo transgénico como se describe en esta invención muestra niveles más bajos de péptido C, en comparación con un cerdo de control.

40 El término "nivel de péptido C", como se usa en esta invención, hace referencia a la concentración de péptido C en la sangre o en el plasma del cerdo. El nivel de péptido C de los cerdos depende de la dieta que reciban los cerdos. Los cerdos que reciben una dieta normal mostrarán, por ejemplo, niveles de péptido C más altos que los cerdos en ayunas.

Por consiguiente, en una realización, el cerdo transgénico muestra niveles más bajos de péptido C, en comparación con un cerdo de control, y donde dicho cerdo transgénico y dicho cerdo de control reciben una dieta normal.

45 En una realización, el nivel de péptido C del cerdo transgénico disminuye en al menos el 5%, tal como, por ejemplo, al menos el 15%, tal como al menos el 20%, tal como, por ejemplo, al menos el 30%, al menos el 40%, tal como al menos el 50%, tal como, por ejemplo, al menos el 60%, tal como al menos el 70%, tal como, por ejemplo, al menos el 80% o tal como al menos el 100%, en comparación con un cerdo de control, y donde dicho cerdo transgénico y dicho cerdo de control reciben una dieta normal.

50 En una realización preferida, el nivel de péptido C del cerdo transgénico disminuye en al menos el 10%, en comparación con un cerdo de control, y donde dicho cerdo transgénico y dicho cerdo de control reciben una dieta normal.

55 Se prefiere que los cerdos transgénicos y los cerdos de control reciban la misma dieta y que los niveles de glucosa, insulina, péptido C y/o glucagón en sangre se midan en los mismos puntos de tiempo después de una comida. En una realización preferida, el cerdo transgénico y el cerdo de control tienen la misma edad.

#### Procedimiento para la producción del cerdo transgénico

60 El cerdo transgénico de la presente invención puede producirse usando cualquier técnica en la que se transfiera material genético modificado desde una célula donante a una célula huésped, tal como un ovocito enucleado. Existe

una serie de técnicas, como la introducción de material genético de una célula somática transgénica en un ovocito enucleado, por ejemplo, mediante microinyección o por transferencia nuclear.

5 En una realización de la presente invención, el cerdo transgénico se puede obtener mediante la transferencia nuclear de células somáticas. La transferencia nuclear de células somáticas se refiere a la transferencia del núcleo de una célula somática (cuerpo) o de una célula somática a un óvulo (ovocito) al que se le ha eliminado su propio núcleo (ha sido desnucleado o enucleado).

10 Por consiguiente, otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para producir el cerdo transgénico, como se describe en esta invención, comprendiendo dicho procedimiento:

- i. producir un ovocito que tiene una zona pelúcida parcialmente modificada,
  - ii. separar el ovocito en al menos dos partes, obteniendo un ovocito que tiene un núcleo y al menos un citoplasto,
  - 15 iii. producir una célula donante que comprende un gen de IAPP mutado o parte del mismo,
  - iv. fusionar al menos un citoplasto con la célula donante o el núcleo celular rodeado de membrana,
  - v. obtener un embrión reconstruido,
  - vi. activar el embrión reconstruido para formar un embrión, cultivar dicho embrión y
  - vii. transferir dicho embrión cultivado a un mamífero huésped,
- 20 donde el embrión se desarrolla en un cerdo transgénico.

Se aprecia que los procedimientos para la producción del cerdo transgénico, como se describen en esta invención, no abarcan una etapa quirúrgica efectuada en el cerdo.

25 El gen de IAPP mutado humano es como se define en cualquier otra parte de esta invención. En una realización preferida de la misma, el gen de IAPP mutado humano comprende una mutación S20G.

En una realización preferida, la célula donante no expresa un gen de IAPP de cerdo. En otra realización preferida, la célula donante no expresa un gen de IAPP de cerdo endógeno. En otra realización preferida, el gen de IAPP de cerdo ha sido desactivado.

30 En otra realización, el ovocito de ii) puede separarse en al menos tres partes, obteniendo al menos dos citoplastos. En una realización, el ovocito se separa en dos partes, obteniendo un citoplasto. En otra realización, el ovocito se separa en tres partes, obteniendo dos citoplastos.

### 35 Ovocito

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

40 Los ovocitos según la presente invención se aíslan de los oviductos y/o los ovarios de un cerdo. Normalmente, los ovocitos se recuperan de cerdos fallecidos, aunque también pueden aislarse de los oviductos y/o los ovarios de cerdos vivos. En una realización, los ovocitos se aíslan mediante procedimientos de recuperación del oviducto o procedimientos de recuperación transvaginal. En una realización preferida, los ovocitos se aíslan mediante aspiración.

45 Los ovocitos típicamente maduran en una variedad de medios conocidos para un experto en la materia antes de la enucleación. Los ovocitos también se pueden aislar de los ovarios de un animal recientemente sacrificado o cuando el ovario ha sido congelado y/o descongelado. Preferentemente, los ovocitos están recién aislados de los oviductos.

50 Los ovocitos o citoplastos también pueden criopreservarse antes de su uso. Si bien los expertos en la materia apreciarán que se prefieren los ovocitos maduros y recientemente aislados, también se apreciará que es posible criopreservar los ovocitos después de la cosecha o después de la maduración. Si se usan ovocitos criopreservados, a continuación, primero estos deben descongelarse antes de colocar los ovocitos en el medio de maduración. Los procedimientos para descongelar materiales criopreservados, de modo tal que estén activos después del procedimiento de descongelamiento, son bien conocidos para los expertos en la materia. Sin embargo, en general, la

55 criopreservación de ovocitos y citoplastos es un procedimiento muy exigente, y es especialmente difícil en cerdos, debido a la fragilidad general antes mencionada de los ovocitos y los citoplastos de cerdo, así como también debido al alto contenido de lípidos, el cual los hace muy sensibles al daño por el frío (es decir, la lesión que se produce entre +15 y +5°C durante el procedimiento de enfriamiento y entibiamiento).

60 En otra realización, los ovocitos maduros (metafase II) que han sido madurados in vivo, pueden cosecharse y usarse en los procedimientos de transferencia nuclear descritos en esta invención. Esencialmente, los ovocitos maduros de la metafase II se cosechan quirúrgicamente ya sea de cerdos superovulados o no, de 35 a 48 horas más allá del inicio

del estro o después de la inyección de gonadotropina coriónica humana (hCG) o una hormona similar.

5 Cuando los ovocitos han sido cultivados in vitro, las células del cumulus que rodean a los ovocitos in vivo y hayan podido acumularse se pueden eliminar, a fin de proporcionar ovocitos que estén en una etapa más adecuada de la maduración para la enucleación. Las células de cumulus pueden eliminarse mediante pipeteo o agitación con vórtex, por ejemplo, en presencia de hialuronidasa, en el intervalo del 0,1 al 5%, tal como en el intervalo del 0,2 al 5%, por ejemplo, en el intervalo del 0,5 al 5%, tal como en el intervalo del 0,2 al 3%, por ejemplo, en el intervalo del 0,5 al 3%, tal como en el intervalo del 0,5 al 2%, por ejemplo, en el intervalo del 0,5 al 1%, tal como el 0,5%.

10 La primera etapa en los procedimientos preferidos involucra el aislamiento de un ovocito receptor de un cerdo adecuado. En este sentido, el ovocito se puede obtener de cualquier fuente de cerdo y en cualquier etapa de maduración.

15 Se ha informado que la etapa de maduración del ovocito en la enucleación y la transferencia nuclear es de importancia para el éxito de los procedimientos de transferencia nuclear. Los ovocitos inmaduros (profase I) de los ovarios de cerdo a menudo se cosechan mediante aspiración. A fin de emplear técnicas, como las de ingeniería genética, la transferencia nuclear y la clonación, dichos ovocitos cosechados se maduran preferentemente in vitro antes de que las células de ovocitos puedan usarse como células receptoras para la transferencia nuclear.

20 Preferentemente, la clonación exitosa de embriones de cerdo usa el ovocito de la etapa de metafase II como el ovocito receptor porque se cree que, en esta etapa de maduración, el ovocito puede ser, o es, suficientemente activado para tratar el núcleo introducido como si fuera un espermatozoide fertilizante. Sin embargo, la presente invención se refiere a cualquier etapa de maduración del ovocito que es adecuada para llevar a cabo la transferencia nuclear de células somáticas, embriones, blastoquistes y/o cerdos transgénicos que pueden obtenerse mediante el procedimiento de la  
25 transferencia nuclear de células somáticas de la presente invención.

Por lo general, la maduración in vitro de los ovocitos tiene lugar en un medio de maduración hasta que el ovocito haya alcanzado la etapa de la metafase II o haya extruido el primer cuerpo polar. El tiempo necesario para que un ovocito inmaduro alcance la maduración se llama período de maduración.

30 En una realización preferida de la presente invención, el ovocito es de una cerda o una cerda joven, preferentemente de una cerda.

35 Tanto el donante (una célula somática o el núcleo de una célula somática) como el receptor (el citoplasto) involucrado en el procedimiento de transferencia nuclear de células según la presente invención son cerdos. Del mismo modo, los embriones reconstruidos pueden ser implantados en un cerdo según la presente invención. En esta invención, se describen los diferentes cerdos adecuados como donante, receptor o madre de acogida.

40 El cerdo donante según la presente invención puede ser femenino o masculino. La edad del cerdo puede ser cualquiera, tal como un adulto o, por ejemplo, un feto.

#### Embrión

45 Según la presente invención, un embrión reconstruido (es decir, un solo embrión celular) contiene el material genético de la célula donante. Posteriormente, el embrión reconstruido se divide progresivamente en un embrión multicelular después de la aparición de la mitosis. In vitro, el inicio de la mitosis se induce típicamente mediante la activación, como se describe en esta invención.

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

55 Cuando el embrión contiene alrededor de 12 a 16 células, se le llama "mórula". Posteriormente, el embrión se divide adicionalmente y se forman muchas células, con una cavidad quística llena de fluido dentro de su centro, la cavidad blastocelo. En esta etapa, el embrión se llama "blastoquiste". La etapa de desarrollo del ovocito "fertilizado" en el momento en que está listo para el implante; formado a partir de la mórula y compuesto de una masa interior de células, una cavidad interna y una capa externa de células, a las que se denomina células trofotodermiales.

60 El blastoquiste según la presente invención puede implantarse en el útero de un mamífero huésped, en particular, un cerdo, preferentemente un mini cerdo, y continúa creciendo en un feto y, a continuación, en un animal.

En los procedimientos proporcionados en esta invención para producir mamíferos no humanos transgénicos o

transgénicos, para clonar un mamífero no humano, para cultivar un embrión reconstruido y/o para criopreservar un embrión de cerdo, el embrión debe cultivarse in vitro. Por ejemplo, el embrión puede cultivarse en un cultivo secuencial. Se apreciará que el embrión puede ser un embrión normal o un embrión reconstruido, como se define en otra parte en esta invención.

5

#### Citoplasto

A citoplasto es un ovocito o una parte de un ovocito a la que se le ha eliminado el núcleo. En un procedimiento preferido de la invención, el núcleo de un ovocito se sustituye con una célula donante, que comprende un gen de IAPP mutado, como se define en esta invención.

10

#### Células donantes

Con el término "célula donante" de la presente invención, se hace referencia a una o varias células somáticas derivadas de la línea germinal. La célula donante comprende un gen de IAPP mutado. El gen de IAPP mutado de la célula donante es como se define en otra parte de esta invención.

15

Mediante el término "célula somática" de la presente invención, se hace referencia a cualquier célula (corporal) de un animal en cualquier etapa de desarrollo. Por ejemplo, las células somáticas pueden originarse a partir de un tejido fetal, neonatal o adulto. Las células somáticas especialmente preferidas son las de origen fetal o neonatal. Sin embargo, también se pueden usar las células de una línea germinal. Según 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.

20

En una realización, las células somáticas se seleccionan de entre el grupo que consiste en células epiteliales, células neurales, células epidérmicas, queratinocitos, células hematopoyéticas, melanocitos, condrocitos, linfocitos (linfocitos B y T), eritrocitos, macrófagos, monocitos, células mononucleares, fibroblastos, células del músculo cardíaco y otras células musculares. En una realización preferida, la célula donante es una célula de fibroblasto.

25

Estas pueden obtenerse a partir de diferentes órganos, por ejemplo: piel, pulmón, páncreas, hígado, estómago, intestino, corazón, órganos reproductivos, la vejiga, el riñón, la uretra y otros órganos urinarios.

30

En esta invención, se describen los cerdos de los cuales pueden derivarse las células somáticas. Una realización preferida de la invención es el uso de células somáticas procedentes de la misma especie que el ovocito receptor (citoplasto).

35

Preferentemente, las células somáticas son células de fibroblastos. El fibroblasto puede obtenerse de fetos, lechones recién nacidos y animales adultos. Además, los fibroblastos pueden propagarse fácilmente in vitro. Más preferentemente, las células somáticas son fibroblastos cultivados in vitro de origen fetal o neonatal.

40

En una realización preferida, se modifican las células somáticas. En incluso otra realización preferida adicional de la presente invención, las células somáticas son preferentemente de origen fetal o neonatal o, por ejemplo, de adultos.

Un aspecto de la presente invención se refiere a una célula donante modificada y/o un núcleo de células derivadas del modelo de cerdo modificado, como se describe en esta invención, y/o una célula donante modificada y/o un núcleo celular que comprende un gen de IAPP. Se aprecia que la célula donante modificada puede ser cualquier tipo de tejido, como se describe en otra parte de esta invención.

45

Las células donantes pueden ser transgénicas, mediante cualquier procedimiento estándar conocido en la técnica. La modificación genética puede ser una modificación del ADN genómico mediante delección, inserción, duplicación y/u otras formas de mutación, incluyendo la mutación puntual. La modificación puede hacerse en secuencias de codificación y/o en secuencias que no son de codificación.

50

En la presente invención, un gen de IAPP mutado se inserta en el genoma de la célula donante. Por consiguiente, las construcciones de ADN para la inserción comprenden un gen de IAPP mutado. El gen de IAPP es como se describe en cualquier otra parte de esta invención.

55

Las técnicas adecuadas para la modificación genética de células de mamífero, tales como fibroblastos, incluyen técnicas tales como la adición de genes mediante recombinación no homóloga, la sustitución de genes mediante recombinación homóloga y la edición de genes. Esto puede incluir el uso de la inserción retroviral, la transferencia de transposón y/o técnicas de cromosomas artificiales. La recombinación de ADN no homólogo puede llevarse a cabo, por ejemplo, como se describe en Kragh y col. (2004) *Reprod. Fert. Dev.* 16:290 o Kragh y col. (2004) *Reprod. Fert.*

60

Dev. 16:315, la transferencia de genes en base al transposón puede efectuarse como se describe en Izsvak y col. (1997) Cell 91:501. La sustitución de genes mediante recombinación homóloga involucrar, por ejemplo, las técnicas descritas por Urnow y col. (2005) Nature 435:646. Las técnicas para la edición de genes se han descrito en Andersen y col. (2002) J. Mol. Med. 80:770, Liu y col. (2002) Gene Ther. 9:118 y Sorensen y col. (2005) J. Mol. Med. 83:39. En una realización preferida, la célula donante es transgénica mediante la integración aleatoria de los genes descritos en esta invención en el genoma de la célula donante.

Uso del cerdo transgénico

10 Los cerdos transgénicos según la presente invención constituyen un sistema modelo altamente adecuado para la diabetes mellitus tipo 2, porque, como se describe en esta invención, exhiben las características claves de la diabetes, como, por ejemplo, la alteración de la secreción de insulina y los niveles altos de glucosa en sangre.

El estudio de la diabetes puede involucrar la determinación de la masa de células beta, el nivel de insulina, el nivel de péptido C, el nivel de glucosa y/o el nivel de glucagón de dicho cerdo. La masa de células beta, el nivel de insulina, el nivel de péptido C, el nivel de glucosa y/o el nivel de glucagón de dicho cerdo se pueden determinar a diferentes edades de los cerdos, tal como, por ejemplo, a una edad de 1, 2, 3 o 4 semanas, al mes, a los 2, 3 o 6 meses y/o al año. La masa de células beta, el nivel de insulina, los niveles de péptido C y/o el nivel de glucagón de dicho cerdo pueden determinarse en diferentes puntos de tiempo, como, por ejemplo, a diario, dos veces por semana, de manera semanal, cada dos semanas, mensualmente o cada dos meses.

Por consiguiente, el cerdo transgénico de la presente invención se puede usar como un sistema modelo para la patogénesis de la diabetes mellitus y para el estudio de la aparición, el desarrollo y el progreso de la diabetes.

25 El cerdo transgénico de la presente invención también se puede usar como un modelo para estudiar los tratamientos y/o la prevención de la diabetes mellitus tipo 2. Por consiguiente, un aspecto adicional de la presente descripción se refiere al uso del cerdo transgénico como un sistema modelo para estudiar la terapia, el tratamiento y/o la prevención de la diabetes. Por la presente, los cerdos se pueden usar para identificar medios y procedimientos adecuados para la terapia, el tratamiento y/o la prevención de la diabetes.

30 Los cerdos también se pueden usar para identificar compuestos adecuados para la terapia, el tratamiento y/o la prevención de la diabetes. Dicho procedimiento preferentemente comprende las siguientes etapas

- (i) proporcionar un cerdo transgénico según la presente invención,
- 35 (ii) proporcionar un compuesto a probar,
- (iii) administrar dicho compuesto a dicho cerdo transgénico,
- (iv) determinar los factores de riesgo asociados a la diabetes, como el nivel de insulina, el nivel de glucosa y/o el nivel de glucagón de dicho cerdo transgénico,

40 determinando así el efecto de dicho compuesto en el nivel de insulina, el nivel de glucosa, el nivel de glucagón y/o el nivel de péptido C de dicho cerdo transgénico.

El nivel de insulina, el nivel de glucosa y/o el nivel de glucagón pueden determinarse como se describe en otra parte de esta invención.

45 Preferentemente, dicho compuesto es capaz de mejorar la secreción de insulina y/o disminuir los niveles de glucosa y glucagón.

Las vías de administración preferidas de un compuesto son la oral, la nasal, la subcutánea, la intracutánea, la parenteral, la transdérmica, la tópica, la intravenosa, la intraarterial, la intramuscular, la intraperitoneal o las combinaciones de las mismas.

El cerdo transgénico de la presente invención también se puede usar como un modelo para el estudio del trasplante de células  $\beta$ . Por consiguiente, una realización adicional de la presente descripción se refiere al uso del cerdo transgénico como un sistema modelo para la terapia, el tratamiento y/o la prevención de la diabetes, donde dicha terapia o tratamiento involucra el trasplante de células  $\beta$  de un cerdo donante a dicho cerdo transgénico.

Las células  $\beta$  se pueden aislar de páncreas donantes y, posteriormente, se pueden trasplantar al cerdo transgénico.

60 Un aspecto adicional de la presente descripción se refiere a un procedimiento para estudiar la diabetes mediante la aplicación del cerdo transgénico, como se describe en esta invención.

Otro aspecto se refiere a un procedimiento para el estudio de la terapia, el tratamiento y/o la prevención de la diabetes que comprende las etapas de

- 5
  - i. proporcionar un cerdo transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16,
  - ii. proporcionar un compuesto a probar,
  - iii. administrar dicho compuesto a dicho cerdo transgénico,
  - iv. determinar los factores de riesgo asociados a la diabetes, como el nivel de insulina, el nivel de glucosa y/o el nivel de glucagón de dicho cerdo transgénico,
- 10 determinando así el efecto de dicho compuesto en el nivel de insulina, el nivel de glucosa, el nivel de glucagón y/o el nivel de péptido C de dicho cerdo transgénico.

### Ejemplos

#### 15 *Materiales y procedimientos*

##### Células

- 20 Para el direccionamiento génico, se usaron fibroblastos porcinos primarios de cerdos enanos Göttingen. Las células se cultivaron en DMEM suplementado con un 15% de FBS, 1/100 P/S y 1/100 glutamina. El FGF humano (5ng/ml) se complementó cuando las células estaban en el medio de selección (G418, 1 µg/ml).

##### Construcciones

- 25 La construcción de direccionamiento del cerdo HIP y las TALEN, que se ilustran en la Figura 1, se generaron mediante una PCR y un montaje de portón dorado. Las secuencias dirigidas de TALEN se proporcionan en la Tabla 1.

##### Transfección y Selección

- 30 Todas las transfecciones se efectuaron con el conjunto Nucleofection X. Tres días después de la transfección (2 días después de la división en 96 placas de pocillos), se seleccionaron las células con G418 (1 mg/ml) durante 2 semanas, con un cambio de medio cada 3 a 4 días. Después de la selección, los clones celulares resistentes a G418 se trataron con tripsina y 1/3 fue transferido a placas de 96 pocillos de PCR para la detección por PCR; 1/3 se cultivó en placas de 96 pocillos de cultivo celular, recubiertas con gelatina, para el análisis de transferencia de Southern; 1/3 se cultivó
- 35 en placas de 96 pocillos recubiertas con gelatina para el congelamiento, y estas células se usaron posteriormente como células donantes nucleares para la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT).

##### Recolección de ovocitos y maduración in vitro

- 40 Excepto donde se indique lo contrario, todos los productos químicos para el trabajo embriológico se obtuvieron de Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, EE.UU.). Los complejos de cumulus y ovocitos (COC) se aspiraron de folículos de 2 a 6 mm de ovarios de cerdas derivadas del matadero y se maduraron en grupos de 50 en 400 II en un medio de maduración in vitro (IVM) que consistente en TCM-199 tamponado con bicarbonato (GIBCO BRL, EE.UU.), suplementado con 10% (v/v) de suero de ganado (CS), 10% (v/v) de fluido folicular de cerdo, 10 IU/ml de gonadotropina
- 45 coriónica equina y 5 IU/ml de gonadotropina coriónica humana (Suigonan Vet; Skovlunde, Dinamarca) en el sistema de incubación submarina (SIS) durante 41 a 44 h.

##### Clonación manual y cultivo de embriones

- 50 Los COC fueron tratados con 1 mg/ml de hialuronidasa y se pipetearon vigorosamente para eliminar las células del cumulus unidas a la zona pelúcida. Las zonas pelúcidas de los ovocitos se digirieron parcialmente con 3,3 mg/ml de solución de pronasa disuelta en T33 (T por el tamponado con Hepes TCM199, GIBCO BRL, EE.UU., mientras que el número se refiere a la concentración de CS, que en este caso es del 33%) durante 20 s, lo cual fue seguido de un lavado rápido en gotas T2 y T20. Los ovocitos con zonas pelúcidas distendidas y ablandadas se alinearon en gotas
- 55 T2 gotas suplementadas con 2,5 µg/ml de citocalasina B. Con una pipeta de vidrio finamente extraída y pulida al fuego, los ovocitos se rotaron para localizar el cuerpo polar. La bisección orientada se efectuó manualmente con cuchillas de seccionamiento ultra filosas (AB Technology, Pullman, WA, EE.UU.) bajo un microscopio estereoscópico. Menos de la mitad del citoplasma cerca del cuerpo polar se eliminó del citoplasto putativo restante. Los fibroblastos (5D1) se tripsinizaron y se resuspendieron en 20 µl de T2. La fusión se efectuó en dos etapas, donde la segunda etapa incluía
- 60 la iniciación de la activación. Para la primera etapa, el 50% de los citoplastos disponibles se transfirieron a 1 mg/ml de fitohemaglutinina (PHA; ICN Pharmaceuticals, Girraween, Australia) disuelta en T0 durante 3 s, y, a continuación, cada uno de ellos se dejó caer rápidamente sobre una sola célula de fibroblastos. Después de la unión, los pares de

citoplastos y fibroblastos se equilibraron en un medio de fusión (manitol 0,3 M y 0,01% de alcohol de polivinilo; PVA) durante 10 s y se transfirieron a una cámara de fusión (cámara de fusión de 0,5 mm, BTX MicroSlide, modelo 450; BTX, San Diego, CA, EE.UU.). Usando CA de 0,06 kV/cm y 700 kHz, los pares se alinearon con el hilo de la cámara de fusión con las células somáticas más alejados del hilo. A continuación, los mismos se fusionaron con un pulso de CC de 2,0 kV/cm para 9  $\mu$ s. Después del pulso de CC, los pares se eliminaron cuidadosamente desde el hilo, se transfirieron a gotas T10 y se incubaron adicionalmente para observar si se había producido la fusión. Aproximadamente 1 h después de la primera fusión, cada par se fusionó con otro citoplasto en un medio de activación (0,3 M manitol, 0,1 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub> y 0,1% de PVA). Mediante el uso de un AC de 0,06 kV/cm y 700 kHz, un par fusionado y uno citoplasto se alinearon a un hilo de la cámara de fusión, con pares fusionados en contacto con el hilo. Un solo pulso de CC de 0,86 kV/cm se aplicó durante 80  $\mu$ s. Tras observar la fusión en las gotas T10, los embriones reconstruidos se transfirieron a PZM-3 suplementado con 5  $\mu$ g/ml de citocalasina B y 10  $\mu$ g/ml de cicloheximida. Después de una incubación de 4 h a 38,5°C en un 5% de CO<sub>2</sub>, un 5% de O<sub>2</sub> y un 90% de N<sub>2</sub> con la humedad máxima, los embriones se lavaron tres veces y se cultivaron en PZM-3 (Yoshioka K y col., (2002), Biol Reprod 66:112-119) usando el pocillo del sistema de pocillos (Vajta G y col., (2000), Mol Reprod Dev 55:256-264).

15 **Transferencia de embrión**

Los blastocistos frescos D5 y D6 fueron transferidos quirúrgicamente en ambos cuernos uterinos de cerdas Landrace danesas el cuarto día posterior al destete. El embarazo fue diagnosticado por ultrasonografía el día 21 y confirmado cada dos semanas. El parto fue inducido con una inyección de prostaglandina, en los casos en que la cerda no mostraba signos de parto tan tarde como el día 121. Todos los animales fueron alojados y atendidos en estricta conformidad con las propuestas de investigación con animales, las cuales son revisadas por el Instituto Danés de Ciencias Agrícolas y el Centro Danés de Bioética y Evaluación de Riesgos. Se obtuvo el permiso experimental del Comité de Ética Animal danés.

25 **Ejemplo 1: Generación de los cerdos HIP.**

Los cerdos de IAPP humano (cerdos HIP) comprenden un gen mutado de IAAP que comprende la mutación S20G, tal como se describe en otra parte de esta invención. Se generó una construcción de direccionamiento de cerdo HIP (SEQ ID NO: 13), como se ilustra en la Figura 1. La estrategia combina una desactivación de pIAPP completa con activación de hIAPP dirigida (pIAPPKO; hIAPPKI) usando TALEN de pIAPP junto con la construcción de direccionamiento. Un par de TALEN con la eficiencia de escisión de aproximadamente el 5%, medida con el ensayo de T7E1 (Figura 2), crearon rupturas bicatenarias de ADN en el intrón 2 del gen de pIAPP para mejorar la eficiencia de direccionamiento mediante recombinación homóloga (HR). La construcción de direccionamiento se diseñó de manera tal que permitiese sustituir, tras la recombinación homóloga, el gen de pIAPP endógeno por un transgén, donde la expresión de hIAPP está regulada por el promotor de insulina de rata 2 (RIP2). El transgén también lleva un casete de selección de antibióticos que, después de su uso, puede eliminarse mediante la recombinasa Cre.

Transfectamos fibroblastos primarios porcinos (mini cerdos Göttingen) con la construcción de direccionamiento y los vectores TALEN de pIAPP. Se hallaron clones celulares dirigidos mediante detección por PCR de los clones celulares seleccionados debido a la resistencia a los antibióticos (geneticina, G418). Se seleccionaron y agruparon 24 clones unicelulares, que son pIAPPKO;hIAPPKI. Las células agrupadas se usaron como donantes nucleares para generar los cerdos clonados mediante HMC.

45 En la primera ronda de HMC, se generó un total de 5 cerdos HIP, 2 nacidos vivos y 3 nacidos muertos de tres transferencias. Se confirmó que uno de los cerdos HIP nacidos vivos carecía de los genes de IAPP porcinos endógenos y que transportaba una copia del gen de IAAP humano (S20G) (cerdo HIP 609 en la Figura 3). Los fibroblastos de este cerdo HIP 609 se usaron como células donantes nucleares para generar más cerdos HIP (un procedimiento llamado reclonación). De cinco transferencias, se generó un total de 27 cerdos HIP nacidos vivos con el genotipo correcto.

**Ejemplo 2: Caracterización y validación de la DM2 en los cerdos HIP**

En los cerdos HIP, se observaron muchos fenotipos anormales, tales como ceguera, inflamación, infección y malformaciones de órganos de menor importancia. El peso corporal y la glucosa en sangre total se monitorizaron en los cerdos HIP de manera semanal en el primer mes y, en lo sucesivo, cada dos semanas. Algunos cerdos HIP fueron ganando peso bien, mientras que otros no prosperaron. Se sacrificaron los cerdos que habían perdido peso y que mostraban signos de sufrimiento. En los cerdos HIP, se monitorizó la glucosa en sangre de manera semanal durante el primer mes y después cada dos semanas. Se observaron niveles de glucosa altos, aunque fluctuantes, en todos los cerdos HIP. Después del destete, la glucosa en sangre en los cerdos HIP fue cada vez más normal debido la dieta estricta que recibían cada día (Figura 4). Nuestros datos de los primeros meses muestran que estos cerdos HIP tienen niveles significativamente más altos de glucagón y niveles de péptido C más bajos, en comparación con los cerdos de

control, lo que sugiere que la modificación genética que introdujimos en los cerdos ya había tenido efectos en los cerdos jóvenes (Figura 5). Los cerdos se inseminarán tan pronto como llegan a la madurez sexual.

Se determinaron los niveles de glucosa, fructosamina (FRA), glucagón, insulina y péptido C (Figura 5). La Figura 5A ilustra que el nivel de glucosa promedio aumenta en los cerdos HIP a la edad de 1, 2 y 3 meses, en comparación con los cerdos de control. La figura 5A ilustra que el nivel promedio de fructosamina aumenta en los cerdos HIP a los 3 meses, en comparación con los cerdos de control, mientras que la Figura 5C demuestra que el nivel promedio de glucagón aumenta en los cerdos HIP, cuando se los compara con los cerdos de control. La Figura 5D demuestra que, en los cerdos HIP, se reduce el nivel promedio de insulina, en comparación con los cerdos de control, y la Figura 5E muestra que el nivel promedio de péptido C disminuye en los cerdos HIP, cuando se los compara con los cerdos de control. El nivel promedio de péptido C, en la mayoría de los cerdos HIP fue demasiado bajo como para ser medido desde la edad de 2 meses. Para la ilustración, estos resultados se representaron por debajo del nivel cero (Figura 5E).

Además, se determinaron los niveles sin ayuno de glucosa, fructosamina, glucagón, insulina y péptido C en todos los cerdos HIP heterocigotos del compuesto F0 (IAPP<sup>S20G</sup>/IAPP<sup>KO</sup>) a la edad de 1, 2, 3, 5, 7 y 9 meses y se compararon con los niveles de los cerdos de tipo salvaje correspondientes. Todos los cerdos fueron alimentados con una dieta normal.

Como se muestra la figura 1, el nivel de glucosa en los cerdos HIP fue estadística y significativamente más alto en los cerdos HIP a la edad de 1 y 7 meses. El nivel de fructosamina en el plasma, las proteínas séricas glicosiladas, fue significativamente mayor en los cerdos de control que en los cerdos HIP a la edad de 1, 7, y 9 meses. Esto podría ser debido al bajo nivel de albúmina en el plasma en los cerdos HIP (datos no mostrados). El glucagón es una hormona que eleva el nivel de glucosa en sangre. Se observó un alto nivel de glucagón variable en los cerdos HIP, con un nivel significativamente mayor a la edad de 1, 3, y 7 meses, en comparación con los cerdos control. Además, se midieron las dos hormonas peptídicas, la insulina y el péptido C. Estas hormonas actúan reduciendo el nivel de glucosa en sangre. En los cerdos HIP, se halló un bajo nivel de insulina a la edad de 2 y 9 meses. Lo más sorprendente fue que hallamos que el nivel de péptido C en la mayoría de los cerdos HIP fue demasiado bajo como para ser detectado, lo que indica un defecto en la producción o secreción de péptido C en los cerdos HIP.

Los resultados demuestran que la modificación genética del gen de IAPP ha afectado a las funciones pancreáticas normales en los cerdos HIP.

#### Conclusión

En conclusión, se ha generado un modelo porcino innovador (cerdos HIP) con una fuerte susceptibilidad hacia la diabetes. El cerdo HIP carece del gen de IAPP porcino endógeno, y comprende el gen de IAPP humano que tiene la mutación S20G, tal como se describe en otra parte de esta invención. Los datos demuestran que la disfunción pancreática ya se desarrolla en cerdos HIP muy pequeños.

#### 40 **SECUENCIAS**

SEQ ID NO:1

Seuencia de nucleótidos de IAPP humano, que codifica un péptido de 89 aminoácidos (péptido señal de 22 aminoácidos + proamilina de 67 aminoácidos).

```
ATGGGCATCCTGAAGCTGCAAGTATTTCTCATTGTGCTCTCTGTTGCATTGAACCA
TCTGAAAGCTACACCCATTGAAAGTCATCAGGTGGAAAAGCGGAAATGCAACACT
GCCACATGTGCAACGCAGCGCCTGGCAAATTTTTAGTTCATTCCaGCAACAACTT
TGGTGCCATTCTCTCATCTACCAACGTGGGATCCAATACATATGGCAAGAGGAAT
GCAGTAGAGGTTTTAAAGAGAGAGCCACTGAATTACTTGCCCCTTTAG
```

SEQ ID NO:2

50 Seuencia de nucleótidos de IAPP humano, que codifica la proamilina de 67 aminoácidos.

ACACCCATTGAAAGTCATCAGGTGGAAAAGCGGAAATGCAACACTGCCACATGTG  
 CAACGCAGCGCCTGGCAAATTTTTTAGTTCATTCC**aGCA**CAACTTTGGTGCCATT  
 CTCTCATCTACCAACGTGGGATCCAATACATATGGCAAGAGGAATGCAGTAGAGG  
 TTTAAAGAGAGAGCCACTGAATTACTTGCCCCTTTAG

SEQ ID NO:3

- 5 Secuencia de nucleótidos de IAPP humano, que codifica el péptido de amilina de 37 aminoácidos.

AAATGCAACACTGCCACATGTGCAACGCAGCGCCTGGCAAATTTTTTAGTTCATTC  
**CaGCA**CAACTTTGGTGCCATTCTCTCATCTACCAACGTGGGATCCAATACATAT

SEQ ID NO:4

- 10 Secuencia de nucleótidos de IAPP humano, que codifica un péptido de 89 aminoácidos (péptido señal de 22 aminoácidos + proamilina de 67 aminoácidos) y que comprende una mutación A157G (subrayada y en negrita).

ATGGGCATCCTGAAGCTGCAAGTATTTCTCATTGTGCTCTCTGTTGCATTGAACCA  
 TCTGAAAGCTACACCCATTGAAAGTCATCAGGTGGAAAAGCGGAAATGCAACACT  
 GCCACATGTGCAACGCAGCGCCTGGCAAATTTTTTAGTTCATTCC**gGCA**CAACTT  
 TGGTGCCATTCTCTCATCTACCAACGTGGGATCCAATACATATGGCAAGAGGAAT  
 GCAGTAGAGGTTTTAAAGAGAGAGCCACTGAATTACTTGCCCCTTTAG

- 15 SEQ ID NO:5

Secuencia de nucleótidos de IAPP humano, que codifica la proamilina de 67 aminoácidos y que comprende una mutación A91G (subrayada y en negrita).

- 20 ACACCCATTGAAAGTCATCAGGTGGAAAAGCGGAAATGCAACACTGCCACATGTG  
 CAACGCAGCGCCTGGCAAATTTTTTAGTTCATTCC**gGCA**CAACTTTGGTGCCATT  
 CTCTCATCTACCAACGTGGGATCCAATACATATGGCAAGAGGAATGCAGTAGAGG  
 TTTAAAGAGAGAGCCACTGAATTACTTGCCCCTTTAG

SEQ ID NO:6

- 25 Secuencia de nucleótidos de IAPP humano que codifica el péptido de amilina de 37 aminoácidos y que comprende una mutación A58G (subrayada y en negrita).

AAATGCAACACTGCCACATGTGCAACGCAGCGCCTGGCAAATTTTTTAGTTCATTC  
**CgGCA**CAACTTTGGTGCCATTCTCTCATCTACCAACGTGGGATCCAATACATAT

- 30 SEQ ID NO:7

Secuencia de aminoácidos de IAPP humano (péptido señal de 22 aminoácidos + proamilina de 67 aminoácidos).

GILKLQVFLIVLSVALNHLKATPIESHQVEKRKCNTATCATQRLANFLVHSS**NN**FGAILS  
 STNVGSNTYGKRNAVEVLKREPLNYLPL

- 35

## ES 2 784 643 T3

SEQ ID NO:8

Secuencia de aminoácidos de proamilina humana.

PIESHQVEKRKCN**T**ATCATQRLANFLVHSS**N**NFGAILSSTNVGSNTY**G**KR**N**AVEVLKR

5 EPLNYLPL

SEQ ID NO:9

Secuencia de aminoácidos de la amilina humana

10

KCN**T**ATCATQRLANFLVHSS**N**NFGAILSSTNVGSNTY

SEQ ID NO:10

15 Secuencia de aminoácidos de IAPP humano (péptido señal de 22 aminoácidos + proamilina de 67 aminoácidos) que comprende la mutación S20G (indicada en negrita).

GILKLQVFLIVLSVALNHLKATPIESHQVEKRKCN**T**ATCATQRLANFLVHSS**G**N**N**F**G**AILS  
STNVGSNTY**G**KR**N**AVEVLKREPLNYLPL

20 SEQ ID NO:11

Secuencia de aminoácidos de proamilina humana que comprende la mutación S20G (subrayada en negrita).

PIESHQVEKRKCN**T**ATCATQRLANFLVHSS**G**NNFGAILSSTNVGSNTY**G**KR**N**AVEVLKR  
EPLNYLPL

25

SEQ ID NO:12

Secuencia de aminoácidos de la amilina humana que comprende la mutación S20G (indicada en negrita)

30 KCN**T**ATCATQRLANFLVHSS**G**N**N**F**G**AILSSTNVGSNTY

SEQ ID NO:13

35 Secuencia de nucleótidos de la construcción de direccionamiento de cerdo HIP, la cual comprende el gen mutado de IAPP humano con una mutación S20G. La secuencia de hIAPP se muestra en negrita y la mutación S20G está subrayada.

CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCC  
GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG  
AGAGGGAGTGGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCTGCGGCCGCTCTGTACAGGA  
CAAGATATGAGAGTATATACCATAAGGTTTTACATGAATTCTTAAAATACTTACTCT  
TAGCAAAGACACAGATAATGAAGTACTCCCCATACAAAATAAATACATTGAGATAA  
AATCTACTGCATTTTGCCTCAAATTACATATATCCACTGGCATCTGGACGTTGAAT  
GAAGCTTCATACCTCTTGTCCACTTTATAATTAACCTAAATTTAACTAATATTTTGGT  
TCCTGTAGAGCTGAAAATGAAAACATTTCTCTAGAGTTCCTAATAATCCGCAAAAG  
GCAATGTTATAATTCTGTATCAATTTCCAGGGCTATTGTGAGAGCGCACTGAAACA  
AAAGGTCATACAAACATACGGAATTAACATAAATAAATTAACGCAAATAAATTCTGA  
GATGTTACAATTGAAATGAATTATTTAACCTGGTTATCACTTCTGACTTATCCATAA  
TATTTCTATGCAGTTATTCCGGGTGGCTGCGTAATATGGTGACTATTAATACCATT  
GACATAAAAAGCCTTTTGGTTTTAACACCTAACCCAATCCTATCAGTAAAAGTCT  
GAAAGCATAGGAACCAAGCAGGGGTATAAGAACATGGTAATCTTCATGTATTTATG  
CTAAGAGTAATAGAATTCCACCCTACAATAGTCAGAGTACCTGAACAGGAATTTG  
ATTCCCTTGAGAATTTATAATATCTGACATTTCTCTTAACACTCTTGATTCAAGATCT  
CCAAGAACTTAACAGAAATTAACATTGGTCATTCTGTGTGAAATGTGTAGGAAGTG

AATATCTATTTTTTTAATTCAGCAAGTTCAGGTTACTTATTAGTTTACATTCTAAAT  
 CCTTTTTTAAAAAATTGGGAAATAGATTCACAAATATTTTTAAAAAATAGAAGACAA  
 AGATATTTTTTAATTATTATTTTTCTGGAATATATTCTGAATTTCCAAAGAAAGGATTGT  
 ACTGGGAAATTCACAAGTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCCCCAACCAC  
 TCCAAGTGGAGGCTGAGAAAGTTTTGTAGCTGGGTAGAGTATGTACTAAGAGAT  
 GGAGACAGCTGGCTCTGAGCTCTGAAGCAAGCACCTCTTATGGAGAGTTGCTGAC  
 CTTCAGGTGCAAATCTAAGATACTACAGGAGAATACACCATGGGGCTTCAGCCCA  
 GTTGAAGTCCCGAGTGGGCTATGGGTTTGTGGAAGGAGAGATAGAAGAGAAGGGA  
 CCTTCTTCTTGAATTCTGCTTTCCTTCTACCTCTGAGGGTGAGCTGGGGTCTCAG  
 CTGAGGTGAGGACACAGCTATCAGTGGGAACTGTGAAACAACAGTTCAAGGGACA  
 AAGTTACTAGGTCCCCCAACAACCTGCAGCCTCCTGGGGAATGATGTGGAAAAATG  
 CTCAGCCAAGGACAAAGAAGGCCTCACCTCTCTGAGACAATGTCCCCTGCTGTG  
 AACTGGTTCATCAGGCCACCCAGGAGCCCCTATTAAGACTCTAATTACCCTAAGG  
 CTAAGTAGAGGTGTTGTTGTCCAATGAGCACTTTCTGCAGACCTAGCACCAGGCA  
 AGTGTGTTGGAACTGCAGCTTCAGCCCCTCTGGCCATCTGCTGATCCACCCTTAA  
 TGGGACAAACAGCAAAGTCCAGGGGTGAGGGGGGGGGTCTTTGGACTATAAAG  
 CTAGTGGGGATTGAGTAACCCCTCTAAAGCTTGATGGGGCTGAGAAGCTTCAGGG  
 TGAGTTTGGGGACCCTTGATTGTTCTTTCTTTTTCGCTATTGAAAATTCATGTTAT  
 ATGGAGGGGGCAAAGTTTTTCAGGGTGTGTTTGAATGGGAAGATGTCCCTTGTA  
 TCACCATGGACCCTCATGATAATTTTGTTCCTTTCACTTTCTACTCTGTTGACAACC  
 ATTGTCTCCTCTTATTTTTCTTTTCATTTTCTGTAACCTTTTTCGTTAACTTTAGCTTG  
 CATTTGTAACGAATTTTTAAATTCATTTTGTGTTATTTGTCAGATTGTAAGTACTTTC  
 TCTAATCACTTTTTTTTTCAAGGCAATCAGGGTATATTATATTGTACTTCAGCACAGT  
 TTTAGAGAACAATTGTTATAATTAATGATAAGGTAGAATATTTCTGCATATAAATTC  
 TGGCTGGCGTGGAAATATTCTTATTGGTAGAAACAACCTACATCCTGGTCATCATCC  
 TGCCTTTCTCTTTATGGTTACAATGATATACACTGTTTGAGATGAGGATAAAATACT  
 CTGAGTCCAAACCGGGCCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTTA  
 CAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTGTTGTGCTGTCTCATCATTTTTGGCAAAGAATT  
 CACCATGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACTTC**GGCATCCTGAAGCTG**  
**CAAGTATTTCTCATTGTGCTCTCTGTTGCATTGAACCATCTGAAAGCTACACCCA**  
**TTGAAAGTCATCAGGTGGAAAAGCGGAAATGCAACACTGCCACATGTGCAACG**  
**CAGCGCCTGGCAAATTTTTAGTTCATTCCgGCAACAACTTTGGTGCCATTCTCT**  
**CATCTACCAACGTGGGATCCAATACATATGGCAAGAGGAATGCAGTAGAGGTTT**  
**TAAAGAGAGAGCCACTGAATTACTTGCCCTTTAGAAAGGGCGAATAACGTGCTA**  
 AAGGGAACAAAAGCTGGAGCTCCACCGCGGATAACTTCGTATAGCATAACATTATA

CGAAGTTATCGCGCCCTACCGGGTAGGGGAGGCGCTTTTCCCAAGGCAGTCTGG  
AGCATGCGCTTTAGCAGCCCCGCTGGGCACTTGGCGCTACACAAGTGGCCTCTG  
GCCTCGCACACATTCCACATCCACCGGTAGGCGCCAACCGGCTCCGTTCTTTGGT  
GGCCCCTTCGCGCCACCTTCTACTCCTCCCCTAGTCAGGAAGTTCCCCCCCGCC  
CCGCAGCTCGCGTCGTGCAGGACGTGACAAATGGAAGTAGCACGTCTCACTAGT  
CTCGTGCAGATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGAAGCGGGTAGGCCTTTGGGGC  
AGCGGCCAATAGCAGCTTTGGCTCCTTCGCTTTTCTGGGCTCAGAGGCTGGGAAG  
GGGTGGGTCCGGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGCTCAGGGGCGGGGCGGGCGC  
CCGAAGTCTCCGGAAGCCCGCATTCTGCACGCTTCAAAGCGCACGTCTGC  
CGCGCTGTTCTCCTCTTCTCATCTCCGGGCCTTTTCGACCTGCAGCCAATATGGG  
ATCGGCCATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGA  
GAGGCTATTTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGC  
CGTGTTCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCT  
GTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGG  
CCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAA  
GGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACC  
TTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATAC  
GCTTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGA  
GCACGTA CT CGGATGGAAGCCGGTCTTGTCAATCAGGATGATCTGGACGAAGAG  
CATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCC  
CGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCAT  
GGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGC  
GGATCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGC  
GGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCG  
CAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGATATCGTCGACG  
ATATCATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATTGAATTCCTGCAGCCCG  
GGGGATCCGCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTT  
GGAATAAGGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCTT  
TTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAG  
GGGTCTTTCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAA  
GCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGACCCTTTGCA  
GGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGT  
GTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGA  
TAGTTGTGGAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAA  
GGATGCCCAGAAGGTACCCCATTTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTCGGTGCAC

ES 2 784 643 T3

ATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCAC  
GGGGACGTGGTTTTCTTTGAAAAACACGATGATAATATGGCCACAGAAGTTCCTA  
TTcttcaataGTATAGGAACTTCACCATGGTGCACGTGGATCCAAAAAGAAGAGAA  
AGGTAGATCCAAAAAGAAGAGAAAGGTAGATCCAAAAAGAAGAGAAAGGTACA  
CGTGTCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCT  
GGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGG  
GCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCG  
GCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGC  
AGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGG  
CATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAA  
CTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCAT  
CGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCT  
GGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAC  
GGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAG  
CTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTG  
CCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAG  
AAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTC  
GGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGGTCAACGCACCTCTAAAGTTCATTGCTT  
TATGTATAAATACCCTAGTGATTTCTGTATAATTTAACAGTACCTTTTTTCAATTTCTA  
AAGTGAATATGTGAATCTGTGTGTCCCATGTTTGCTGCCAGTACATGTAACTGTT  
GTGCTGAGAATTGTTTTAAATTAATACTAATCAAGATCCCTTAATAAAAAGGCAAA  
GTCTTTACAAATGAAATATTCTTCCTGTAGATTTTTATTTAAAAAAAAAAAAACATTT  
TAAAAAGTCATTTATTTTTCTGTATATTTATGACCTGAGTTTTCCAACAAAGGAG  
GAAATGGTTGTTGGCAACTTGGTAACTGTAAACAGCTAATAGTAAAGTTATGATG  
CTGAACATTAGAAAATCAGCAATTATTAGTACCCTTGATAAGCAATCTTTTTGCAT  
TCAATTTATGAAATGAGATAAAATGTTGTTTTAAAAAAATAAAGACTGCTCCTGACT  
CAGTCAAATATTTTTTAAACTCTGGTTTTTGTGTACTTGCTGATACTAAGAGTTT  
ACTTAAAAATATAAAACCAATTTGCGTCCATGAGGATTTCACTGTGTTTCATCAAC  
AGTGGGCTTTTATTAATGTATATGCCTTTTATTCTATTTAAGTGGCTTTCAGCAA  
TCTTTGCATATTTTTATACAGAGTGCTGTACCAGCAAGTACAACAAAAAGCAAAA  
ACAACAACTTTATAATTTGGTAATCTTAAGGCATACTTCATAAGGGGAAATTTTTA  
TGTATTTATACATAAATACCCTAGTGATTTCTGTTACTATGAACTTATTCCAACC  
AGGAGACTTGAGAAGGAAAGAAGCTATTACCTTGATAAAATAGGTATTAATAGTAG  
ATATTATTCTAAAGTTTATTCATTAATTTATTATCAAAGTGAAACGTGAACAAAATC  
AGAATTATTTCTCAGTTGATATTCCTAGGCCAGTAGGAATCTAAGTATATGAACCT

TGGGAATACGAGACTGCCATGGAGTGCCCCAAATACTTTCCCTGGTTTCTCATAAT  
 TACCTTGTGAAATAATAATGAGCTTTTCTTTATTGATATAACTGGAGATAGCAACAG  
 TAAGTTTTGGTGGCTAATTTTCATCCCATCTTTTCTCATTGTATCTACCATGCTTGAA  
 ATCATAGGTACCCTTGGATAATCTTCCAATACTTATGTACATGCTACAAATTATAT  
 TTTATTGAAGTTTTAGAAACACAAATGATTCTTCTATCTCCCATGTTGCAATACAGA  
 GTCAGGACAAATAATTTATTAATTAATACTGTGTTTAAAATTTCTAGGGCCCTTAAA  
 AAAAAAGACAAAGGGAGTTCCCATCGTGGCTCAGCAGAAACAAATCAGACTGGCA  
 TCCATGAGGAAGCAGGTTCCATCCCTGGCTTTGCTCAGTGGGTTGAGGATCTGGC  
 GTTGCTGTGAGCTGTTGGGTAGATTGCAGACATGGCTCAGATCTGACATTGCTGT  
 GGCTGTGGTGTAGGCTGGCGGCTACAGCTCTGATTTGACCCCTAGTCTGGGAAT  
 GGCCATATGCCATGGGTGTGCGCCTTAAAAAAAAGAAAAGAAAACAACACTAGAAAT  
 TCTCCTGATCATTGTGAGATGACATTCTGCAATAAGCCTCATACTTCGCTGAGGGG  
 TTGAATATCATTACCTCATGAAATATGCTTAGATAAAGAATACCTTTTTGGTTAAGAG  
 TAGAAAAGCCTATGAGTCTAAAGCTCCTTAGGCTGAGTGCAGAGAGAGCTTTTCAT  
 GCAAAGTAGAATATTTTCTTTTTCTAACCATTATCCCCTCACCCCTCTGGGCATTTAC  
 ACCCAGGTTCTACTCAAATGCCACATTCTGCAAGGAAC TTGTCTGAACTTACATAG  
 ATTTTTATCTATATTTTCTGACACCAGTTTATTGACACATGCGGCCGCGAGGAACCC  
 CTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCC  
 GGGCGACCAAAGGTGCGCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAG  
 CGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGGGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTAC  
 GCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATACGTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCT  
 GTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCT  
 ACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTTCTCCCTTCCTTTCTCG  
 CCACGTTGCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTT  
 CCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTT  
 CACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTC  
 CACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCT  
 CGGGCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTGGCCTATTGGTTAAAAA  
 ATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAA  
 TTTTATGGTGC ACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCC  
 CGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCA  
 TCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTT  
 CACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTT  
 ATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGG  
 GAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAATACATTCAAATATGTATC

CGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGT  
ATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCCGCTTATTCCCTTTTTTTCGCGCATTTCGCTT  
CCTGTTTTTTCGTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTT  
GGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAG  
AGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATG  
TGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTTCGCCGCAT  
ACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTA  
CGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAA  
CACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGC  
TTTTTTCGACAACATGGGGGATCATGTAAGTTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAG  
CTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGG  
CAACAACGTTGCGCAAACCTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAA  
CAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGG  
CCCTTCCGGCTGGCTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTC  
TCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTT  
ATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTG  
AGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAGTGTGACACCAAGTTTACTCATAT  
ATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCAATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCC  
TTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGT  
CAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTA  
ATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTCCGGG  
ATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGAT  
ACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTG  
TAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAG  
TGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAG  
GCGCAGCGGTTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCG  
AACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACG  
CTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTTCGGAAC  
AGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCC  
TGTCGGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGG  
GGGCGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCC  
TTTTGCTGGCCTTTTCTCACATGT

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> Universidad de Aarhus

5 <120> Modelo de cerdo para la diabetes

<130> P3593PC00

<160> 13

10

<170> Versión de PatentIn 3.5

<210> 1

15 <211> 270

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<400> 1

```

atgggcatcc tgaagctgca agtattttctc attgtgctct ctggtgcatt gaaccatctg      60
aaagctacac ccattgaaag tcatcaggtg gaaaagcgga aatgcaacac tgccacatgt      120
gcaacgcagc gcctggcaaa ttttttagtt cattccagca acaactttgg tgccattctc      180
tcatctacca acgtgggatc caatacatat ggcaagagga atgcagtaga ggttttaaag      240
agagagccac tgaattactt gccctttag                                     270
    
```

25 <210> 2

<211> 204

<212> DNA

30

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

acaccattg aaagtcatca ggtggaaaag cggaaatgca aactgccac atgtgcaacg      60
cagcgcctgg caaatTTTTT agttcattcc agcaacaact ttggtgccat tctctcatct      120
accaacgtgg gatccaatac atatggcaag aggaatgcag tagaggTTTT aaagagagag      180
ccactgaatt acttgcccct ttag                                     204
    
```

<210> 3

<211> 111

40

<212> DNA

<213> Homo sapiens

45 <400> 3

```

aatgcaaca ctgccacatg tgcaacgcag cgcctggcaa atTTTTtagt tcattccagc      60
aacaactttg gtgccattct ctcatctacc aacgtgggat ccaatacata t                                     111
    
```

ES 2 784 643 T3

<210> 4

<211> 270

5 <212> DNA

<213> Homo sapiens

10 <400> 4

atgggcatcc tgaagctgca agtatttctc attgtgctct ctggtgcatt gaaccatctg	60
aaagctacac ccattgaaag tcatcaggtg gaaaagcgga aatgcaacac tgccacatgt	120
gcaacgcagc gcctggcaaa ttttttagtt cattccggca acaactttgg tgccattctc	180
tcatctacca acgtgggatc caatacatat ggcaagagga atgcagtaga ggttttaaag	240
agagagccac tgaattactt gccctttag	270

15 <210> 5

<211> 204

20 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

acaccattg aaagtcatca ggtggaaaag cggaaatgca aactgccac atgtgcaacg	60
cagcgctgg caaatTTTTT agttcattcc ggcaacaact ttggtgccat tctctcatct	120
accaacgtgg gatccaatac atatggcaag aggaatgcag tagaggTTTT aaagagagag	180
ccactgaatt acttgcccct ttag	204

<210> 6

30 <211> 111

<212> DNA

<213> Homo sapiens

35 <400> 6

aaatgcaaca ctgccacatg tgcaacgcag cgcctggcaa atTTTTtagt tcattccggc	60
aacaactttg gtgccattct ctcatctacc aacgtgggat ccaatacata t	111

40 <210> 7

<211> 87

<212> PRT

45 <213> Homo sapiens

<400> 7

ES 2 784 643 T3

Ile Leu Lys Leu Gln Val Phe Leu Ile Val Leu Ser Val Ala Leu Asn  
 1 5 10 15

His Leu Lys Ala Thr Pro Ile Glu Ser His Gln Val Glu Lys Arg Lys  
 20 25 30

Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val  
 35 40 45

His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val Gly  
 50 55 60

Ser Asn Thr Tyr Gly Lys Arg Asn Ala Val Glu Val Leu Lys Arg Glu  
 65 70 75 80

Pro Leu Asn Tyr Leu Pro Leu

85

5 <210> 8

<211> 66

<212> PRT

10

<213> Homo sapiens

<400> 8

Pro Ile Glu Ser His Gln Val Glu Lys Arg Lys Cys Asn Thr Ala Thr  
 1 5 10 15

Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu Val His Ser Ser Asn Asn  
 20 25 30

Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val Gly Ser Asn Thr Tyr Gly  
 35 40 45

Lys Arg Asn Ala Val Glu Val Leu Lys Arg Glu Pro Leu Asn Tyr Leu  
 50 55 60

Pro Leu

15 65

<210> 9

<211> 37

20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 9

ES 2 784 643 T3

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu  
1 5 10 15

Val His Ser Ser Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val  
20 25 30

Gly Ser Asn Thr Tyr  
35

<210> 10

5 <211> 88

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 10

Gly Ile Leu Lys Leu Gln Val Phe Leu Ile Val Leu Ser Val Ala Leu  
1 5 10 15

Asn His Leu Lys Ala Thr Pro Ile Glu Ser His Gln Val Glu Lys Arg  
20 25 30

Lys Cys Asn Thr Ala Thr Cys Ala Thr Gln Arg Leu Ala Asn Phe Leu  
35 40 45

Val His Ser Gly Asn Asn Phe Gly Ala Ile Leu Ser Ser Thr Asn Val  
50 55 60

Gly Ser Asn Thr Tyr Gly Lys Arg Asn Ala Val Glu Val Leu Lys Arg  
65 70 75 80

Glu Pro Leu Asn Tyr Leu Pro Leu  
85

15

<210> 11

<211> 66

20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 11



ES 2 784 643 T3

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgetca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgct	60
gggcgacctt tggtcgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca	120
actccatcac taggggttcc tgcggccgct ctgtacagga caagatatga gagtatatac	180
cataaggttt cacatgaatt cttaaaatac ttactcttag caaagacaca gataatgaag	240
tactccccat acaaaataaa tacattgaga taaaatctac tgcattttgc ctcaaattac	300
atataccac tggcatctgg acgttgaatg aagcttcata cctottgtcc actttataat	360
taacctaaat ttaactaata ttttggttcc tgtagagctg aaaatgaaaa catttctcta	420
gagttcctaa taatccgcaa aaggcaatgt tataattctg tatcaatttc cagggtatt	480
gtgagagcgc actgaaacaa aaggtcatac aaacatacgg aattaacata aataaattaa	540
cgcaaataaa ttctgagatg ttacaattga aatgaattat ttaacctggt taccacttct	600
gacttatcca taatatttct atgcagttat tccgggtggc tgcgtaatat ggtgactatt	660
aataccattg acataaaaag ctttttggtt ttaacaccta acccaatcct atcagtaaaa	720
ctgctgaaag cataggaacc aagcaggggt ataagaacat ggtaatcttc atgtatttat	780
gctaagagta atagaattcc caccctacaa tagtcagagt acctgaacag gaatttgatt	840
cccttgagaa ttataatat ctgacatttc tcttaacact cttgattcaa gatctccaag	900
aacttaacag aaattaacat tggtcattct gtgtgaaatg tgtaggaagt gaatatctat	960
tttttaatt cagcaagttc caggttactt attagtttac attctaaatc cttttttaa	1020
aaaattggga aatagattca caaatatfff aaaaaataga agacaaagat atttttaatt	1080
attattttct ggaatatatt ctgaatttcc aaagaaagga ttgtactggg aaattcaaca	1140
agtgaattcg agctcggtag ccggggatcc cccaaccact ccaagtggag gctgagaaag	1200
gtttttagc tgggtagagt atgtactaag agatggagac agctggctct gagctctgaa	1260
gcaagcacct cttatggaga gttgctgacc ttcaggtgca aatctaagat actacaggag	1320
aatacaccat gggcttcag cccagttgac tcccagtggt gctatgggtt tgtggaagga	1380
gagatagaag agaagggacc tttcttcttg aattctgctt tccttctacc tctgagggtg	1440
agctggggtc tcagctgagg tgaggacaca gctatcagtg ggaactgtga aacaacagtt	1500
caagggacaa agttactag tcccccaaca actgcagcct cctggggaat gatgtgaaa	1560
aatgctcagc caaggacaaa gaaggcctca ccctctctga gacaatgtcc cctgctgtga	1620

ES 2 784 643 T3

actggttcat cagggcacc aggagccctt attaagactc taattaccct aaggctaagt 1680  
agaggtggtt ttgtccaatg agcactttct gcagacctag caccaggcaa gtgtttggaa 1740  
actgcagctt cagcccctct ggccatctgc tgatccaccc ttaatgggac aaacagcaaa 1800  
gtccaggggt cagggggggg gtgctttgga ctataaagct agtggggatt cagtaacccc 1860  
ctctaaagct tgatggggct gagaacttca gggtgagttt ggggaccctt gattgttctt 1920  
tctttttcgc tattgtaaaa ttcattgtat atggaggggg caaagttttc aggggtgtgt 1980  
ttagaatggg aagatgtccc ttgtatcacc atggaccctc atgataattt tgtttctttc 2040  
actttctact ctgttgacaa ccattgtctc ctottatttt cttttcattt tctgtaactt 2100  
tttcgttaaa ctttagcttg catttgtaac gaatttttaa attcactttt gtttatttgt 2160  
cagattgtaa gtactttctc taatcacttt tttttcaagg caatcaggg atattatatt 2220  
gtacttcagc acagttttag agaacaattg ttataattaa atgataaggt agaataattc 2280  
tgcatataaa ttctggctgg cgtggaataa ttcttattgg tagaaacaac tacatcctgg 2340  
tcatcatcct gcctttctct ttatggttac aatgatatac actgtttgag atgaggataa 2400  
aatactctga gtccaaccg gggccctctg ctaaccatgt tcatgccttc ttctctttcc 2460  
tacagctcct gggcaacgtg ctggttgttg tgctgtctca tcattttggc aaagaattca 2520  
ccatgaagtt cctattctct agaaagtata ggaactcgg catcctgaag ctgcaagtat 2580  
ttctcattgt gctctctgtt gcattgaacc atctgaaagc tacaccatt gaaagtcac 2640  
aggtggaaaa gcggaatgc aacactgcca catgtgcaac gcagcgcctg gcaaattttt 2700  
tagttcattc cggcaacaac tttggtgcca ttctctcacc taccaacgtg ggatccaata 2760  
catatggcaa gaggaatgca gtagaggttt taaagagaga gccactgaat tacttgcccc 2820  
tttagaaggg cgaataacgt gctaaaggga acaaaagctg gagctccacc gcggataact 2880  
tcgtatagca tacattatac gaagtatcgc cggcctaccg ggtaggggag gcgcttttcc 2940  
caaggcagtc tggagcatgc gctttagcag ccccgctggg caettggcgc tacacaagtg 3000  
gcctctggcc tcgcacacat tccacatcca ccggtagggc ccaaccggct ccgttctttg 3060  
gtggcccctt cgcgccacct tctactcctc cctagtcag gaagttcccc ccgccccgc 3120  
agctcgcgtc gtgcaggacg tgacaaatgg aagtagcacg tctcactagt ctctgcaga 3180  
tggacagcac cgctgagcaa tgggaagcggg taggcctttg gggcagcggc caatagcagc 3240  
tttggctcct tcgctttctg ggctcagagg ctgggaaggg gtgggtccgg gggcgggctc 3300  
aggggcgggc tcaggggcgg ggccggcgcc cgaaggtcct ccggaagccc ggcattctgc 3360  
acgcttcaa agcgcacgtc tgcccgctg ttctcctctt cctcatctcc gggcctttcg 3420  
acctgcagcc aatatgggat cggccattga acaagatgga ttgcacgag gttctccggc 3480  
cgcttgggtg gagaggctat tcggctatga ctgggcacaa cagacaatcg gctgctctga 3540

ES 2 784 643 T3

tgccgccgtg	ttccggctgt	cagcgcaggg	gcgcccggtt	ctttttgtca	agaccgacct	3600
gtccggtgcc	ctgaatgaac	tgcaggacga	ggcagcgcgg	ctatcgtggc	tggccacgac	3660
gggcgttcc	tgcgcagctg	tgctcgacgt	tgtcactgaa	gcgggaaggg	actggctgct	3720
attgggcgaa	gtgccggggc	aggatctcct	gtcatctcac	cttgctcctg	ccgagaaagt	3780
atccatcatg	gctgatgcaa	tgcggcggct	gcatacgtt	gatccggcta	cctgcccatt	3840
cgaccaccaa	gcgaaacatc	gcacgcagcg	agcacgtact	cggatggaag	ccggtcttgt	3900
caatcaggat	gatctggacg	aagagcatca	ggggctcgcg	ccagccgaac	tgttcgccag	3960
gctcaaggcg	cgcatgcccg	acggcgagga	tctcgtcgtg	acccatggcg	atgcctgctt	4020
gccgaatata	atggtggaaa	atggccgctt	ttctggattc	atcgactgtg	gccggctggg	4080
tgtggcggat	cgctatcagg	acatagcgtt	ggctaccctg	gatattgctg	aagagcttgg	4140
cggcgaatgg	gctgaccgct	tcctcgtgct	ttacggtata	gccgctcccg	attcgcagcg	4200
catcgccttc	tatcgccttc	ttgacgagtt	cttctgagat	atcgtcgcgc	atatcataac	4260
ttcgtatagc	atacattata	cgaagttatt	gaattcctgc	agcccggggg	atccgcccct	4320
ctccctcccc	ccccctaac	gttactggcc	gaagccgctt	ggaataaggc	cggtgtgcgt	4380
ttgtctatat	gttattttcc	acatattgac	cgtcttttgg	caatgtgagg	gcccgaaac	4440
ctggccctgt	cttcttgacg	agcattccta	ggggtctttc	ccctctcgcc	aaaggaatgc	4500
aaggtctggt	gaatgtcgtg	aaggaagcag	ttcctctgga	agcttcttga	agacaaacaa	4560
cgtctgtagc	gaccctttgc	aggcagcggg	acccccacc	tggcgacagc	tgcctctgcg	4620
gccaaaagcc	acgtgtataa	gatacacctg	caaaggcggc	acaaccccag	tgccacgttg	4680
tgagttggat	agttgtggaa	agagtcaaat	ggctctcctc	aagcgtattc	aacaaggggc	4740
tgaaggatgc	ccagaagta	ccccattgta	tgggatctga	tctggggcct	cggtgcacat	4800
gctttacatg	tgtttagtcg	aggtaaaaa	aacgtctagg	ccccccgaac	cacggggacg	4860
tggttttcct	ttgaaaaaca	cgatgataat	atggccacag	aagttcctat	tcttcaata	4920
gtataggaac	ttcacctatg	tgcacgtgga	tccaaaaaag	aagagaaagc	tagatccaaa	4980
aaagaagaga	aaggtagatc	caaaaaagaa	gagaaaggta	cacgtgtcca	tggtagacaa	5040
gggcgaggag	ctgttcaccg	gggtggtgcc	catcctggtc	gagctggacg	gcgacgtaa	5100
cggccacaag	ttcagcgtgt	ccggcgaggg	cgagggcgat	gccacctacg	gcaagctgac	5160
cctgaagttc	atctgcacca	ccggcaagct	gcccgtgcc	tggcccaccc	tcgtgaccac	5220
cctgacctac	ggcgtgcagt	gcttcagccg	ctaccccagc	cacatgaagc	agcacgactt	5280
cttcaagtcc	gccatgcccg	aaggctacgt	ccaggagcgc	accatcttct	tcaaggacga	5340
cggcaactac	aagaccgcgc	ccgaggtgaa	gttcgagggc	gacaccctgg	tgaaccgcat	5400

ES 2 784 643 T3

cgagctgaag ggcacgact tcaaggagga cggcaacatc ctggggcaca agctggagta 5460  
 caactacaac agccacaacg tctatatcat ggccgacaag cagaagaacg gcatcaaggt 5520  
 gaacttcaag atccgccaca acatcgagga cggcagcgtg cagctcgccg accactacca 5580  
 gcagaacacc cccatcggcg acggccccgt gctgctgccc gacaaccact acctgagcac 5640  
 ccagtccgcc ctgagcaaag accccaacga gaagcgcgat cacatggtcc tgctggagtt 5700  
 cgtgaccgcc gccgggatca ctctcggcat ggacgagctg tacaagtaaa ggtcaacgca 5760  
 cctctaaagt tcttattgct ttatgtataa ataccctagt gatttcctgt ataatttaac 5820  
 agtacctttt tcattttctaa agtgaatatg tgaatctgtg tgtcccatgt ttgctgccag 5880  
 tacatgtaaa ctgtttgtgct gagaattggt ttaaaattaa tactaatcaa gatcccttaa 5940  
 taaaaaggca aagtctttac aatgaataa ttcttcctgt agatttttat ttaaaaaaaaa 6000  
 aaaaacattt taaaaagtca tttatttttt cctgtatatt tatgacctga gttttccaac 6060  
 aaaggaggaa atggttgttg gcaacttggg aaactgtaaa cagctaatag taaagttatg 6120  
 atgctgaaca ttagaaaatc agcaattatt agtacccttg ataagcaatc tcttttgcat 6180  
 tcaatttatg aatgagata aatggttgtt taaaaaaaaa aaagactgct cctgactcag 6240  
 tcaaaatatt ttttaaaact ctgggtttttg ttgtacttgc tgataactaag agtttactta 6300  
 aaaatataaa acccaatttg cgtccatgag gatttcactg tgtttcatca acagtgggct 6360  
 tttattaaat gtatatgcct tttattctat ttaagtggct ttcagcaaat ctttgtcata 6420  
 tttttataca gagtgctgta ccagcaagta caacaaaaaa gcaaaaacaa caaactttat 6480  
 aatttggtaa tcttaaggca tacttcataa ggggaaatth ttatgtatth atacataaat 6540  
 accctagtga tttcctgtta ctatgaaact tattccaacc aggagacttg agaaggaaag 6600  
 aagctattac cttgataaaa taggtattaa tagtagatat tattctaaag tttattcatt 6660  
 aaaattatta tcaaagtga acgtgaacaa aatcagaatt atttcctcag ttgatattcc 6720  
 taggccagta ggaatctaag tatatgaacc ttgggaatac gagactgcca tggagtgccc 6780  
 caaatacttt ccctggtttc tcataattac cttgtgaaat aataatgagc ttttctttat 6840  
 tgatataact ggagatagca acagtaagtt ttgggtggcta atttcatccc atcttttctc 6900  
 attgtatcta ccatgcttga aatcataggt acccttggat aatcttccaa atacttatgt 6960  
 acatgctaca aattatattt tattgaagtt ttagaaacac aatgattct tctatctccc 7020  
 atgttgcaat acagagtcag gacaaataat ttattaatta atactgtgtt taaaatttct 7080  
 agggccctta aaaaaaaaaa caaaggagggt tcccatcgtg gctcagcaga acaaatcag 7140  
 actggcatcc atgaggaagc aggttccatc cctggctttg ctcagtgggt tcaggatctg 7200  
 gcgttgctgt gagctgttg gtagattgca gacatggctc agatctgaca ttgctgtggc 7260  
 tgtggtgtag gctggcggct acagctctga tttgaccctc agtctgggaa tggccatag 7320

ES 2 784 643 T3

ccatgggtgt cgcccttaaa aaaaaagaaa agaaaacaac tagaaattct cctgatcatt 7380  
 gtgagatgac attctgcaat aagcctcata cttcgctgag gggttgaata tcattacctc 7440  
 atgaaatatg cttagataaa gaataccttt tggttaagag tagaaaagcc tatgagtcta 7500  
 aagctcctta ggctgagtgc agagagagct tttcatgcaa agtagaatat tttctttttc 7560  
 taaccattat cccctcacc cctgggcatt tacaccagc ttctactcaa atgccacatt 7620  
 ctgcaaggaa cttgtctgaa cttacataga tttttatcta tttttctga caccagtta 7680  
 ttcagacatg cggccgcagc aaccctagt gatggagttg gccactccct ctctgcgcgc 7740  
 tcgctcgcct actgaggccg ggcgacaaa ggtcgcccga cggccgggct ttgcccgggc 7800  
 ggcctcagtg agcgagcgcg cgcgcagctg cctgcagggg cgctgatgc ggtattttct 7860  
 ccttacgcat ctgtgcggtt tttcacaccg catacgtcaa agcaaccata gtacgcgccc 7920  
 tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt 7980  
 gccagcgcgc tagcgcgccg tcctttcgct ttcttcctt cctttctcgc cacgttcgcc 8040  
 ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctcccttag ggttccgatt tagtgcttta 8100  
 cggcacctcg accccaaaaa acttgatttg ggtgatggtt cacgtagtgg gccatcgccc 8160  
 tgatagacgg tttttcgccc tttgacgttg gagtccacgt tctttaatag tggactcttg 8220  
 ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcgggctatt cttttgattt ataagggatt 8280  
 ttgccgattt cggcctatg gttaaaaaat gagctgattt acaaaaaatt taacgcgaat 8340  
 ttttaaaaaa tattaacgtt tacaatttta tgggtgactc tcagtacaat ctgctctgat 8400  
 gccgcatagt taagccagcc ccgacacccg ccaacacccg ctgacgcgcc ctgacgggct 8460  
 tgtctgctcc cggcatccgc ttacagacaa gctgtgaccg tctccgggag ctgcatgtgt 8520  
 cagaggtttt caccgtcatc accgaaacgc gcgagacgaa agggcctcgt gatacgcta 8580  
 tttttatagg ttaatgtcat gataataatg gtttcttaga cgtcaggtgg cacttttcgg 8640  
 ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg 8700  
 ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt 8760  
 attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc ttttttcggg cattttgcct tcctgttttt 8820  
 gctcaccagc aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg 8880  
 ggttacatcg aactggatct caacagcggc aagatccttg agagttttcg ccccgaagaa 8940  
 cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcgggtatt atcccgtatt 9000  
 gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga cttggttgag 9060  
 tactcaccag tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt 9120  
 gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaaactac ttctgacaac gatcggagga 9180

ES 2 784 643 T3

ccgaaggagc taaccgcttt tttgcacaac atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt	9240
tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta	9300
gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg	9360
caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc	9420
cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt	9480
atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctccgta tcgtagttat ctacacgacg	9540
gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg	9600
attaagcatt gtaactgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat tgatttaaaa	9660
cttcattttt aatttaaaag gatctagggtg aagatccttt ttgataatct catgaccaa	9720
atccctaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga	9780
tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaaaaaaa aaaaccaccg	9840
ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact	9900
ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta gttaggccac	9960
cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatacct gttaccagtg	10020
gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg	10080
gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga	10140
acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc	10200
gaagggagaa agcgggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg	10260
agggagcttc cagggggaaa cgctggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc	10320
tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc	10380
agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgt	10435

**REIVINDICACIONES**

1. Un cerdo transgénico que comprende un gen de polipéptido amiloide de los islotes (IAPP) mutado humano o parte del mismo, y que muestra al menos un fenotipo asociado a la diabetes mellitus tipo 2.
- 5 2. El cerdo transgénico según la reivindicación 1, donde dicho gen de IAPP mutado comprende una mutación que resulta en la sustitución de aminoácidos S20G.
3. El cerdo transgénico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho cerdo transgénico no expresa un gen de IAPP de cerdo endógeno.
- 10 4. El cerdo transgénico según la reivindicación 3, donde dicho gen de IAPP de cerdo endógeno ha sido desactivado.
- 15 5. El cerdo transgénico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho cerdo transgénico es un mini cerdo.
6. El cerdo transgénico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho cerdo transgénico es un cerdo endogámico.
- 20 7. El cerdo transgénico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho cerdo transgénico muestra niveles de glucosa más altos, niveles de glucagón más altos, niveles de insulina más bajos y/o niveles de péptido C más bajos, en comparación con un cerdo de control.
- 25 8. El cerdo transgénico según la reivindicación 7, donde dicho nivel de glucosa y/o dicho nivel de glucagón aumenta(n) en al menos el 10%, en comparación con un cerdo de control, y donde dicho cerdo transgénico y dicho cerdo de control reciben una dieta normal.
9. El cerdo transgénico según la reivindicación 7, donde dicho nivel de insulina y/o dicho nivel de péptido C disminuye(n) en al menos el 10%, en comparación con un cerdo de control, y donde dicho cerdo transgénico y dicho cerdo de control reciben una dieta normal.
- 30 10. El cerdo transgénico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho al menos un fenotipo es la hiperglucemia y/o la degeneración de células  $\beta$  y/o donde dicho al menos un fenotipo se selecciona de entre el grupo que consiste de ceguera, inflamación, infección y deformación de órganos.
- 35 11. Un blastoquiste, un embrión, un feto, una célula donante y/o un núcleo celular transgénicos derivados del cerdo transgénico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 40 12. Un procedimiento para producir el cerdo transgénico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, comprendiendo dicho procedimiento:
- 45 i. producir un ovocito que tiene una zona pelúcida parcialmente modificada,  
ii. separar el ovocito en al menos dos partes, obteniendo un ovocito que tiene un núcleo y al menos un citoplasto,  
iii. producir una célula donante que comprende un gen de IAPP mutado o parte del mismo,  
iv. fusionar al menos un citoplasto con la célula donante o el núcleo celular rodeado de membrana,  
v. obtener un embrión reconstruido,  
vi. activar el embrión reconstruido para formar un embrión, cultivar dicho embrión y  
vii. transferir dicho embrión cultivado a un mamífero huésped,
- 50 donde el embrión se desarrolla en un cerdo transgénico.
13. El procedimiento según la reivindicación 12, donde dicho procedimiento no involucra una etapa quirúrgica.
- 55 14. El uso del cerdo transgénico, como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, como un sistema modelo para estudiar la terapia, el tratamiento y/o la prevención de la diabetes mellitus tipo 2.

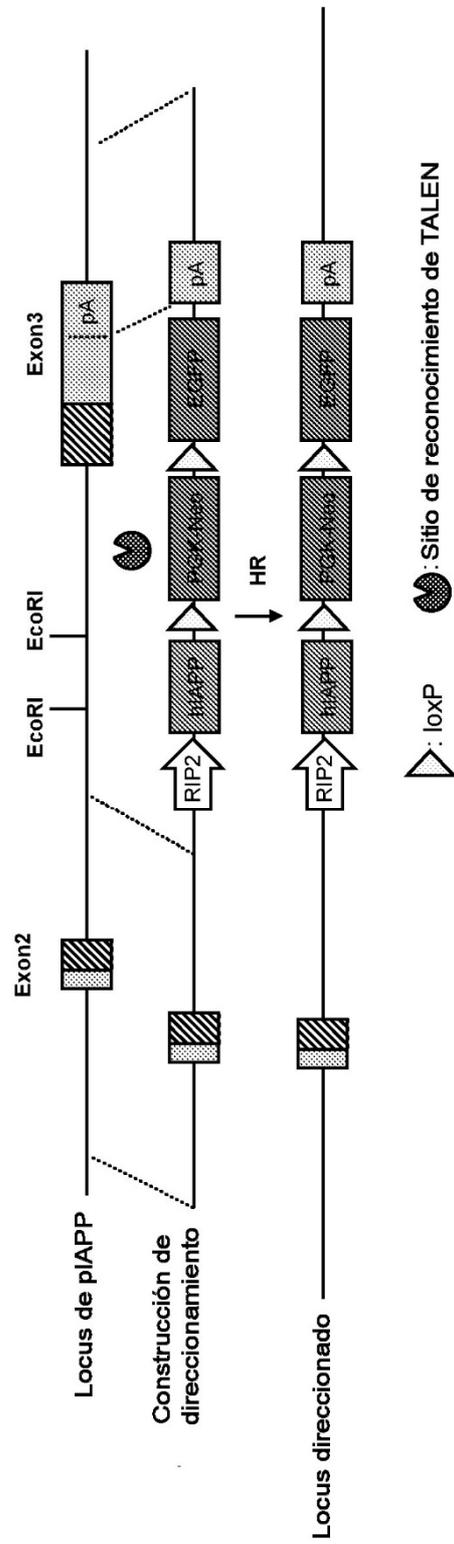


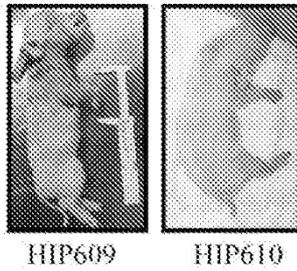
Fig. 1



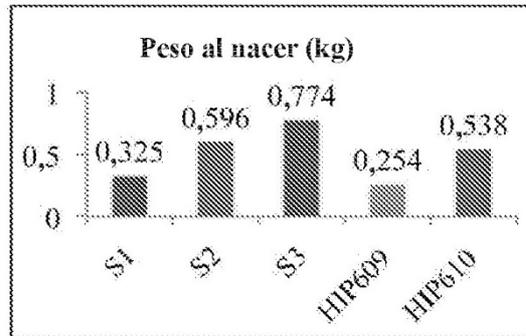
a

ID de transferencia	Nº. de embriones	Embarazo	Aborto	Tamaño de cria	ID de lechón
2477	75	Sí	No	3	S1, S2, HIP609
2532	75	Sí	Sí	NA	NA
2533	83	Sí	No	2	S3, HIP610

b



c



d

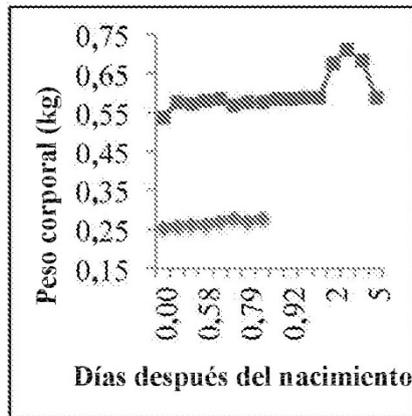


Fig. 3

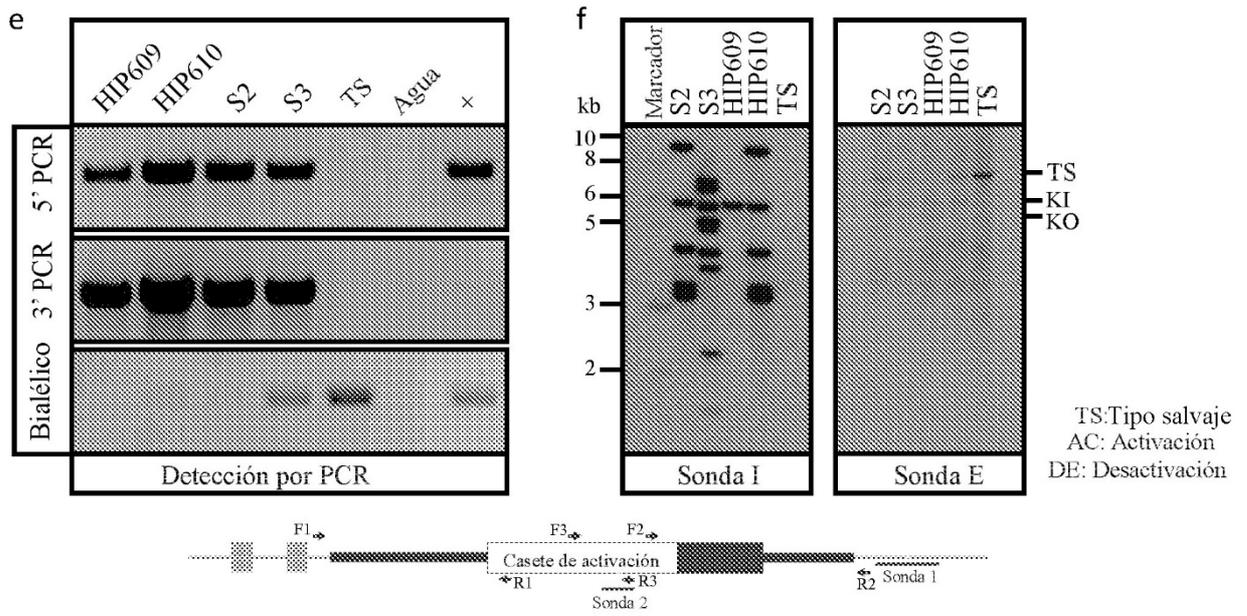


Fig. 3, continuada

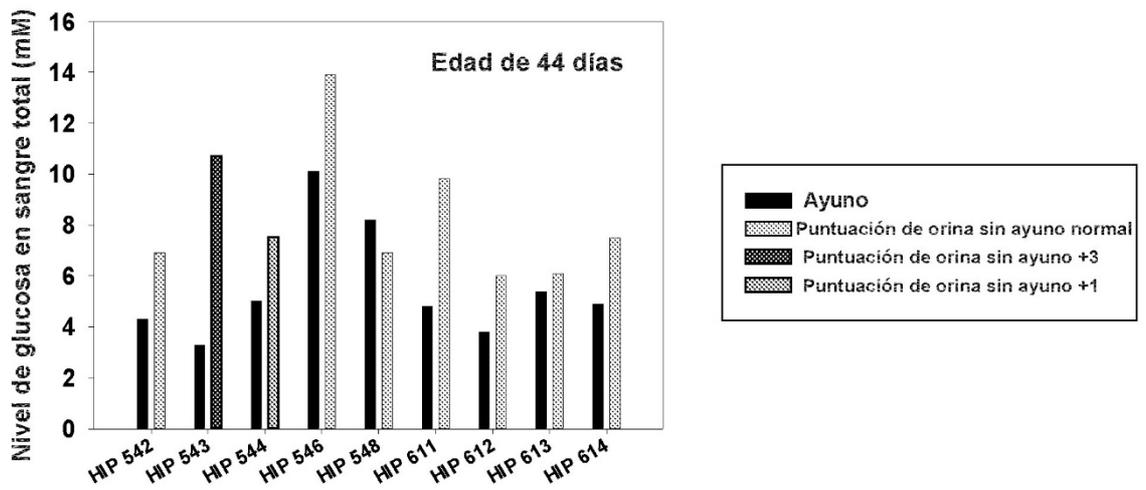
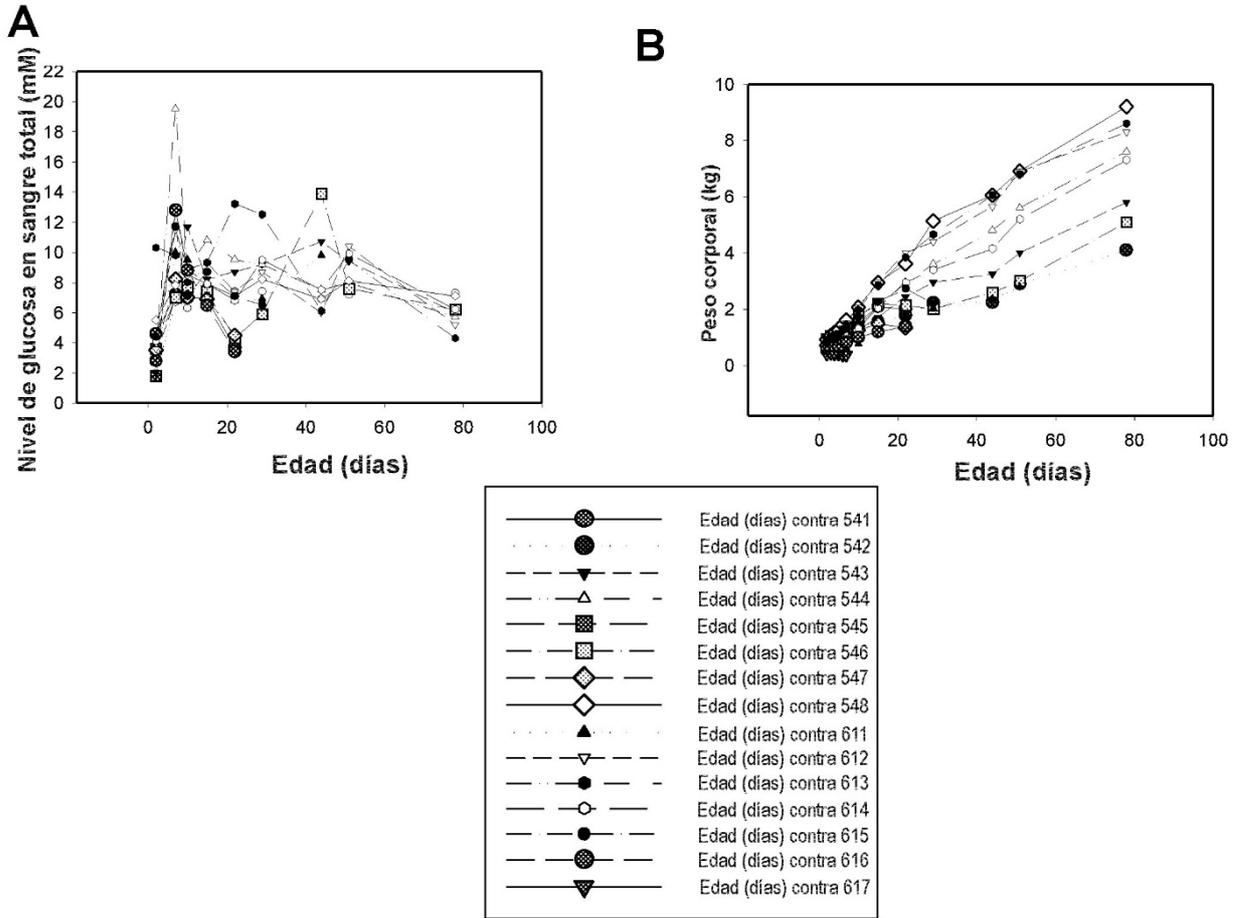


Fig. 4

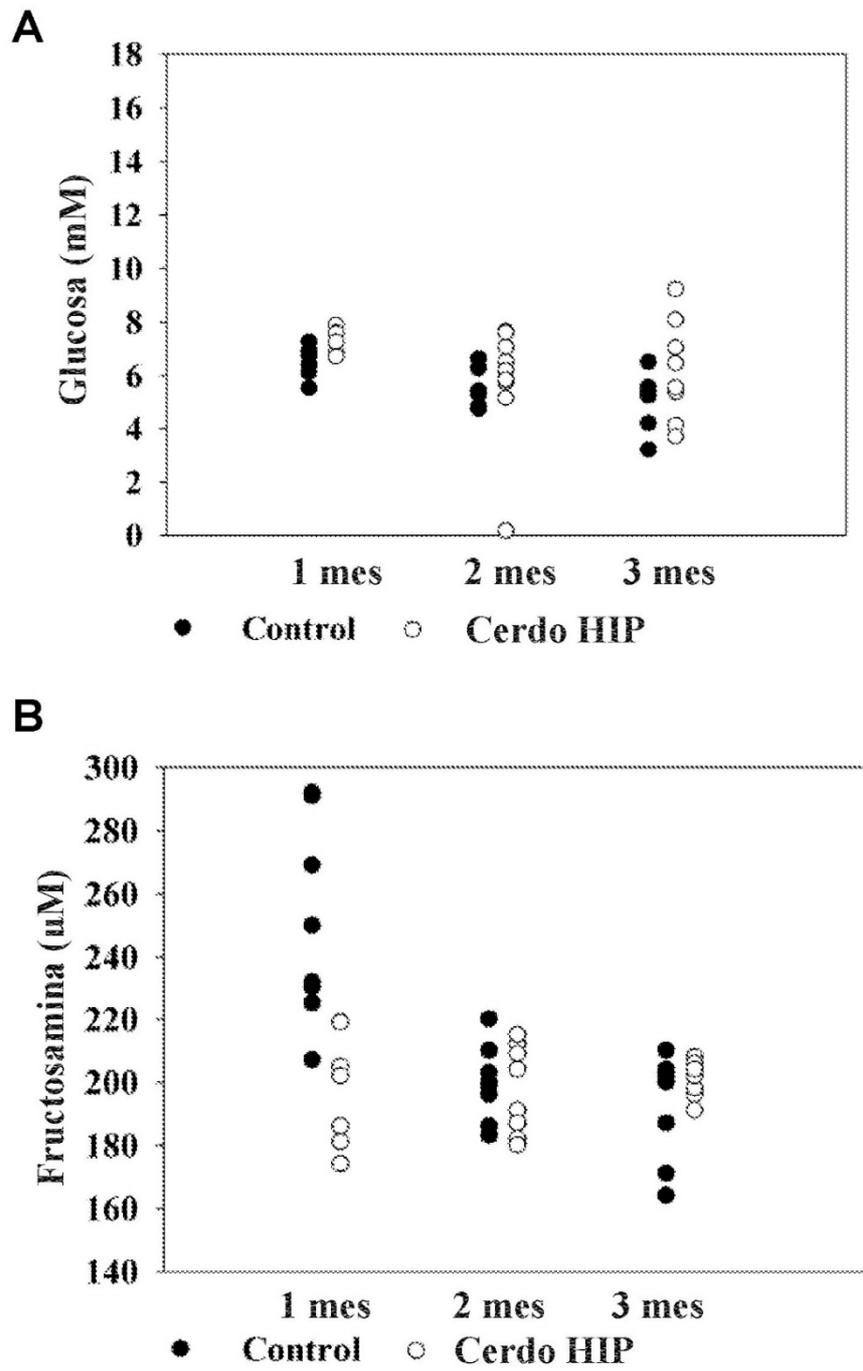


Fig. 5

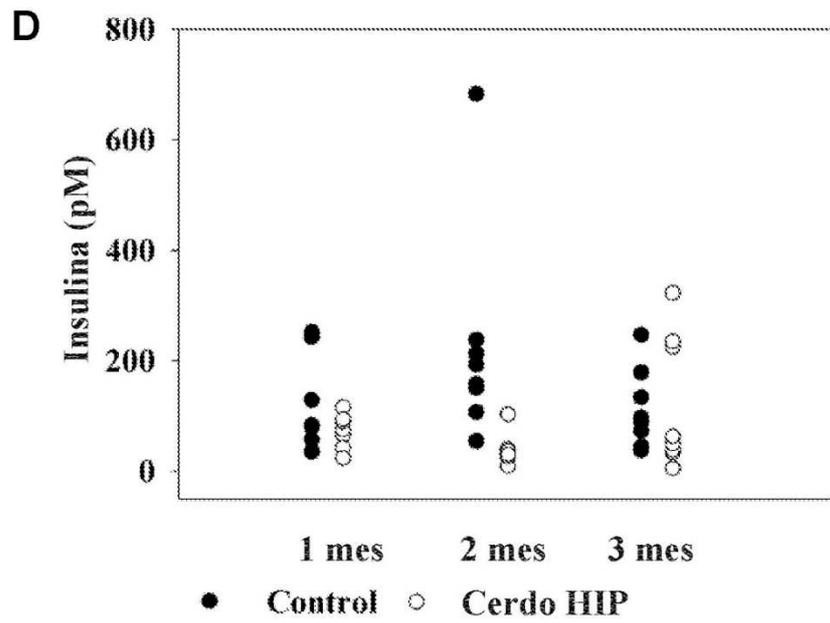
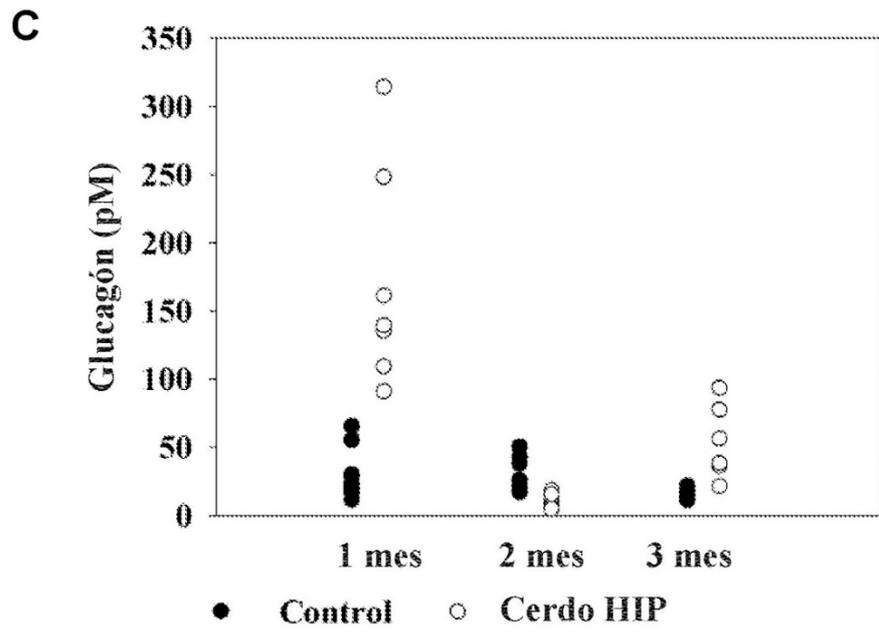


Fig. 5, continuada

**E**

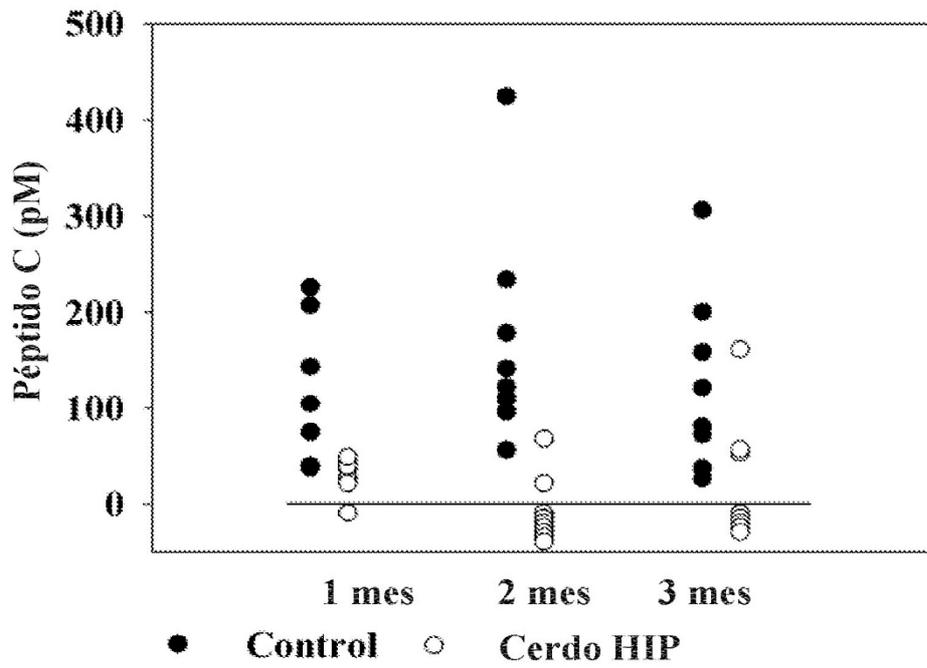


Fig. 5, continuada

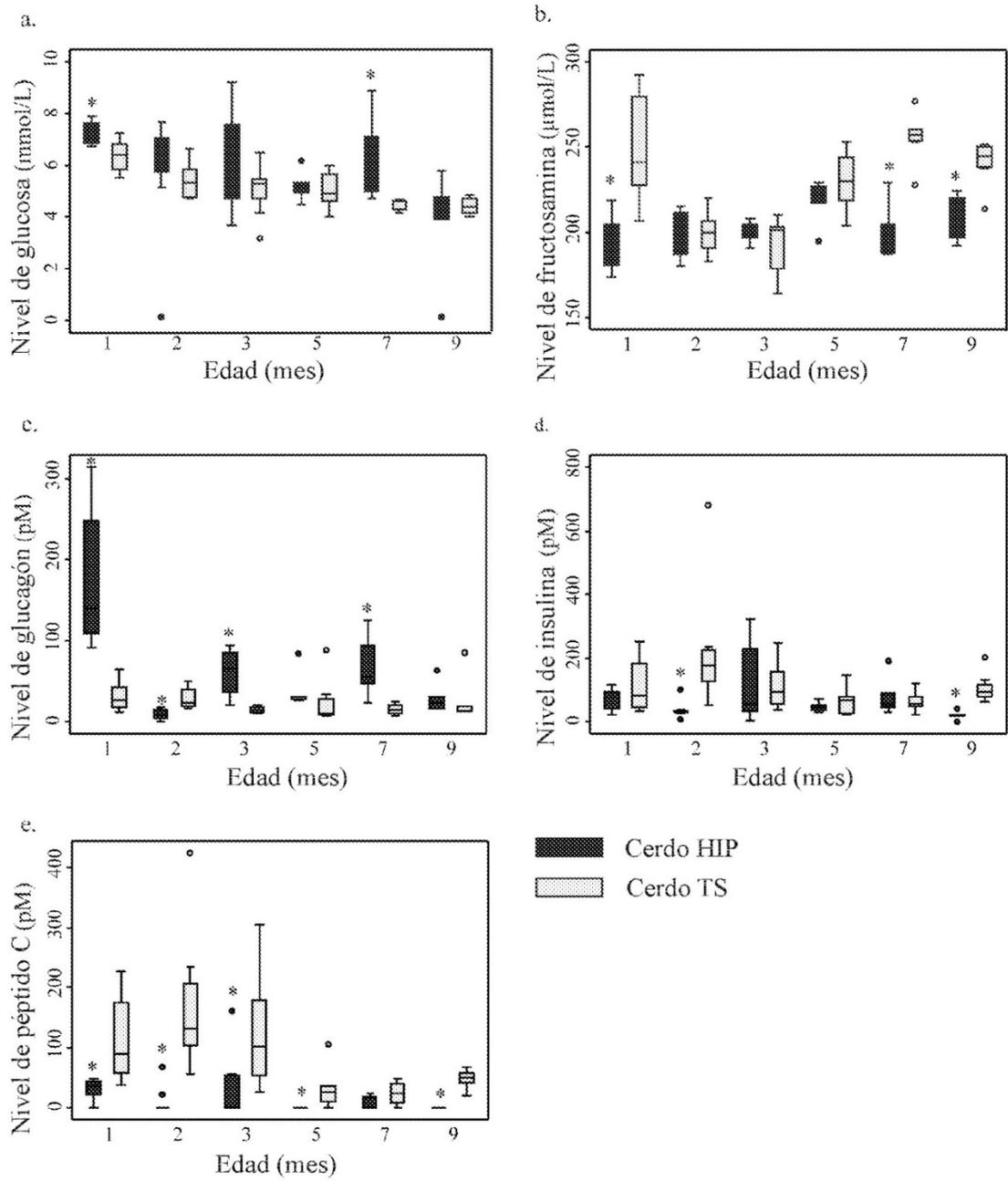


Fig. 6