

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 974 200**

51 Int. Cl.:
A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.09.2019 PCT/US2019/050792**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2020 WO20056122**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2019 E 19773717 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2024 EP 3849304**

54 Título: **Rata nuligénica para el gen del factor H del complemento como modelo de glomerulopatía C3**

30 Prioridad:
13.09.2018 US 201862730690 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.06.2024

73 Titular/es:
**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591, US**

72 Inventor/es:
**DEVALARAJA-NARASHIMHA, KISHOR;
LEE, JEFFREY D. y
MORTON, LORI**

74 Agente/Representante:
VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 974 200 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

Rata nuligénica para el gen del factor H del complemento como modelo de glomerulopatía C3

5 **Antecedentes**

La glomerulopatía C3 (C3G) se caracteriza por una hiperactivación de la activación del complemento por la vía alternativa (AP) como resultado de factores nefríticos C3 y/o mutaciones en los genes del complemento. Aproximadamente el 50 % de los pacientes desarrollan enfermedad renal terminal (ERT) en los 10 años posteriores al diagnóstico. Existe una tasa de recurrencia de aproximadamente el 80-90 % después del trasplante de riñón. Actualmente no existe un tratamiento aprobado por la FDA para la C3G, ni existen terapias que ataquen la causa de la C3G.

Se han usado ratones deficientes para el factor H del complemento (*Cfh*^{-/-}) en estudios experimentales para comprender los mecanismos subyacentes a la C3G. Sin embargo, la ERT puede tardar varios meses en manifestarse en ratones *Cfh*^{-/-}, lo que exige largos estudios preclínicos para evaluar nuevas terapias. Se necesitan mejores modelos de C3G.

20 **Sumario**

La presente invención se define por las reivindicaciones. En el presente documento se proporcionan ratas modificadas genéticamente de acuerdo con la reivindicación 1, así como métodos para producir y utilizar dichas ratas y células de rata modificadas genéticamente. También se divulgan genes *Cfh* de rata que comprenden una modificación genética dirigida que inactiva los genes *Cfh* de rata, agentes nucleasa para usar en la inactivación de un gen *Cfh* de rata, en donde los agentes nucleasa se dirigen y escinden un sitio diana de nucleasa en el gen *Cfh* y métodos para producir tales genes *Cfh* de rata.

En un aspecto, se proporcionan ratas que comprenden un locus *Cfh* endógeno inactivado de acuerdo con la reivindicación 1. Opcionalmente, el codón de inicio del locus *Cfh* endógeno está mutado o eliminado en el locus *Cfh* endógeno inactivado. Opcionalmente, el codón de inicio del locus *Cfh* endógeno se elimina en el locus *Cfh* endógeno inactivado. Opcionalmente, la secuencia codificante en el primer exón del locus *Cfh* endógeno se elimina en el locus *Cfh* endógeno inactivado. Opcionalmente, el sitio donante de corte empalme en el primer intrón del locus *Cfh* endógeno se elimina en el locus *Cfh* endógeno inactivado.

En algunas de esas ratas, la rata es un macho. En otras ratas similares, la rata es una hembra. Las ratas de la invención son homocigotas para el locus *Cfh* endógeno inactivado.

Las ratas de la invención tienen uno o más síntomas de glomerulopatía C3 (C3G). Algunas de estas ratas tienen niveles circulatorios de C3 disminuidos en comparación con una rata de tipo silvestre. Opcionalmente, los niveles circulatorios de C3 son menos de aproximadamente 200 µg/ml. Opcionalmente, los niveles circulatorios de C3 son menos de aproximadamente 100 µg/ml. Opcionalmente, la rata modificada genéticamente tiene niveles circulatorios de C3 disminuidos en comparación con la rata de tipo silvestre a una edad de entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 17 semanas.

Algunas de estas ratas tienen niveles elevados de nitrógeno ureico en sangre en comparación con una rata de tipo silvestre. Algunas de estas ratas tienen niveles elevados de nitrógeno ureico en sangre, niveles elevados de cistatina C en suero o niveles elevados de albúmina urinaria en comparación con una rata de tipo silvestre. Algunas de estas ratas tienen niveles elevados de nitrógeno ureico en sangre, niveles elevados de cistatina C en suero y niveles elevados de albúmina urinaria en comparación con una rata de tipo silvestre. Opcionalmente, los niveles de nitrógeno ureico en sangre son más de aproximadamente 10, más de aproximadamente 20, más de aproximadamente 30, más de aproximadamente 40, más de aproximadamente 50, más de aproximadamente 60, más de aproximadamente 70, más de aproximadamente 80, más de aproximadamente 90 o más de aproximadamente 100 mg/dl. Opcionalmente, los niveles de cistatina C en suero son más de aproximadamente 1000, más de aproximadamente 1100, más de aproximadamente 1200, más de aproximadamente 1300, más de aproximadamente 1400, más de aproximadamente 1500, más de aproximadamente 1600, más de aproximadamente 1700, más de aproximadamente 1800, más de aproximadamente 1900 o más de aproximadamente 2000 ng/ml. Opcionalmente, la albúmina urinaria por día es más de aproximadamente 1000, más de aproximadamente 2000, más de aproximadamente 3000, más de aproximadamente 4000, más de aproximadamente 5000, más de aproximadamente 6000, más de aproximadamente 7000, más de aproximadamente 8000, más de aproximadamente 9000, o más de aproximadamente 10000 µg/día. Opcionalmente, la relación entre albúmina urinaria y creatinina urinaria es más de aproximadamente 100, más de aproximadamente 200, más de aproximadamente 300, más de aproximadamente 400, más de aproximadamente 500, más de aproximadamente 600, más de aproximadamente 700, más de aproximadamente 800, más de aproximadamente 900, más de aproximadamente 1000, más de aproximadamente 1100, más de aproximadamente 1200, más de aproximadamente 1300, más de aproximadamente 1400, más de aproximadamente 1500, más de aproximadamente 1600, más de aproximadamente 1700, más de aproximadamente 1800, más de aproximadamente 1900, o más de aproximadamente 2000 µg:mg. Opcionalmente, la rata modificada genéticamente tiene niveles

elevados de nitrógeno ureico en sangre en comparación con la rata de tipo silvestre a una edad de entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 17 semanas. Opcionalmente, la rata modificada genéticamente tiene niveles elevados de nitrógeno ureico en sangre, niveles elevados de cistatina C en suero, o niveles elevados de albúmina urinaria en comparación con la rata de tipo silvestre a una edad de entre aproximadamente 7 semanas y

5 aproximadamente 17 semanas.

Algunas de estas ratas tienen un mayor depósito de C3 en los riñones en comparación con una rata de tipo silvestre. Opcionalmente, la rata modificada genéticamente tiene un mayor depósito de C3 en los riñones en comparación con la rata de tipo silvestre a una edad de entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 17 semanas. Algunas

10 de estas ratas tienen un mayor depósito de C5b-9 en los riñones en comparación con una rata de tipo silvestre. Opcionalmente, la rata modificada genéticamente tiene un mayor depósito de C5b-9 en los riñones en comparación con la rata de tipo silvestre a una edad de entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 17 semanas.

Algunas de estas ratas tienen una patología glomerular más pronunciada en comparación con una rata de tipo silvestre. Opcionalmente, una patología glomerular más pronunciada comprende un aumento del grosor de la membrana basal glomerular, aumento de la anchura del proceso del pie de los podocitos o disminución del número de procesos del pie de los podocitos en comparación con la rata de tipo silvestre. Opcionalmente, una patología glomerular más pronunciada comprende un aumento del grosor de la membrana basal glomerular, aumento de la anchura del proceso del pie de los podocitos y disminución del número de procesos del pie de los podocitos en

20 comparación con la rata de tipo silvestre. Opcionalmente, el aumento en el grosor de la membrana basal glomerular es al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, o al menos aproximadamente 10 veces en comparación con la rata de tipo silvestre y/o el grosor promedio de la membrana basal glomerular en los glomérulos en la rata modificada genéticamente es al menos aproximadamente 0,2, al menos aproximadamente 0,3, al menos aproximadamente 0,4, al menos aproximadamente 0,5, al menos aproximadamente 0,6, al menos aproximadamente 0,7, al menos aproximadamente 0,8, al menos aproximadamente 0,9, al menos aproximadamente 1,0, al menos aproximadamente 1,1, al menos aproximadamente 1,2, al menos aproximadamente 1,3, al menos aproximadamente 1,4, al menos aproximadamente 1,5, al menos aproximadamente 1,6, al menos aproximadamente 1,7 o al menos aproximadamente 1,8 micrómetros. Opcionalmente, el aumento de la anchura del proceso del pie de los podocitos es al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, o al menos aproximadamente 7 veces en comparación con la rata de tipo silvestre y/o el promedio de la anchura proceso del pie en los glomérulos en la rata modificada genéticamente es al menos aproximadamente 0,4, al menos aproximadamente 0,5, al menos aproximadamente 0,6, al menos aproximadamente 0,7, al menos aproximadamente 0,8, al menos aproximadamente 0,9, al menos aproximadamente 1,0, al menos aproximadamente 1,1, al menos aproximadamente 1,2, al menos aproximadamente 1,3, al menos aproximadamente 1,4, al menos aproximadamente 1,5, al menos aproximadamente 1,6, al menos aproximadamente 1,7 o al menos aproximadamente 2,5 micrómetros. Opcionalmente, la disminución en el número de procesos del pie de los podocitos es al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, o al menos aproximadamente 3,8 veces en comparación con la rata de tipo silvestre y/o el número promedio de procesos del pie de los podocitos por longitud en micrómetros en la rata modificada genéticamente es menos de aproximadamente 2,5, menos de aproximadamente 2, menos de aproximadamente 1,5, menos de aproximadamente 1, menos de aproximadamente 0,9 o menos de aproximadamente 0,8. Opcionalmente, la rata modificada genéticamente tiene una patología glomerular más pronunciada en comparación con la rata de tipo silvestre a una edad de entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 17 semanas.

45 Algunas de estas ratas tienen una esperanza de vida menor en comparación con una rata de tipo silvestre. Opcionalmente, la mediana de la esperanza de vida de la rata modificada genéticamente es menos de aproximadamente 150 días.

50 En otro aspecto, se proporcionan métodos para evaluar la eficacia terapéutica *in vivo* de un agente para usar en un tratamiento de la glomerulopatía C3 (C3G) de acuerdo con la reivindicación 17. Los métodos de la invención comprenden: (a) administrar el agente a una rata modificada genéticamente de acuerdo con las reivindicaciones; y (b) evaluar uno o más síntomas de C3G en la rata modificada genéticamente a la que se le ha administrado el agente en comparación con una rata modificada genéticamente de control a la que no se le ha administrado el agente. Opcionalmente, la etapa (b) comprende evaluar uno o más o todos de los siguientes: (i) niveles circulatorios de C3; (ii) niveles de nitrógeno ureico en sangre; (iii) depósito de C3 en los riñones; (iv) depósito de C5b-9 en los riñones; y (v) esperanza de vida. Opcionalmente, la etapa (b) comprende evaluar: (i) niveles circulatorios de C3; (ii) niveles de nitrógeno ureico en sangre; (iii) depósito de C3 en los riñones; (iv) depósito de C5b-9 en los riñones; (v) esperanza de vida; o (vi) una combinación de los mismos. Opcionalmente, la etapa (b) comprende evaluar: (i) niveles circulatorios de C3; (ii) niveles de nitrógeno ureico en sangre; (iii) niveles de cistatina C en suero; (iv) niveles de albúmina urinaria; (v) depósito de C3 en los riñones; (vi) depósito de C5b-9 en los riñones; (vii) grosor de la membrana basal glomerular; (viii) anchura del proceso del pie de los podocitos; (ix) número de pies de los podocitos; (x) esperanza de vida; o (xi) una combinación de los mismos. Opcionalmente, la edad de la rata modificada genéticamente está entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 17 semanas.

65 En algunos de estos métodos, la etapa (b) comprende evaluar los niveles circulatorios de C3, en donde el aumento

de los niveles circulatorios de C3 en la rata modificada genéticamente a la que se le administró el agente en comparación con la rata modificada genéticamente de control indica un efecto terapéutico para el supuesto agente terapéutico para la C3G. En algunos de estos métodos, la etapa (b) comprende evaluar los niveles de nitrógeno ureico en sangre, en donde los niveles disminuidos de nitrógeno ureico en sangre en la rata modificada genéticamente a la que se le administró el agente en comparación con la rata modificada genéticamente de control indica un efecto terapéutico para el supuesto agente terapéutico para la C3G. En algunos de estos métodos, la etapa (b) comprende evaluar los niveles de cistatina C en suero, en donde los niveles disminuidos de cistatina C en suero en la rata modificada genéticamente a la que se le administró el agente en comparación con la rata modificada genéticamente de control indica un efecto terapéutico para el supuesto agente terapéutico para la C3G. En algunos de estos métodos, la etapa (b) comprende evaluar los niveles de albúmina urinaria, en donde los niveles disminuidos de albúmina urinaria en la rata modificada genéticamente a la que se le administró el agente en comparación con la rata modificada genéticamente de control indica un efecto terapéutico para el supuesto agente terapéutico para la C3G. En algunos de estos métodos, la etapa (b) comprende evaluar el depósito de C3 en el riñón, en donde los niveles disminuidos de depósito de C3 en el riñón en la rata modificada genéticamente a la que se le administró el agente en comparación con la rata modificada genéticamente de control indica un efecto terapéutico para el supuesto agente terapéutico para la C3G. En algunos de estos métodos, en donde la etapa (b) comprende evaluar el depósito de C5b-9 en el riñón, en donde los niveles disminuidos de depósito de C5b-9 en el riñón en la rata modificada genéticamente a la que se le administró el agente en comparación con la rata modificada genéticamente de control indica un efecto terapéutico para el supuesto agente terapéutico para la C3G. En algunos de estos métodos, la etapa (b) comprende evaluar el grosor de la membrana basal glomerular, en donde la disminución del grosor de la membrana basal glomerular en la rata modificada genéticamente a la que se le administró el agente en comparación con la rata modificada genéticamente de control indica un efecto terapéutico para el supuesto agente terapéutico para la C3G. En algunos de estos métodos, la etapa (b) comprende evaluar la anchura del proceso del pie de los podocitos, en donde la disminución de la anchura del proceso del pie de los podocitos en la rata modificada genéticamente a la que se le administró el agente en comparación con la rata modificada genéticamente de control indica un efecto terapéutico para el supuesto agente terapéutico para la C3G. En algunos de estos métodos, la etapa (b) comprende evaluar el número de procesos del pie de los podocitos, en donde el aumento del número de procesos del pie de los podocitos en la rata modificada genéticamente a la que se le administró el agente en comparación con la rata modificada genéticamente de control indica un efecto terapéutico para el supuesto agente terapéutico para la C3G. En algunos de estos métodos, la etapa (b) comprende evaluar la esperanza de vida, en donde una mayor esperanza de vida en la rata modificada genéticamente a la que se le administró el agente en comparación con la rata modificada genéticamente de control indica un efecto terapéutico para el supuesto agente terapéutico para la C3G.

En otro aspecto, se proporcionan métodos para producir ratas modificadas genéticamente de acuerdo con la reivindicación 21 o la reivindicación 22. Algunos de estos métodos comprenden: (a) introducir en una célula madre embrionaria (ES) de rata un primer agente nucleasa que se dirige a una primera secuencia diana próxima al codón de inicio del locus genómico *Cfh* endógeno, en donde el agente nucleasa escinde la primera secuencia diana para producir una célula ES de rata modificada genéticamente que comprende el locus *Cfh* endógeno inactivado; (b) introducir la célula de rata (ES) modificada genéticamente en un embrión hospedador de rata; y (c) gestar el embrión hospedador de rata en una madre subrogada, en donde la madre subrogada produce una progenie F0 de rata modificada genéticamente que comprende el locus *Cfh* endógeno inactivado. Algunos de estos métodos comprenden: (a) introducir en un embrión de rata en fase unicelular un primer agente nucleasa que se dirige a una primera secuencia diana próxima al codón de inicio del locus genómico *Cfh* endógeno, en donde el agente nucleasa escinde la primera secuencia diana para producir un embrión de rata en fase unicelular modificado genéticamente que comprende el locus *Cfh* endógeno inactivado; y (b) gestar el embrión de rata en fase unicelular modificada genéticamente en una madre subrogada, en donde la madre subrogada produce una progenie F0 de rata modificada genéticamente que comprende el locus *Cfh* endógeno inactivado.

En algunos de estos métodos, la primera secuencia diana del primer agente nucleasa puede estar en el primer exón, el primer intrón, o la 5' UTR del locus *Cfh* endógeno. Opcionalmente, el primer agente nucleasa puede ser una proteína Cas9 y un ARN guía. Opcionalmente, la primera secuencia diana puede comprender la SEQ ID NO: 12 o 13.

En algunos de estos métodos, la etapa (a) puede comprender además introducir en la célula ES de rata un segundo agente nucleasa que se dirige a una segunda secuencia diana próxima al codón de terminación del locus *Cfh* endógeno. En algunos de estos métodos, la etapa (a) puede comprender además introducir en la célula ES de rata o en el embrión de rata en fase unicelular un segundo agente nucleasa que se dirige a una segunda secuencia diana próxima al codón de terminación del locus *Cfh* endógeno. Opcionalmente, la segunda secuencia diana puede estar en el penúltimo intrón, el penúltimo exón, el último intrón, el último exón, o la 3' UTR del locus *Cfh* endógeno. Opcionalmente, la segunda secuencia diana puede comprender la SEQ ID NO: 14 o 15.

En algunos de estos métodos, la etapa (a) puede comprender además introducir en la célula ES de rata un segundo agente nucleasa que se dirige a una segunda secuencia diana próxima al codón de inicio del locus *Cfh* endógeno que es diferente de la primera secuencia diana. En algunos de estos métodos, la etapa (a) puede comprender además introducir en la célula ES de rata o en el embrión de rata en fase unicelular un segundo agente nucleasa que se dirige a una segunda secuencia diana próxima al codón de inicio del locus *Cfh* endógeno que es diferente de la primera secuencia diana. Opcionalmente, la primera secuencia diana y la segunda secuencia diana pueden flanquear el codón

de inicio del locus *Cfh* endógeno. Opcionalmente, la primera secuencia diana puede estar en el primer exón o en la UTR 5' del locus *Cfh* endógeno, y la segunda secuencia diana puede estar en el primer exón o en el primer intrón del locus *Cfh* endógeno. Opcionalmente, la primera secuencia diana puede comprender la SEQ ID NO: 12, y la segunda secuencia diana puede comprender la SEQ ID NO: 13. Opcionalmente, la etapa (a) puede comprender además introducir en la célula ES de rata un tercer agente nucleasa y/o un cuarto agente nucleasa, en donde el tercer y cuarto agente nucleasa se dirigen a la tercera y cuarta secuencias diana, respectivamente, próximas al codón de terminación del locus *Cfh* endógeno, y en donde la tercera y cuarta secuencias diana son diferentes. Opcionalmente, la etapa (a) puede comprender además introducir en la célula ES de rata o en el embrión de rata en fase unicelular un tercer agente nucleasa y/o un cuarto agente nucleasa, en donde el tercer y cuarto agente nucleasa se dirigen a la tercera y cuarta secuencias diana, respectivamente, próximas al codón de terminación del locus *Cfh* endógeno, y en donde la tercera y cuarta secuencias diana son diferentes. Opcionalmente, la tercera y cuarta secuencias diana pueden estar en el penúltimo intrón, el penúltimo exón, el último intrón, el último exón, o la 3' UTR del locus *Cfh* endógeno. Opcionalmente, la tercera y cuarta secuencias diana pueden comprender las SEQ ID NOS: 14 y 15, respectivamente.

En algunos de estos métodos, la etapa (a) puede comprender además introducir en la célula ES de rata un ácido nucleico donante exógeno que comprende un brazo de homología 5' que se hibrida con una secuencia diana 5' en el locus *Cfh* endógeno y un brazo de homología 3' que se hibrida con una secuencia diana 3' en el locus *Cfh* endógeno, en donde el ácido nucleico donante exógeno está diseñado para mutar o eliminar el codón de inicio del locus *Cfh* endógeno. En algunos de estos métodos, la etapa (a) puede comprender además introducir en la célula ES de rata o en el embrión de rata en fase unicelular un ácido nucleico donante exógeno que comprende un brazo de homología 5' que se hibrida con una secuencia diana 5' en el locus *Cfh* endógeno y un brazo de homología 3' que se hibrida con una secuencia diana 3' en el locus *Cfh* endógeno, en donde el ácido nucleico donante exógeno está diseñado para mutar o eliminar el codón de inicio del locus *Cfh* endógeno. Opcionalmente, la secuencia diana 5' y la secuencia diana 3' pueden flanquear el codón de inicio del locus *Cfh* endógeno. Opcionalmente, la secuencia diana 5' y la secuencia diana 3' pueden flanquear la secuencia codificante del locus *Cfh* endógeno.

En otro aspecto, se proporcionan células de rata modificadas genéticamente que comprenden un locus *Cfh* endógeno inactivado de acuerdo con la reivindicación 23. En el presente documento se divulgan genomas de rata modificada genéticamente que comprenden un locus *Cfh* endógeno inactivado. También se divulgan en el presente documento genes *Cfh* de rata que comprenden una modificación genética dirigida que inactiva los genes *Cfh* de rata. En el presente documento se divulgan agentes nucleasa para usar en la inactivación de un gen *Cfh* de rata, en donde los agentes nucleasa se dirigen y escinden un sitio diana de nucleasa en el gen *Cfh*. También se divulgan en el presente documento métodos para producir una célula de rata modificada genéticamente que comprende un locus *Cfh* endógeno inactivado, que comprende introducir en una célula de rata un agente nucleasa que se dirige a una secuencia diana próxima al codón de inicio del locus genómico *Cfh* endógeno, en donde el agente nucleasa escinde la secuencia diana para producir la célula de rata modificada genéticamente que comprende el locus *Cfh* endógeno inactivado. En el presente documento se divulgan métodos para producir un genoma de rata modificada genéticamente que comprende un locus *Cfh* endógeno inactivado, que comprende poner en contacto un genoma de rata con un agente nucleasa que se dirige a una secuencia diana próxima al codón de inicio del locus genómico *Cfh* endógeno, en donde el agente nucleasa escinde la secuencia diana para producir el genoma de rata modificada genéticamente que comprende el locus *Cfh* endógeno inactivado. En el presente documento se divulgan métodos para producir un gen *Cfh* de rata inactivado, que comprende poner en contacto un gen *Cfh* de rata con un agente nucleasa que se dirige a una secuencia diana próxima al codón de inicio del locus genómico *Cfh* endógeno, en donde el agente nucleasa escinde la secuencia diana para producir el gen *Cfh* de rata inactivado.

Breve descripción de las figuras

La **Figura 1A** (no a escala) muestra una vista esquemática del esquema de direccionamiento para el direccionamiento al locus *Cfh* de rata. Se muestran las posiciones de las secuencias diana del ARN guía para los ARN guía GU1, GU2, GD2 y GD3, junto con las posiciones de los exones 1, 21 y 22, y el codón de inicio ATG y el codón de terminación TAA. También se muestran las representaciones de las regiones eliminadas en clones de células ES de rata AB5, AE1, AA8, BB7, BE6 y HG6.

La **Figura 1B** (no a escala) muestra un esquema de los ensayos de pérdida de alelo (LOA) TAQMAN® y los ensayos de secuenciación de próxima generación (NGS) para detectar el locus *Cfh* de rata dirigido. Los cebadores y sondas para los ensayos LOA incluyeron rTUF, rTUP, rTUR, rTU2F, rTU2P y rTU2R y los cebadores NGS incluyeron AmpF 1, AmpF2, AmpR1 y AmpR2.

La **Figura 2** muestra el porcentaje de supervivencia de ratas macho y hembra nuligénicas para *Cfh* a lo largo del tiempo.

La **Figura 3** muestra niveles circulatorios de C3 en ratas macho y hembra de 7 semanas de edad de tipo silvestre y nuligénicas para *Cfh*.

La **Figura 4** muestra la tinción para C3 y C5b-9 en cortes de riñón congelados de ratas hembra de tipo silvestre y nuligénicas para *Cfh*. Los paneles A-C son muestras de ratas hembra de tipo silvestre de 18 semanas, 17 semanas y 17 semanas de edad, respectivamente. Los paneles D-F son muestras de ratas hembra nuligénicas para *Cfh* de 12 semanas, 17 semanas y 9 semanas de edad, respectivamente.

La **Figura 5** muestra la tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS) del tejido de la médula y la corteza en muestras de riñón de una rata hembra de tipo silvestre de 15 semanas de edad y tres hembras nuligénicas para *Cfh* (rata

CFH KO 1, rata CFH KO 2 y rata CFH KO 3) de 12 semanas, 13 semanas y 15 semanas de edad, respectivamente. Las **Figuras 6A y 6B** muestran niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN) en ratas macho de tipo silvestre y nuligénicas para *Cfh* desde las 7 semanas de edad hasta que murió cada rata nuligénica para *Cfh* (**Figura 6A**) y en ratas hembra de tipo silvestre y nuligénicas para *Cfh* desde las 7 semanas de edad hasta que murió cada rata nuligénica para *Cfh* (**Figura 6B**). En el punto de partida, había 10 ratas macho de tipo silvestre, 8 ratas macho nuligénicas para *Cfh*, 9 ratas hembra de tipo silvestre y 7 ratas hembra nuligénicas para *Cfh*.

La **Figura 7** muestra un esquema de las vías del complemento, incluyendo las vías clásica y de las lectinas y la vía alternativa.

Las **Figuras 8A y 8B** muestran la cistatina C en suero (sCysC) en ratas macho de tipo silvestre y nuligénicas para *Cfh* (**Figura 8A**) y en ratas hembra de tipo silvestre y nuligénicas para *Cfh* (**Figura 8B**) desde las 7 semanas de edad hasta que murió cada rata nuligénica para *Cfh*.

Las **Figuras 9A-9D** muestran mediciones de albúmina urinaria en ratas macho y hembra de tipo silvestre y nuligénicas para *Cfh*. La **Figura 9A** muestra la albúmina urinaria por día en ratas macho de tipo silvestre y nuligénicas para *Cfh*. La **Figura 9B** muestra la albúmina urinaria normalizada a creatinina urinaria en ratas macho de tipo silvestre y nuligénicas para *Cfh*. La **Figura 9C** muestra la albúmina urinaria por día en ratas hembra de tipo silvestre y nuligénicas para *Cfh* y la **Figura 9D** muestra la albúmina urinaria normalizada a creatinina urinaria en ratas hembra de tipo silvestre y nuligénicas para *Cfh*.

Las **Figuras 10A y 10B** muestran micrografías electrónicas de un asa capilar glomerular (**Figura 10A**) y mesangio (**Figura 10B**) de un glomérulo de una rata de tipo silvestre (12.000X).

Las **Figuras 11A y 11B** muestran micrografías electrónicas de un asa capilar glomerular de un glomérulo de una rata nuligénica para *Cfh*. La **Figura 11A** tiene un aumento de 12.000X y la **Figura 11B** es un aumento mayor al de la **Figura 11A**.

Las **Figuras 12A y 12B** muestran micrografías electrónicas de un mesangio de un glomérulo de una rata nuligénica para *Cfh*. La **Figura 12A** tiene un aumento de 12.000X y la **Figura 12B** es un aumento mayor al de la **Figura 12A**.

Definiciones

Los términos "proteína", "polipéptido", y "péptido", utilizados indistintamente en el presente documento, incluyen formas poliméricas de aminoácidos de cualquier longitud, incluidos aminoácidos codificados y no codificados y aminoácidos derivatizados o modificados química o bioquímicamente. Los términos también incluyen polímeros que se han modificado, tales como polipéptidos que tienen cadenas principales peptídicas modificadas. El término "dominio" se refiere a cualquier parte de una proteína o polipéptido que tiene una función o estructura particular.

Se dice que las proteínas tienen un "extremo N" y un "extremo C". La expresión "extremo N" se refiere al inicio de una proteína o polipéptido, terminado por un aminoácido con un grupo amino libre (-NH₂). La expresión "extremo C" se refiere al final de una cadena de aminoácidos (proteína o polipéptido), terminado por un grupo carboxilo libre (-COOH).

Las expresiones "ácido nucleico" y "polinucleótido", utilizados indistintamente en el presente documento, incluyen formas poliméricas de nucleótidos de cualquier longitud, incluidos ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, o análogos o versiones modificadas de los mismos. Incluyen ADN o ARN monocatenario, bicatenario y multicatenario, ADN genómico, ADNc, híbridos de ADN-ARN y polímeros que comprenden bases purínicas, bases pirimidínicas u otras bases nucleotídicas naturales, modificadas químicamente, modificadas bioquímicamente, no naturales o derivatizadas.

Se dice que los ácidos nucleicos tienen "extremos 5'" y "extremos 3'" porque los mononucleótidos se hacen reaccionar para formar polinucleótidos de tal manera que el fosfato 5' de un anillo de pentosa mononucleotídico esté unido al oxígeno 3' de su vecino en una dirección a través de un enlace fosfodiéster. Un extremo de un oligonucleótido se denomina "extremo 5'" cuando su fosfato 5' no está unido al oxígeno 3' de un anillo de pentosa mononucleotídico. Un extremo de un oligonucleótido se denomina "extremo 3'" cuando su oxígeno 3' no está unido a un fosfato 5' de otro anillo de pentosa mononucleotídico. Una secuencia de un ácido nucleico, incluso si es interno a un oligonucleótido más grande, también se puede decir que tiene extremos 5' y 3'. En una molécula de ADN, ya sea lineal o circular, los elementos discretos se denominan "cadena arriba" o 5' de los elementos "cadena abajo" o 3'.

La expresión "integrado genómicamente" se refiere a un ácido nucleico que se ha introducido en una célula de manera que la secuencia de nucleótidos se integra en el genoma de la célula. Puede usarse cualquier protocolo para la incorporación estable de un ácido nucleico en el genoma de una célula.

La expresión "vector de direccionamiento" se refiere a un ácido nucleico recombinante que puede introducirse mediante recombinación homóloga, ligadura mediada por unión de extremos no homólogos o cualquier otro medio de recombinación a una posición diana en el genoma de una célula.

La expresión "vector viral" se refiere a un ácido nucleico recombinante que incluye al menos un elemento de origen viral e incluye elementos suficientes para o que permiten el empaquetamiento en una partícula de vector viral. El vector y/o partícula se puede utilizar con el fin de transferir ADN, ARN u otros ácidos nucleicos al interior de las células *ex vivo* o *in vivo*. Se conocen numerosas formas de vectores virales.

La expresión "tipo silvestre" incluye entidades que tienen una estructura y/o actividad como la que se encuentra en un estado o contexto normal (a diferencia de uno mutante, patológico, alterado, etc.). Los genes y polipéptidos de tipo silvestre a menudo existen en múltiples formas diferentes (p. ej., alelos).

- 5 La expresión "secuencia endógena" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se produce de forma natural dentro de una célula de rata o rata. Por ejemplo, una secuencia *Cfh* endógena de una rata se refiere a una secuencia *Cfh* nativa que existe naturalmente en el locus *Cfh* de la rata.

- 10 Las moléculas o secuencias "exógenas" incluyen moléculas o secuencias que normalmente no están presentes en una célula en esa forma. La presencia normal incluye la presencia con respecto a la fase de desarrollo particular y las condiciones ambientales de la célula. Una molécula o secuencia exógena, por ejemplo, puede incluir una versión mutada de una secuencia endógena correspondiente dentro de la célula, tal como una versión humanizada de la secuencia endógena, o puede incluir una secuencia correspondiente a una secuencia endógena dentro de la célula pero en una forma diferente (es decir, no dentro de un cromosoma). Por el contrario, las moléculas o secuencias endógenas incluyen moléculas o secuencias que normalmente están presentes en esa forma en una célula particular en una etapa de desarrollo particular en condiciones ambientales particulares.

- 20 El término "heterólogo", cuando se usa en el contexto de un ácido nucleico o una proteína indica que el ácido nucleico o la proteína comprende al menos dos segmentos que no se encuentran juntos de forma natural en la misma molécula. Por ejemplo, el término "heterólogo", cuando se usa con referencia a segmentos de un ácido nucleico o segmentos de una proteína, indica que el ácido nucleico o la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí (p. ej., unidas entre sí) en la naturaleza. Como ejemplo, una región "heteróloga" de un vector de ácido nucleico es un segmento de ácido nucleico dentro o unido a otra molécula de ácido nucleico que no se encuentra asociado con la otra molécula en la naturaleza. Por ejemplo, una región heteróloga de un vector de ácido nucleico podría incluir una secuencia codificante flanqueada por secuencias que no se encuentran asociadas con la secuencia codificante en la naturaleza. Del mismo modo, una región "heteróloga" de una proteína es un segmento de aminoácidos dentro o unido a otra molécula peptídica que no se encuentra asociado con la otra molécula peptídica en la naturaleza (p. ej., una proteína de fusión o una proteína con una etiqueta). Análogamente, un ácido nucleico o proteína puede comprender un marcador heterólogo o una secuencia de secreción o localización heteróloga.

- 30 El término "locus" se refiere a una ubicación específica de un gen (o secuencia significativa), secuencia de ADN, secuencia que codifica un polipéptido, o posición en un cromosoma del genoma de un organismo. Por ejemplo, un "locus *Cfh*" puede referirse a la ubicación específica de un gen *Cfh*, secuencia del ADN de *Cfh*, secuencia codificante de *CFH* o posición de *Cfh* en un cromosoma del genoma de un organismo en el que se ha identificado dónde reside dicha secuencia. Un "locus *Cfh*" puede comprender un elemento regulador de un gen *Cfh*, que incluye, por ejemplo, un potenciador, un promotor, una región no traducida (UTR) 5' y/o 3' o una combinación de los mismos.

- 40 El término "gen" se refiere a una secuencia de ADN en un cromosoma que codifica un producto (p. ej., un producto de ARN y/o un producto polipeptídico) e incluye la región codificante interrumpida con intrones no codificantes y una secuencia ubicada adyacente a la región codificante en los extremos 5' y 3' de manera que el gen corresponde al ARNm de longitud completa (incluidas las secuencias no traducidas 5' y 3'). El término "gen" también incluye otras secuencias no codificantes que incluyen secuencias reguladoras (p. ej., promotores, potenciadores y sitios de unión de factores de transcripción), señales de poliadenilación, sitios internos de entrada al ribosoma, silenciadores, secuencia aislante y regiones de unión a la matriz. Estas secuencias pueden estar cerca de la región codificante del gen (p. ej., dentro de 10 kb) o en sitios distantes, e influyen en el nivel o tasa de transcripción y traducción del gen.

- 50 El término "alelo" se refiere a una forma variante de un gen. Algunos genes tienen una diversidad de formas diferentes, que se encuentran en la misma posición, o locus genético, en un cromosoma. Un organismo diploide tiene dos alelos en cada locus genético. Cada par de alelos representa el genotipo de un locus genético específico. Los genotipos se describen como homocigotos si hay dos alelos idénticos en un locus particular y como heterocigotos si los dos alelos difieren.

- 55 Un "promotor" es una región reguladora de ADN que normalmente comprende una caja TATA capaz de dirigir la ARN polimerasa II para iniciar la síntesis de ARN en el sitio de inicio de la transcripción apropiado para una secuencia polinucleotídica particular. Un promotor puede comprender adicionalmente otras regiones que influyen en la velocidad de inicio de la transcripción. Las secuencias promotoras divulgadas en el presente documento modulan la transcripción de un polinucleótido unido operativamente. Un promotor puede ser activo en uno o más de los tipos de células divulgados en el presente documento (p. ej., una célula de rata, una célula pluripotente, un embrión en fase unicelular, una célula diferenciada, o una combinación de las mismas). Un promotor puede ser, por ejemplo, un promotor constitutivamente activo, un promotor condicional, un promotor inducible, un promotor temporalmente restringido (p. ej., un promotor regulado por el desarrollo), o un promotor espacialmente restringido (p. ej., un promotor específico de célula o de tejido). Se pueden encontrar ejemplos de promotores, por ejemplo, en el documento WO 2013/176772.

- 65 "Unión operable" o estar "unido operativamente" incluye la yuxtaposición de dos o más componentes (p. ej., un promotor y otro elemento de secuencia) de manera que ambos componentes funcionen normalmente y permite la posibilidad de que al menos uno de los componentes pueda mediar una función que se ejerce sobre al menos uno de

los otros componentes. Por ejemplo, un promotor puede estar unido operativamente a una secuencia codificante si el promotor controla el nivel de transcripción de la secuencia codificante en respuesta a la presencia o ausencia de uno o más factores reguladores de la transcripción. El enlace operable puede incluir que tales secuencias sean contiguas entre sí o actúen en trans (p. ej., una secuencia reguladora puede actuar a distancia para controlar la transcripción de la secuencia codificante).

El término "variante" se refiere a una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia más prevalente en una población (p. ej., por un nucleótido) o una secuencia de proteína diferente de la secuencia más prevalente en una población (p. ej., por un aminoácido).

El término "fragmento", cuando se refiere a una proteína, significa una proteína que es más corta o tiene menos aminoácidos que la proteína de longitud completa. El término "fragmento", cuando se refiere a un ácido nucleico significa un ácido nucleico que es más corto o tiene menos nucleótidos que el ácido nucleico de longitud completa. Un fragmento puede ser, por ejemplo, un fragmento N-terminal (es decir, la eliminación de una porción del extremo C-terminal de la proteína), un fragmento C-terminal (es decir, la eliminación de una porción del extremo N-terminal de la proteína), o un fragmento interno.

"Identidad de secuencia" o "identidad" en el contexto de dos secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas hace referencia a los restos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para una máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación específica. Cuando se usa el porcentaje de identidad de secuencia en referencia a proteínas, las posiciones de los restos que no son idénticas a menudo difieren en sustituciones de aminoácidos conservadoras, donde los restos de aminoácidos están sustituidos por otros restos de aminoácidos con similares propiedades químicas (p. ej., carga o hidrofobicidad) y por tanto no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en sustituciones conservadoras, puede ajustarse por exceso el porcentaje de identidad de secuencia para corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Se dice que las secuencias que difieren por dichas sustituciones conservadoras tienen "similitud de secuencia" o "similitud". Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos. Normalmente, esto implica puntuar una sustitución conservadora como un emparejamiento erróneo parcial en lugar de completo, aumentando de este modo el porcentaje de identidad de secuencia. Así pues, por ejemplo, cuando se asigna a un aminoácido idéntico una puntuación de 1 y se asigna a una sustitución no conservadora una puntuación de cero, se asigna a una sustitución conservadora una puntuación entre cero y 1. La puntuación de sustituciones conservadoras se calcula, p. ej., como se implementa en el programa PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California).

"Porcentaje de identidad de secuencia" incluye el valor determinado comparando dos secuencias óptimamente alineadas (el mayor número de restos perfectamente coincidentes) en una ventana de comparación, en donde la porción de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las cuales se encuentran la base de ácido nucleico o el resto de aminoácido idénticos en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. A menos que se especifique lo contrario (p. ej., la secuencia más corta incluye una secuencia heteróloga unida), la ventana de comparación es la longitud total de la más corta de las dos secuencias que se comparan.

A menos que se indique lo contrario, los valores de identidad/similitud de secuencia incluyen el valor obtenido utilizando GAP versión 10 utilizando los siguientes parámetros: % de identidad y % de similitud para una secuencia de nucleótidos utilizando una ponderación de GAP de 50 y una ponderación de la longitud de 3 y la matriz de puntuación nwgspgdna.cmp; % de identidad y % de similitud de una secuencia de aminoácidos utilizando una ponderación de GAP de 8 y una ponderación de la longitud de 2 y la matriz de puntuación BLOSUM62; o cualquier programa equivalente de los mismos. "Programa equivalente" incluye cualquier programa de comparación de secuencias que, para dos secuencias cualquiera en cuestión, genera una alineación que tiene emparejamientos de restos de nucleótidos o aminoácidos idénticos y un porcentaje de identidad de secuencia idéntico en comparación con la alineación correspondiente generada por GAP Versión 10.

La expresión "sustitución de aminoácidos conservadora" se refiere a la sustitución de un aminoácido que normalmente está presente en la secuencia por un aminoácido diferente de tamaño, carga o polaridad similares. Los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un resto no polar (hidrófobo) tal como isoleucina, valina o leucina por otro resto no polar. Del mismo modo, los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un resto polar (hidrófilo) por otro, tal como entre arginina y lisina, entre glutamina y asparagina, o entre glicina y serina. De manera adicional, la sustitución de un resto básico tal como la lisina, arginina o histidina por otro, o la sustitución de un resto ácido tal como ácido aspártico o ácido glutámico por otro resto ácido son ejemplos adicionales de sustituciones conservadoras. Los ejemplos de sustituciones no conservadoras incluyen la sustitución de un resto de aminoácido no polar (hidrófobo) tal como isoleucina, valina, leucina, alanina o metionina por un resto polar (hidrófilo) tal como cisteína, glutamina, ácido glutámico o lisina y/o un resto polar por un resto no polar. Las categorizaciones habituales de aminoácidos se resumen a continuación.

Tabla 1. Clasificaciones de aminoácidos.

Alanina	Ala	A	No polar	Neutra	1,8
Arginina	Arg	R	Polar	Positiva	-4,5
Asparagina	Asn	N	Polar	Neutra	-3,5
Ácido aspártico	Asp	D	Polar	Negativa	-3,5
Cisteína	Cys	C	No polar	Neutra	2,5
Ácido glutámico	Glu	E	Polar	Negativa	-3,5
Glutamina	Gln	Q	Polar	Neutra	-3,5
Glicina	Gly	G	No polar	Neutra	-0,4
Histidina	His	H	Polar	Positiva	-3,2
Isoleucina	Ile	I	No polar	Neutra	4,5
Leucina	Leu	L	No polar	Neutra	3,8
Lisina	Lys	K	Polar	Positiva	-3,9
Metionina	Met	M	No polar	Neutra	1,9
Fenilalanina	Phe	F	No polar	Neutra	2,8
Prolina	Pro	P	No polar	Neutra	-1,6
Serina	Ser	S	Polar	Neutra	-0,8
Treonina	Thr	T	Polar	Neutra	-0,7
Triptófano	Trp	W	No polar	Neutra	-0,9
Tirosina	Tyr	Y	Polar	Neutra	-1,3
Valina	Val	V	No polar	Neutra	4,2

- Una secuencia "homóloga" (p. ej., secuencia de ácido nucleico) incluye una secuencia que es idéntica o sustancialmente similar a una secuencia de referencia conocida, de tal forma que es, por ejemplo, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de referencia conocida. Las secuencias homólogas pueden incluir, por ejemplo, secuencias ortólogas y secuencias parálogas. Los genes homólogos, por ejemplo, normalmente descienden de una secuencia de ADN ancestral común, ya sea a través de un evento de especiación (genes ortólogos) o un evento de duplicación genética (genes parálogos). Los genes "ortólogos" incluyen genes de diferentes especies que evolucionaron a partir de un gen ancestral común mediante especiación. Los ortólogos suelen conservar la misma función en el curso de la evolución. Los genes "parálogos" incluyen genes relacionados por duplicación dentro de un genoma. Los parálogos pueden desarrollar nuevas funciones en el curso de la evolución.
- 15 La expresión "*in vitro*" incluye entornos artificiales y procesos o reacciones que tienen lugar dentro de un entorno artificial (p. ej., un tubo de ensayo). La expresión "*in vivo*" incluye entornos naturales (p. ej., una célula, organismo o cuerpo) y procesos o reacciones que ocurren dentro de un entorno natural. La expresión "*ex-vivo*" incluye células que se han extraído del cuerpo de un individuo y procesos o reacciones que tienen lugar dentro de dichas células.
- 20 La expresión "gen indicador" se refiere a un ácido nucleico que tiene una secuencia que codifica un producto génico (típicamente una enzima) que se analiza de manera fácil y cuantificable cuando una construcción que comprende la secuencia del gen indicador unida operativamente a un elemento promotor y/o potenciador heterólogo se introduce en células que contienen (o que pueden hacerse que contengan) los factores necesarios para la activación de los elementos promotores y/o potenciadores. Los ejemplos de genes indicadores incluyen, pero sin limitación, genes que codifican la beta-galactosidasa (lacZ), los genes bacterianos de cloranfenicol acetiltransferasa (cat), genes de luciferasa de luciérnaga, genes que codifican beta-glucuronidasa (GUS) y genes que codifican proteínas fluorescentes. Una "proteína indicadora" se refiere a una proteína codificada por un gen indicador.
- 30 La expresión "proteína indicadora fluorescente", tal como se utiliza en el presente documento, significa una proteína indicadora que es detectable basándose en la fluorescencia, en donde la fluorescencia puede proceder directamente de la proteína indicadora, la actividad de la proteína indicadora sobre un sustrato fluorogénico o una proteína con afinidad por la unión a un compuesto con etiqueta fluorescente. Los ejemplos de proteínas fluorescentes incluyen proteínas verdes fluorescentes (p. ej., GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, eGFP, Emerald, Verde Azami, Verde Azami

- monomérico, CopGFP, AceGFP y ZsGreen1), proteínas fluorescentes amarillas (p. ej., YFP, eYFP, Citrina, Venus, YPet, PhiYFP y ZsYellow1), proteínas fluorescentes azules (p. ej., BFP, eBFP, eBFP2, Azurite, mKalamal, GFPuv, Sapphire y T-sapphire), proteínas fluorescentes cian (p. ej., CFP, eCFP, Cerulean, CyPet, AmCyan1 y Midoriishi-Cyan), proteínas fluorescentes rojas (p. ej., RFP, mKate, mKate2, mPlum, monómero de DsRed, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, monómero de DsRed, HcRed-Tandem, HcRed1, AsRed2, eqFP611, mRaspberry, mStrawberry y Jred), proteínas fluorescentes naranjas (p. ej., mOrange, mKO, Kusabira-Naranja, Kusabira-Naranja monomérica, mTangerine y tdTomato) y cualquier otra proteína fluorescente adecuada cuya presencia en las células pueda detectarse mediante métodos de citometría de flujo.
- 10 La reparación en respuesta a roturas de doble hebra (DSB) se produce principalmente a través de dos vías de reparación del ADN conservadas: recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ). Véase Kasperek & Humphrey (2011) *Seminars in Cell & Dev. Biol.* 22:886-897. Del mismo modo, la reparación de un ácido nucleico diana mediada por un ácido nucleico donante exógeno puede incluir cualquier proceso de intercambio de información genética entre los dos polinucleótidos.
- 15 El término "recombinación" incluye cualquier proceso de intercambio de información genética entre dos polinucleótidos y puede producirse por cualquier mecanismo. La recombinación puede producirse mediante reparación dirigida por homología (HDR) o recombinación homóloga (HR). La HDR o HR incluye una forma de reparación de ácidos nucleicos que puede requerir homología de secuencia de nucleótidos, utiliza una molécula "donante" como plantilla para la
- 20 reparación de una molécula "diana" (es decir, la que experimentó la rotura de la doble cadena), y conduce a la transferencia de información genética del donante a la diana. Sin desear quedar ligados a ninguna teoría particular, dicha transferencia puede implicar la corrección de emparejamiento erróneos del ADN heterodúplex que se forman entre la diana rota y el donante, y/o hibridación de cadena dependiente de síntesis, en donde el donante se utiliza para resintetizar la información genética que se convertirá en parte de la diana y/o procesos relacionados. En algunos
- 25 casos, el polinucleótido donante, un fragmento del polinucleótido donante, una copia del polinucleótido donante o un fragmento de una copia del polinucleótido donante se integra en el ADN diana. Véase Wang *et al.* (2013) *Cell* 153:910-918; Mandalos *et al.* (2012) *PLoS ONE* 7:e45768:1-9; y Wang *et al.* (2013) *Nat. Biotechnol.* 31:530-532.
- 30 NHEJ incluye la reparación de roturas de doble cadena en un ácido nucleico mediante la ligadura directa de los extremos de la rotura entre sí o con una secuencia exógena sin la necesidad de un molde homólogo. La ligadura de secuencias no contiguas por NHEJ a menudo puede dar como resultado deleciones, inserciones o translocaciones cerca del sitio de la rotura bicatenaria. Por ejemplo, NHEJ también puede dar como resultado la integración dirigida de un ácido nucleico donante exógeno mediante la ligadura directa de los extremos rotos con los extremos del ácido nucleico donante exógeno (es decir, captura basada en NHEJ). Dicha integración dirigida mediada por NHEJ puede
- 35 preferirse para la inserción de un ácido nucleico donante exógeno cuando las vías de reparación dirigida por homología (HDR) no son fácilmente utilizables (p. ej., en células que no se dividen, células primarias y células que realizan mal la reparación del ADN basada en homología). Adicionalmente, a diferencia de la reparación dirigida por homología, no se necesita conocimiento sobre grandes regiones de identidad de secuencia que flanquean el sitio de escisión, lo que puede resultar beneficioso cuando se intenta la inserción dirigida en organismos que tienen genomas cuya secuencia genómica no se conoce completamente. La integración puede realizarse mediante ligadura de extremos romos entre
- 40 el ácido nucleico donante exógeno y la secuencia genómica escindida, o mediante ligadura de extremos adhesivos (es decir, que tienen salientes 5' o 3') usando un ácido nucleico donante exógeno que está flanqueado por salientes que son compatibles con los generados por un agente nucleasa en la secuencia genómica escindida. Véase, p. ej., los documentos US 2011/020722, WO 2014/033644, WO 2014/089290 y Maresca *et al.* (2013) *Genoma Res.* 23(3):539-546. Si se ligan extremos romos, puede ser necesaria la resección de la diana y/o del donante para generar regiones de microhomología necesarias para la unión de fragmentos, lo que puede crear alteraciones no deseadas en la secuencia diana.
- 45 Las composiciones o métodos "que comprenden" o "que incluyen" uno o más elementos enumerados pueden incluir otros elementos no enumerados específicamente. Por ejemplo, una composición que "comprende" o "incluye" una proteína puede contener la proteína sola o en combinación con otros ingredientes. La expresión de transición "que consiste esencialmente en" significa que debe interpretarse que el alcance de una reivindicación abarca los elementos especificados enumerados en la reivindicación y los que no afectan materialmente a las características básicas y novedosas de la invención reivindicada. Así pues, no está previsto que la expresión "que consiste esencialmente en",
- 50 cuando se usa en una reivindicación de esta invención, se interprete como equivalente a "que comprende".
- "Opcional" u "opcionalmente" significa que el suceso o circunstancia descrito a continuación puede suceder o no y que la descripción incluye casos en los que el suceso o circunstancia ocurre y casos en los que no.
- 60 La designación de un intervalo de valores incluye todos los números enteros dentro del intervalo o que lo definen, y todos los subintervalos definidos por números enteros dentro del intervalo.
- A menos que resulte evidente de otro modo por el contexto, el término "aproximadamente" abarca valores dentro de un margen estándar de error de la medición (p. ej., EEM) de un valor declarado.
- 65 El término "y/o" se refiere y abarca todas y cada una de las combinaciones posibles de uno o más de los elementos

enumerados asociados, así como la ausencia de combinaciones cuando se interpreta en la alternativa ("o").

El término "o" se refiere a un miembro cualquiera de una lista particular y también incluye cualquier combinación de miembros de esa lista.

5 Las formas singulares de los artículos "un", "una", y "el/la" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por ejemplo, la expresión "una proteína" o "al menos una proteína" puede incluir una pluralidad de proteínas, incluyendo mezclas de las mismas.

10 Estadísticamente significativo significa $p \leq 0,05$.

Descripción detallada

I. Descripción general

15 En el presente documento se divulgan genomas de rata, células de rata, y ratas que comprenden un locus *Cfh* inactivado y métodos de uso de tales células de rata y ratas. También se divulgan en el presente documento genes *Cfh* de rata que comprenden una modificación genética dirigida que inactiva los genes *Cfh* de rata y agentes nucleasa para usar en la inactivación de un gen *Cfh* de rata, en donde los agentes nucleasa se dirigen y escinden un sitio diana de nucleasa en el gen *Cfh*. Las ratas divulgadas en el presente documento son propensas a altas tasas de muerte espontánea y presentan síntomas fisiológicos, morfológicos e histológicos que se parecen mucho a la glomerulopatía C3 (C3G). De esta manera, las ratas divulgadas en el presente documento se pueden usar para evaluar la eficacia terapéutica de compuestos o agentes candidatos para el tratamiento de la C3G.

25 La C3G es un espectro de trastornos que abarcan la glomerulonefritis C3 y la enfermedad de depósitos densos. La activación no regulada del complemento por la vía alternativa (AP) como resultado de defectos genéticos o adquiridos es la causa subyacente de la patología C3G. Los defectos adquiridos incluyen el desarrollo de factores nefríticos C3 y autoanticuerpos que estabilizan la vía alternativa de la C3 convertasa. Los defectos genéticos incluyen mutaciones en los componentes de la C3 convertasa, componente del complemento C3 y factor B del complemento, o proteínas reguladoras tales como el factor H del complemento (CFH), relacionadas con el CFH 1, 2, 3 y 5, factor I del complemento, CD46 y otros. Aproximadamente el 50 % de los pacientes con C3G progresan a una enfermedad renal terminal (ERT) dentro de los 10 años posteriores al diagnóstico con muy pocas opciones de tratamiento.

35 Histológicamente, los riñones de los pacientes con C3G muestran un depósito glomerular predominante de C3 en ausencia de inmunoglobulinas con una variedad de características patológicas que incluyen expansión de la matriz mesangial y proliferación de la membrana y endocapilar con formación de medias lunas en algunos casos. También hay evidencia histológica de depósito renal del complejo de ataque a la membrana (MAC), C5b-9, lo que sugiere la activación del componente C5 del complemento terminal. Sin embargo, no se observa una respuesta clínica completa en pacientes con C3G con eculizumab, un anticuerpo monoclonal bloqueador de C5, lo que sugiere la necesidad de nuevas estrategias terapéuticas.

45 CFH es un regulador negativo crítico de la vía alternativa. Controla la activación del complemento disminuyendo la formación y aumentando la disociación de la vía alternativa de la C3 convertasa 2. En pacientes con C3G se han descrito mutaciones del CFH que conducen a su pérdida de función o deficiencia. Los niveles de C3 se agotan en estos pacientes debido a la activación incontrolada del complemento. También se identificó una mutación espontánea en CFH en cerdos que conduce a su deficiencia y a su fenotipo similar a la C3G letal.

50 Los ratones deficientes en el factor H del complemento (*Cfh*^{-/-}) han sido una herramienta para comprender los mecanismos subyacentes a la C3G. Al igual que los pacientes humanos, los ratones *Cfh*^{-/-} presentan activación no regulada del complemento de la vía alternativa y patologías glomerulares compatibles con el depósito de C3 y MAC con inmunoglobulinas mínimas, así como hiperplasia, expansión de la matriz mesangial y depósitos densos en electrones. Sin embargo, los ratones *Cfh*^{-/-} no muestran una mortalidad temprana y el desarrollo de ERT puede tardar varios meses en manifestarse, lo que exige largos estudios preclínicos para evaluar nuevas terapias. Así pues, se necesitan modelos de C3G alternativos.

55 En el presente documento se divulgan ratas *Cfh*^{-/-} que fueron desarrolladas usando la tecnología VELOCIGENE®. En general, nuestros datos indican que las ratas *Cfh*^{-/-} presentaban características moleculares y patológicas de C3G, incluyendo la disminución de los niveles circulatorios de C3 (lo que sugiere un consumo de C3 debido a la hiperactivación del complemento por la vía alternativa), elevación del nitrógeno ureico en sangre y de la cistatina C en suero (lo que sugiere insuficiencia renal), albúmina urinaria elevada (albuminuria), depósito de C3 y C5b-9 en los glomérulos, glomeruloesclerosis, atrofia tubular y cilindros proteicos en los túbulos. Adicionalmente, nuestros datos indican que las ratas *Cfh*^{-/-} presentaban una marcada patología glomerular que incluía borramiento y contorsión de podocitos (borramiento epitelial medido por el aumento de la anchura del proceso del pie y menos procesos del pie), engrosamiento de la membrana basal glomerular (MBG) con interposición celular y depósitos densos en electrones, expansión mesangial e inflamación endotelial con pérdida de fenestras. A diferencia de los ratones *Cfh*^{-/-}, sin embargo, una mayoría de las ratas *Cfh*^{-/-} sucumben a la ERT y lo hacen a una edad promedio de 52 días en los machos y 103

días en las hembras, permitiendo de este modo estudios preclínicos más cortos para evaluar nuevas terapias.

II. Ratas que comprenden un locus *Cfh* inactivado

5 Las células de rata y las ratas divulgadas en el presente documento comprenden un locus *Cfh* inactivado. Estas ratas recapitulan el fenotipo de la glomerulopatía C3 (C3G) y tienen ventajas sobre los modelos de C3G existentes.

A. Factor H del complemento (CHF), la vía alternativa (AC) del complemento y la glomerulopatía C3 (C3G)

10 Las células de rata y las ratas descritas en el presente documento comprenden un locus *Cfh* inactivado. El factor H del complemento (CHF; también conocido como factor H, factor H del componente del complemento, factor H del complemento plaquetario, factor H inhibidor del complemento y proteína de unión a adrenomedulina-1) está codificado por el gen *Cfh* (también conocido como *Fh*, *Ambp-1* y *Ambp1*). El factor H del complemento funciona como cofactor en la inactivación de C3b por el factor I y también aumenta la tasa de disociación del complejo C3bBb (C3 convertasa) y el complejo (C3b)NBB (C5 convertasa) en la vía alternativa del complemento. El factor H es miembro de la familia de reguladores de la activación del complemento y es una proteína de control del complemento. Es una glicoproteína soluble grande que circula en el plasma, y su función principal es regular la vía alternativa del sistema del complemento, asegurando que el sistema del complemento se dirija hacia patógenos u otro material peligroso y no dañe el tejido del hospedador. El factor H regula la activación del complemento sobre las propias células y superficies al poseer actividad de cofactor para la escisión de C3b mediada por el factor I y actividad aceleradora de la descomposición contra la vía alternativa de la C3 convertasa, C3bBb. El factor H ejerce su acción protectora sobre las propias células y superficies, pero no sobre las superficies de bacterias o virus. Esto puede debido a que el factor H tiene la capacidad de adoptar conformaciones diferentes con actividad menor o mayor. La conformación de actividad menor es la forma predominante en solución y es suficiente para controlar la amplificación en fase fluida. Se cree que la conformación más activa se induce cuando el factor H se une a los glicosaminoglicanos y/o a los ácidos siálicos que generalmente están presentes en las células hospedadoras pero no normalmente en las superficies del patógeno, asegurando que las superficies propias estén protegidas mientras que el complemento avanza sin cesar sobre superficies extrañas.

30 El *Cfh* de rata se ha cartografiado en el 13q13 del cromosoma 13 de rata (NCBI RefSeq, ID gen 155012; Ensamblaje Rnor_6.0 (GCF_000001895.5); ubicación NC_005112.4 (56979155..57080540, complemento)). Se ha publicado que el gen tiene 22 exones. Un ejemplo de secuencia del locus genómico *Cfh* de rata se establece en la SEQ ID NO: 1. La referencia al locus genómico *Cfh* de rata incluye la forma de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) así como todas las formas alélicas e isoformas. Cualquier otra forma de locus genómico *Cfh* de rata tiene nucleótidos numerados para una alineación máxima con la forma de tipo silvestre, designándose los nucleótidos alineados con el mismo número. Otras secuencias de locus genómico *Cfh* de rata pueden ser homólogas o formas alélicas o isoformas al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % idénticas a la SEQ ID NO: 1. A la proteína CFH de rata de tipo silvestre se le ha asignado los números de registro UniProt Q5XJW6, G3V9R2, F1M983 y Q91YB6 y el número de registro del NCBI NP_569093.2 (establecido en la SEQ ID NO: 3). La referencia a la proteína CFH de rata incluye la forma silvestre (NP_569093.2; SEQ ID NO: 3) así como todas las formas alélicas e isoformas. Cualquier otra forma de CFH de rata tiene aminoácidos numerados para una máxima alineación con la forma de tipo silvestre, designándose los aminoácidos alineados con el mismo número. Otras secuencias de proteína CFH de rata pueden ser homólogas o formas alélicas o isoformas al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % idénticas a la SEQ ID NO: 3. A un ARNm (ADNc) que codifica NP_569093.2 se le asigna el número de registro del NCBI NM_130409.2 (establecido en la SEQ ID NO: 16). Otras secuencias de ARNm (ADNc) de *Cfh* de rata pueden ser homólogas o formas alélicas o isoformas al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % idénticas a la SEQ ID NO: 16. Una secuencia codificante de ejemplo para la proteína CFH de rata se establece en la SEQ ID NO: 2. Otras secuencias codificantes de *Cfh* de rata pueden ser homólogas o formas alélicas o isoformas al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % idénticas a la SEQ ID NO: 2. La referencia al ARNm (ADNc) de *Cfh* de rata y la secuencia codificante incluye las formas de tipo silvestre (SEQ ID NOS: 16 y 2, respectivamente) así como todas las formas alélicas e isoformas. Cualquier otra forma de ARNm (ADNc) de *Cfh* de rata y la secuencia codificante tienen nucleótidos numerados para una alineación máxima con la forma silvestre, designándose los nucleótidos alineados con el mismo número.

65 El sistema del complemento es un componente clave de la inmunidad innata que contribuye a las defensas del

hospedador contra patógenos invasores a través de múltiples mecanismos, que incluyen opsonización, lisis celular y reclutamiento de células inflamatorias, una acción mediada principalmente a través de la anafilatoxina C5a. La activación del complemento está regulada por un grupo complejo de proteínas unidas a la membrana y en fase fluida. El sistema del complemento comprende tres vías interrelacionadas, la vía clásica, la vía de las lectinas y la vía alternativa. Véase la **Figura 7**. Sin embargo, la desregulación de esta última es característica de la glomerulopatía C3 (C3G).

La vía alternativa (AP) del complemento es única. En primer lugar, a diferencia de las otras vías, no requiere ninguna proteína desencadenante específica y permanece continuamente activa a través de un proceso conocido como activación al ralentí. La proteína de la vía alternativa inicial, C3, se activa espontáneamente mediante hidrólisis para formar C3(H₂O). La activación al ralentí es responsable de una activación constante de bajo nivel de la vía alternativa. Es esta característica la que subraya la importancia de las proteínas que controlan y protegen los tejidos propios de la actividad perpetua del complemento.

C3 activado recluta el factor B (FB) del complemento y a continuación el factor D (FD). FD escinde el FB unido a C3(H₂O) en Bb, liberando Ba y formando la vía alternativa de la C3 convertasa [C3(H₂O)Bb], una potente serina proteasa. Esta proteasa facilita un proceso conocido como amplificación, otra característica única de la vía alternativa. Como resultado de la amplificación, la convertasa escinde exponencialmente C3 adicional en C3b y C3a, creando más enzimas C3 convertasas (C3bBb). La vía alternativa funciona como el brazo efector tanto de la vía clásica como de la de las lectinas. La actividad iniciada por cualquiera de estas vías se amplifica a través de la vía alternativa.

La asociación de moléculas C3b adicionales con el complejo C3 convertasa crea la enzima de la vía terminal, la C5 convertasa (C3bBbC3b). La C5 convertasa escinde C5 en C5b, el primer componente del complejo del complemento terminal, y C5a. C5b se asocia con C6 y C7, con la interacción posterior con C8 que induce la unión de varias unidades de C9 para formar el complejo lítico C5b-C9 (C5b-9), también conocido como complejo de ataque a la membrana. Este complejo lítico forma la base de la destrucción de bacterias diana mediada por el complemento. Finalmente, además de la producción del complejo del complemento terminal, la generación de anafilatoxinas C3a y C5a durante la activación del complemento aumenta la función inmunitaria de la vía alternativa. Ambas anafilatoxinas desempeñan un papel fundamental en la inflamación mediada por el complemento.

Se han identificado varias proteínas de control del complemento. Aquellas que actúan para controlar la actividad de la vía alternativa (e indirectamente la vía del complemento terminal) incluyen el factor H (HF) del complemento, la proteína cofactor de membrana (MCP), el factor acelerador de la descomposición (DAF), el receptor del complemento 1 (CR1) y el factor I (FI) del complemento. El control del complemento es necesario para limitar los efectos adversos del daño a la célula hospedadora debido a un sistema del complemento continuamente activo o a una vía alternativa que ha sido desencadenada por un desencadenante inmunológico innato. El factor H es una abundante proteína reguladora del complemento en suero que inhibe la vía alternativa de activación del complemento. Lo logra a través de varios mecanismos, que incluyen la inhibición de la vía alternativa del complejo enzimático C3 convertasa (C3bBb) y actúa como cofactor para la degradación proteolítica mediada por el factor I de C3 activado (denominado C3b). Su importancia crítica como regulador de la activación de C3 *in vivo* se ilustra mediante el perfil del complemento descrito en individuos con deficiencia de factor H, donde la activación de la vías alternativa se produce sin obstáculos, dando como resultado niveles notablemente disminuidos de C3.

La glomerulopatía C3 (C3G) describe un espectro de enfermedades glomerulares definidas por la patología de la biopsia renal compartida: un predominio del depósito de C3 en la inmunofluorescencia con microscopía electrónica que permite la subclasificación de la enfermedad. Actualmente, la C3G se subdivide en dos subtipos principales de microscopía electrónica: enfermedad de depósitos densos (DDD) y glomerulonefritis C3 (C3GN). Antes de 2013, una parte de los pacientes con C3G tenían el diagnóstico de glomerulonefritis membranoproliferativa (MPGN) o glomerulonefritis mesangioproliferativa. Estos mismos pacientes ahora se denominarían pacientes C3G según la apariencia microscópica de sus glomérulos. La desregulación del complemento subyace a la patología observada, una relación causal que está respaldada por estudios sobre los factores genéticos y adquiridos de la enfermedad. El sistema del complemento es un conjunto de proteínas en la sangre que, cuando funciona correctamente, ayudan (complementan) al sistema inmunitario para combatir invasores como bacterias y virus. Sin embargo, cuando el sistema del complemento se activa anormalmente, tal como en la C3G, las proteínas normales del complemento, como C3, se pueden degradar. Los productos de degradación de C3 se alojan en el riñón, desencadenando reacciones que dañan los glomérulos. Los glomérulos dañados no pueden filtrar muy bien la sangre y se reduce la producción de orina. Si esto continúa, las toxinas pueden acumularse en la sangre, se puede dañar más tejido renal y la capacidad del riñón para realizar otras funciones importantes puede disminuir. Algunos síntomas comunes de C3G incluyen sangre en la orina (hematuria), exceso de proteínas en la orina (proteinuria), tasa de filtración glomerular reducida (TFG; capacidad reducida del riñón para filtrar la sangre y producir orina), creatinina elevada, cansancio e hinchazón (edema) de las manos, pies y tobillos. Otros síntomas incluyen disminución de los niveles circulatorios de C3, aumento de los niveles de nitrógeno ureico en sangre, aumento del depósito de C3 en los riñones, aumento del depósito del complejo de ataque a la membrana C5b-9 en los riñones y disminución de la esperanza de vida (mortalidad espontánea).

Se creó un modelo de ratón con predominio de C3 en la biopsia renal y un patrón de C3GN en la histología renal

mediante alteración dirigida de CFH. Este modelo sigue siendo el modelo principal utilizado para estudiar la C3G en la actualidad. Sin embargo, la enfermedad renal terminal (ERT) puede tardar varios meses en manifestarse en ratones *Cfh*^{-/-}, lo que exige largos estudios preclínicos para evaluar nuevas terapias. Se necesitan mejores modelos de C3G que desarrollen C3G y ERT de manera más rápida y consistente.

5

B. Locus *Cfh* inactivados

Un locus *Cfh* endógeno inactivado o un gen *Cfh* inactivado es un locus *Cfh* o un gen *Cfh* que no produce la proteína factor H del complemento (CFH) o no produce una proteína CFH funcional. Las funciones del CFH incluyen la inhibición del complejo enzimático C3 convertasa de la vía alternativa (C3bBb) y la actuación como cofactor para la degradación proteolítica mediada por el factor I del C3 activado (C3b). Una proteína CFH que no es funcional no es capaz de inhibir la vía alternativa del complejo enzimático C3 convertasa (C3bBb) ni actuar como cofactor para la degradación proteolítica mediada por el factor I del C3 activado (C3b).

10

Como ejemplo, un locus *Cfh* endógeno inactivado o un gen *Cfh* inactivado puede ser uno en el cual el codón de inicio del locus *Cfh* o el gen *Cfh* endógeno se ha eliminado, se ha interrumpido o mutado de manera que el codón de inicio ya no es funcional. Por ejemplo, el codón de inicio puede interrumpirse mediante una deleción o inserción dentro del codón de inicio. Como alternativa, el codón de inicio puede mutarse mediante, por ejemplo, una sustitución de uno o más nucleótidos.

15

20

Como otro ejemplo, el codón de inicio del locus *Cfh* o el gen *Cfh* endógeno puede eliminarse o la secuencia codificante en el primer exón del locus *Cfh* endógeno o el gen *Cfh* puede eliminarse. Como ejemplo específico, se pueden eliminar el codón de inicio y la secuencia codificante en el primer exón, y se puede eliminar el sitio donante de corte y empalme en el primer intrón.

25

Como otro ejemplo, parte, la mayor parte o la totalidad de la secuencia codificante en el locus *Cfh* o el gen *Cfh* endógeno puede eliminarse. Por ejemplo, la secuencia codificante en el exón 1, exones 1-2, exones 1-3, exones 1-4, exones 1-5, exones 1-6, exones 1-7, exones 1-8, exones 1-9, exones 1-10, exones 1-11, exones 1-12, exones 1-13, exones 1-14, exones 1-15, exones 1-16, exones 1-17, exones 1-18, exones 1-19, exones 1-20, exones 1-21 o exones 1-22 puede eliminarse. En un ejemplo específico, la secuencia codificante en los exones 1-21 o en los exones 1-22 puede eliminarse. Como alternativa, al menos aproximadamente un 1 %, al menos aproximadamente un 2 %, al menos aproximadamente un 3 %, al menos aproximadamente un 4 %, al menos aproximadamente un 5 %, al menos aproximadamente un 6 %, al menos aproximadamente un 7 %, al menos aproximadamente un 8 %, al menos aproximadamente un 9 %, al menos aproximadamente un 10 %, al menos aproximadamente un 15 %, al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 25 %, al menos aproximadamente un 30 %, al menos aproximadamente un 35 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 45 %, al menos aproximadamente un 50 %, al menos aproximadamente un 55 %, al menos aproximadamente un 60 %, al menos aproximadamente un 65 %, al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 75 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, al menos aproximadamente un 90 %, o al menos aproximadamente un 95 % de la secuencia codificante en el locus *Cfh* o el gen *Cfh* endógeno, incluyendo el codón de inicio, puede eliminarse. En otro ejemplo, toda la secuencia codificante en el locus *Cfh* o el gen *Cfh* endógeno se elimina.

30

35

40

Un ejemplo específico de una secuencia eliminada de un locus *Cfh* o gen *Cfh* endógeno para inactivarlo es la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 5 o una secuencia correspondiente a los nucleótidos 97-242 en la SEQ ID NO: 1 (es decir, SEQ ID NO: 5) cuando está óptimamente alineada con la secuencia del locus genómico *Cfh* de rata establecida en la SEQ ID NO: 1 (p. ej., una secuencia homóloga al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 5). Un ejemplo específico de locus *Cfh* o gen *Cfh* endógeno inactivado es la secuencia establecida en la SEQ ID NO: 4 o una secuencia con una deleción correspondiente a la deleción en la SEQ ID NO: 4 respecto a la SEQ ID NO: 1 cuando está alineada de manera óptima con la SEQ ID NO: 1 (p. ej., una secuencia homóloga al menos aproximadamente un 90 %, al menos aproximadamente un 91 %, al menos aproximadamente un 92 %, al menos aproximadamente un 93 %, al menos aproximadamente un 94 %, al menos aproximadamente un 95 %, al menos aproximadamente un 96 %, al menos aproximadamente un 97 %, al menos aproximadamente un 98 % o al menos aproximadamente un 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 4).

45

50

55

C. Genomas de rata, células de rata y ratas que comprenden un locus *Cfh* inactivado

Se proporcionan genomas de rata, células de rata y ratas que comprenden un locus *Cfh* inactivado o gen *Cfh* inactivado como se describe en otra parte del presente documento. Los genomas, las células o las ratas pueden ser machos o hembras. Los genomas de rata, las células de rata, o las ratas pueden ser heterocigotas u homocigotas para el locus *Cfh* inactivado. Preferentemente, los genomas, células, o ratas, tales como los utilizados en los métodos divulgados en el presente documento, son homocigotas para el locus *Cfh* inactivado. Un organismo diploide tiene dos alelos en cada locus genético. Cada par de alelos representa el genotipo de un locus genético específico. Los genotipos se

60

65

describen como homocigotos si hay dos alelos idénticos en un locus particular y como heterocigotos si los dos alelos difieren.

5 Los genomas de rata, células de rata, y las ratas proporcionados en el presente documento pueden ser, por ejemplo, cualquier genoma de rata, célula de rata, o rata que comprende un locus *Cfh*. Las células de rata también pueden estar en cualquier tipo de estado indiferenciado o diferenciado. Por ejemplo, una célula de rata puede ser una célula totipotente, una célula pluripotente (p. ej., célula pluripotente de rata tal como una célula madre embrionaria (ES) de rata) o una célula no pluripotente. Las células totipotentes incluyen células indiferenciadas que pueden dar lugar a cualquier tipo de célula, y las células pluripotentes incluyen células indiferenciadas que poseen la capacidad de desarrollarse en más de un tipo de célula diferenciada. Tales células pluripotentes y/o totipotentes pueden ser, por ejemplo, células ME o células similares a ME, tales como células madre pluripotentes inducidas (iPS). Las células ES incluyen células totipotentes o pluripotentes derivadas de embriones que son capaces de contribuir a cualquier tejido del embrión en desarrollo tras su introducción en un embrión. Las células ES pueden proceder de la masa celular interna de un blastocisto y son capaces de diferenciarse en células de cualquiera de las tres capas germinales de los vertebrados (endodermo, ectodermo y mesodermo).

15 Las células proporcionadas en el presente documento también pueden ser células germinales (p. ej., espermatozoides u ovocitos). Las células pueden ser células mitóticamente competentes o células mitóticamente inactivas, células meióticamente competentes o células meióticamente inactivas. Análogamente, las células también pueden ser células somáticas primarias o células que no son una célula somática primaria. Las células somáticas incluyen cualquier célula que no sea un gameto, célula germinal, gametocito o célula madre indiferenciada. Por ejemplo, las células pueden ser células renales.

20 Las células adecuadas proporcionadas en el presente documento también incluyen células primarias. Las células primarias incluyen células o cultivos de células que se han aislado directamente de un organismo, órgano o tejido. Las células primarias incluyen células que no están transformadas ni son inmortales. Incluyen cualquier célula obtenida de un organismo, órgano o tejido que no se ha sometido a pases previos en cultivo tisular o que se ha sometido a pases previos en cultivo tisular pero no puede someterse a pases previos de manera indefinida en cultivo tisular. Dichas células pueden aislarse mediante técnicas convencionales e incluyen, por ejemplo, células renales.

25 Otras células adecuadas proporcionadas en el presente documento incluyen células inmortalizadas. Las células inmortalizadas incluyen células de un organismo multicelular que normalmente no proliferarían indefinidamente pero que, debido a una mutación o alteración, han evadido la senescencia celular normal y pueden seguir experimentando división. Estas mutaciones o alteraciones pueden producirse de forma natural o ser inducidas de manera intencionada. Son bien conocidos numerosos tipos de células inmortalizadas. Las células inmortalizadas o primarias incluyen células que normalmente se usan para cultivar o para expresar genes o proteínas recombinantes.

30 Las células proporcionadas en el presente documento también incluyen embriones en fase unicelular (es decir, ovocitos o cigotos fertilizados). Estos embriones en fase unicelular pueden tener cualquier origen genético, pueden ser frescos o congelados y pueden obtenerse por reproducción natural o fertilización *in vitro*. Las células proporcionadas en el presente documento pueden ser normales, células sanas o pueden ser células enfermas o portadoras de mutantes.

35 Las ratas que comprenden un locus *Cfh* inactivado como se describe en el presente documento pueden producirse mediante los métodos descritos en otra parte del presente documento. Las ratas pueden ser de cualquier cepa de rata, que incluye, por ejemplo, una cepa de rata ACI, una cepa de rata Dark Agouti (DA), una cepa de rata Wistar, una cepa de rata LEA, una cepa de rata Sprague Dawley (SD), o una cepa de rata Fischer tal como Fisher F344 o Fisher F6. Las ratas también pueden obtenerse de una cepa derivada de una mezcla de dos o más cepas indicadas anteriormente. Por ejemplo, una rata adecuada puede ser de una cepa DA o una cepa ACI. La cepa de rata ACI se caracteriza por tener agutí negro, con vientre y patas blancas y un haplotipo *RT1^{av1}*. Dichas cepas están disponibles en una diversidad de fuentes incluidos los Harlan Laboratories. La cepa de rata Dark Agouti (DA) se caracteriza por tener un pelaje agutí y un haplotipo *RT1^{av1}*. Dichas ratas están disponibles en una diversidad de fuentes incluidos los Charles River y Harlan Laboratories. Algunas ratas adecuadas pueden proceder de una cepa de ratas endogámicas. Véase, p. ej., el documento US 2014/0235933.

40 En un ejemplo específico, el gen *Cfh* está inactivado en células madre embrionarias de una cepa Dark Agouti. En un ejemplo específico, estas células ES se introducen a continuación en un embrión hospedador de rata Sprague Dawley para producir una quimera. La quimera puede a continuación, por ejemplo, aparearse con una rata Sprague Dawley para producir animales F1, que a continuación pueden cruzarse para establecer una línea de rata con un locus *Cfh* inactivado. Por ejemplo, la línea nuligénica para *Cfh* de rata final puede ser 50 % Dark Agouti y 50 % Sprague Dawley.

45 Las ratas que comprenden un locus *Cfh* endógeno inactivado tienen uno o más síntomas de glomerulopatía C3 (C3G) como se divulga en otra parte del presente documento. El término "síntoma" se refiere a la evidencia objetiva de una enfermedad observada por un médico.

50 Como ejemplo, las ratas que comprenden un locus *Cfh* endógeno inactivado pueden tener niveles circulatorios

disminuidos de la proteína componente 3 (C3) del complemento en comparación con una rata de tipo silvestre (p. ej., de aproximadamente 7 semanas a aproximadamente 17 semanas de edad). Por ejemplo, los niveles circulatorios de C3 pueden ser menos de aproximadamente 200 µg/ml o menos de aproximadamente 100 µg/ml. Por ejemplo, los niveles circulatorios de C3 pueden ser menos de aproximadamente 200 µg/ml o menos de aproximadamente 100 µg/ml aproximadamente a las 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, o aproximadamente 17 semanas de edad. Por ejemplo, los niveles circulatorios de C3 pueden estar entre aproximadamente 25 y aproximadamente 200, entre aproximadamente 25 y aproximadamente 175, entre aproximadamente 25 y aproximadamente 150, entre aproximadamente 25 y aproximadamente 125, entre aproximadamente 25 y aproximadamente 100, o entre aproximadamente 25 y aproximadamente 75 µg/ml (p. ej., a aproximadamente las 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, o aproximadamente 17 semanas de edad).

Como otro ejemplo, las ratas que comprenden un locus *Cfh* endógeno inactivado puede tener un mayor depósito de C3 en los riñones (p. ej., en los glomérulos de los riñones) en comparación con una rata de tipo silvestre (p. ej., de aproximadamente 7 semanas a aproximadamente 17 semanas de edad). Como otro ejemplo, las ratas que comprenden un locus *Cfh* endógeno inactivado pueden tener un mayor depósito del complejo de ataque a la membrana C5b-9 (MAC; o complejo del complemento terminal C5b-9) en los riñones (p. ej., en los glomérulos de los riñones) en comparación con una rata de tipo silvestre (p. ej., de aproximadamente 7 semanas a aproximadamente 17 semanas de edad).

Como otro ejemplo, las ratas que comprenden un locus *Cfh* endógeno inactivado pueden tener niveles elevados de nitrógeno ureico en sangre (BUN) en comparación con una rata de tipo silvestre (p. ej., de aproximadamente 7 semanas a aproximadamente 17 semanas de edad). Por ejemplo, los niveles elevados de BUN pueden ser al menos aproximadamente o más de aproximadamente 10, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 20, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 30, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 40, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 50, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 60, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 70, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 80, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 90, o al menos aproximadamente o más de aproximadamente 100 mg/dl (p. ej., a aproximadamente las 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, o aproximadamente 17 semanas de edad). Por ejemplo, los niveles de BUN pueden estar entre aproximadamente 10 y aproximadamente 400, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 350, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 300, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 250, entre aproximadamente 10 y aproximadamente 200, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 400, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 350, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 300, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 250, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 200, entre aproximadamente 30 y aproximadamente 400, entre aproximadamente 30 y aproximadamente 350, entre aproximadamente 30 y aproximadamente 300, entre aproximadamente 30 y aproximadamente 250, entre aproximadamente 30 y aproximadamente 200, entre aproximadamente 40 y aproximadamente 400, entre aproximadamente 40 y aproximadamente 350, entre aproximadamente 40 y aproximadamente 300, entre aproximadamente 40 y aproximadamente 250, entre aproximadamente 40 y aproximadamente 200, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 400, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 350, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 300, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 250, o entre aproximadamente 50 y aproximadamente 200 mg/dl (p. ej., a aproximadamente las 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, o aproximadamente 17 semanas de edad).

Como otro ejemplo, las ratas que comprenden un locus *Cfh* endógeno inactivado pueden tener una esperanza de vida más corta en comparación con una rata de tipo silvestre. Por ejemplo, la esperanza de vida o la mediana de la esperanza de vida de una rata o poblaciones de ratas que comprenden un locus *Cfh* endógeno inactivado puede ser menos de aproximadamente 300 días, menos de aproximadamente 250 días, menos de aproximadamente 200 días, menos de aproximadamente 150 días, menos de aproximadamente 140 días, menos de aproximadamente 130 días, menos de aproximadamente 120 días, menos de aproximadamente 110 días, menos de aproximadamente 100 días, menos de aproximadamente 90 días, menos de aproximadamente 80 días, menos de aproximadamente 70 días, menos de aproximadamente 60 días, o menos de aproximadamente 50 días. En un ejemplo específico, la mediana de la esperanza de vida es menos de aproximadamente 150 días o menos de aproximadamente 110 días. En un ejemplo específico, la esperanza de vida es menos de aproximadamente 250 días, menos de aproximadamente 150 días, o menos de aproximadamente 130 días. Por ejemplo, la esperanza de vida o la mediana de la esperanza de vida de una rata o poblaciones de ratas que comprenden un locus *Cfh* endógeno inactivado puede estar entre aproximadamente 25 y aproximadamente 75, entre aproximadamente 30 y aproximadamente 70, entre

aproximadamente 35 y aproximadamente 65, entre aproximadamente 40 y aproximadamente 60, entre aproximadamente 45 y aproximadamente 55, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 55, entre aproximadamente 75 y aproximadamente 125, entre aproximadamente 80 y aproximadamente 120, entre aproximadamente 85 y aproximadamente 115, entre aproximadamente 90 y aproximadamente 110, entre
 5 aproximadamente 95 y aproximadamente 105, entre aproximadamente 100 y aproximadamente 105, entre aproximadamente 25 y aproximadamente 125, entre aproximadamente 30 y aproximadamente 120, entre aproximadamente 35 y aproximadamente 115, entre aproximadamente 40 y aproximadamente 110, entre aproximadamente 45 y aproximadamente 105, o entre aproximadamente 50 y aproximadamente 105 días.

10 Como otro ejemplo, las ratas que comprenden un locus *Cfh* endógeno inactivado pueden tener niveles elevados de cistatina C en suero en comparación con una rata de tipo silvestre (p. ej., de aproximadamente 7 semanas a aproximadamente 17 semanas de edad). Por ejemplo, los niveles de cistatina C en suero pueden ser al menos aproximadamente o más de aproximadamente 1000, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 1100,
 15 aproximadamente 1300, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 1400, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 1500, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 1600, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 1700, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 1800, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 1900, o al menos aproximadamente o más de aproximadamente 2000 ng/ml (p. ej., a aproximadamente las 7 semanas, aproximadamente 8 semanas,
 20 aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, o aproximadamente 17 semanas de edad). Por ejemplo, los niveles de cistatina C en suero pueden estar entre aproximadamente 1000 y aproximadamente 5000, entre aproximadamente 1000 y aproximadamente 4500, entre aproximadamente 1000 y aproximadamente 4000, entre aproximadamente 1000 y aproximadamente 3500, entre aproximadamente 1000 y aproximadamente 3000, entre aproximadamente 1100 y aproximadamente 5000, entre aproximadamente 1100 y aproximadamente 4500, entre aproximadamente 1100 y aproximadamente 4000, entre aproximadamente 1100 y aproximadamente 3500, entre aproximadamente 1100 y aproximadamente 3000, entre aproximadamente 1200 y aproximadamente 5000, entre aproximadamente 1200 y aproximadamente 4500, entre aproximadamente 1200 y aproximadamente 4000, entre aproximadamente 1200 y aproximadamente 3500, entre aproximadamente 1200 y aproximadamente 3000, entre aproximadamente 1300 y aproximadamente 5000, entre aproximadamente 1300 y aproximadamente 4500, entre aproximadamente 1300 y aproximadamente 4000, entre aproximadamente 1300 y aproximadamente 3500, entre aproximadamente 1300 y aproximadamente 3000, entre aproximadamente 1400 y aproximadamente 5000, entre aproximadamente 1400 y aproximadamente 4500, entre aproximadamente 1400 y aproximadamente 4000, entre aproximadamente 1400 y aproximadamente 3500, entre aproximadamente 1400 y aproximadamente 3000, entre aproximadamente 1500 y aproximadamente 5000, entre aproximadamente 1500 y aproximadamente 4500, entre aproximadamente 1500 y aproximadamente 4000, entre aproximadamente 1500 y aproximadamente 3500, o entre aproximadamente 1500 y aproximadamente 3000 ng/ml (p. ej., a aproximadamente las 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12
 35 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, o aproximadamente 17 semanas de edad).

Como otro ejemplo, las ratas que comprenden un locus *Cfh* endógeno inactivado pueden tener niveles elevados de albúmina urinaria (albuminuria) en comparación con una rata de tipo silvestre (p. ej., de aproximadamente 7 semanas a aproximadamente 17 semanas de edad). Por ejemplo, el aumento de albúmina urinaria puede medirse como albúmina urinaria por día o normalizarse a creatinina. Por ejemplo, la albúmina urinaria/día puede ser, p. ej., al menos aproximadamente o más de aproximadamente 1000, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 2000, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 3000, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 4000, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 5000, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 6000, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 7000, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 8000, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 9000, o al menos aproximadamente o más de aproximadamente 10000 µg/día (p. ej., a aproximadamente las 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, o aproximadamente 17 semanas de edad). Por ejemplo, la albúmina urinaria/día puede, p. ej., ser entre aproximadamente 1000 y aproximadamente 40000, entre aproximadamente 2000 y aproximadamente 40000, entre aproximadamente 3000 y aproximadamente 40000, entre aproximadamente 4000 y aproximadamente 40000, o entre aproximadamente 5000 y aproximadamente 40000 µg/día (p. ej., a aproximadamente las 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, o aproximadamente 17 semanas de edad). Por ejemplo, la albúmina urinaria normalizada a creatinina urinaria (es decir, la relación entre albúmina urinaria y creatinina urinaria) puede ser, p. ej., al menos aproximadamente o más de aproximadamente 100, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 200, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 300, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 400, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 500, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 600, al
 65

menos aproximadamente o más de aproximadamente 700, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 800, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 900, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 1000, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 1100, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 1200, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 1300, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 1400, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 1500, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 1600, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 1700, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 1800, al menos aproximadamente o más de aproximadamente 1900, o al menos aproximadamente o más de aproximadamente 2000 µg:mg (p. ej., a aproximadamente las 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, o aproximadamente 17 semanas de edad). Por ejemplo, la albúmina urinaria normalizada a creatinina urinaria (es decir, la relación entre albúmina urinaria y creatinina urinaria) puede ser, p. ej., entre aproximadamente 100 y aproximadamente 6000, entre aproximadamente 200 y aproximadamente 6000, entre aproximadamente 300 y aproximadamente 6000, entre aproximadamente 400 y aproximadamente 6000, entre aproximadamente 500 y aproximadamente 6000, entre aproximadamente 1000 y aproximadamente 6000, entre aproximadamente 100 y aproximadamente 5000, entre aproximadamente 200 y aproximadamente 5000, entre aproximadamente 300 y aproximadamente 5000, entre aproximadamente 400 y aproximadamente 5000, entre aproximadamente 500 y aproximadamente 5000, o entre aproximadamente 1000 y aproximadamente 5000 µg:mg (p. ej., a aproximadamente las 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, o aproximadamente 17 semanas de edad).

Como otro ejemplo, las ratas que comprenden un locus *Cfh* endógeno inactivado pueden presentar una marcada patología glomerular que incluye borramiento y contorsión de los podocitos (borramiento epitelial medido por el aumento de la anchura de los procesos del pie y menos procesos del pie), engrosamiento de la membrana basal glomerular (MBG) (p. ej., con interposición celular y depósitos densos en electrones), expansión mesangial y/o inflamación endotelial con pérdida de fenestras (p. ej., de aproximadamente 7 semanas a aproximadamente 17 semanas de edad).

Como ejemplo, el aumento en el grosor de la MBG puede ser al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, o al menos aproximadamente 10 veces en comparación con la rata de tipo silvestre (p. ej., a aproximadamente las 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, o aproximadamente 17 semanas de edad). Por ejemplo, el grosor promedio de la MBG en los glomérulos puede ser al menos aproximadamente 0,2, al menos aproximadamente 0,3, al menos aproximadamente 0,4, al menos aproximadamente 0,5, al menos aproximadamente 0,6, al menos aproximadamente 0,7, al menos aproximadamente 0,8, al menos aproximadamente 0,9, al menos aproximadamente 1,0, al menos aproximadamente 1,1, al menos aproximadamente 1,2, al menos aproximadamente 1,3, al menos aproximadamente 1,4, al menos aproximadamente 1,5, al menos aproximadamente 1,6, al menos aproximadamente 1,7, o al menos aproximadamente 1,8 micrómetros de longitud (p. ej., a aproximadamente las 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, o aproximadamente 17 semanas de edad). Por ejemplo, el grosor medio de la MBG en los glomérulos puede estar entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 2,5, entre aproximadamente 0,5 y aproximadamente 2,5, entre aproximadamente 1,0 y aproximadamente 2,5, entre aproximadamente 1,1 y aproximadamente 2,5, entre aproximadamente 1,2 y aproximadamente 2,4, entre aproximadamente 1,3 y aproximadamente 2,3, entre aproximadamente 1,4 y aproximadamente 2,2, entre aproximadamente 1,5 y aproximadamente 2,1, entre aproximadamente 1,6 y aproximadamente 2,0, o entre aproximadamente 1,7 y aproximadamente 1,9 micrómetros de longitud (p. ej., a aproximadamente las 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, o aproximadamente 17 semanas de edad). Por ejemplo, el grosor promedio de la MBG en los glomérulos puede ser de aproximadamente 1,8 micrómetros de longitud (p. ej., a aproximadamente las 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 13 semanas, aproximadamente 14 semanas, aproximadamente 15 semanas, aproximadamente 16 semanas, o aproximadamente 17 semanas de edad).

Como otro ejemplo, el aumento de la anchura del proceso del pie de los podocitos puede ser al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, o al menos aproximadamente 7 veces en comparación con la rata de tipo silvestre (p. ej., a aproximadamente las 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 9 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 11 semanas, aproximadamente 12

semanas, o aproximadamente 17 semanas de edad).

III. Métodos de uso de ratas que comprenden un locus *Cfh* inactivado para evaluar la eficacia de supuestos agentes terapéuticos para la C3G *in vivo* o *ex vivo*

Se proporcionan varios métodos para usar las ratas que comprenden un locus *Cfh* inactivado como se describe en otra parte del presente documento para evaluar la eficacia de presuntos agentes terapéuticos para la glomerulopatía C3 (C3G) *in vivo* o *ex vivo*. Dichos métodos pueden ser métodos para identificar un agente candidato (es decir, un compuesto o molécula terapéutica) o evaluar la eficacia terapéutica *in vivo* de un agente candidato para su uso en el tratamiento de una C3G. Los métodos utilizan cualquiera de las ratas que comprenden un locus *Cfh* divulgado en el presente documento. En dichos métodos, los compuestos candidatos se pueden administrar directamente a ratas que presentan síntomas de C3G para determinar si el agente o compuesto puede reducir uno o más síntomas de C3G.

A. Métodos para probar la eficacia de presuntos agentes terapéuticos para la C3G *in vivo* o *ex vivo*

Se proporcionan varios métodos para evaluar la actividad terapéutica frente a la glomerulopatía C3 (C3G) de un agente o compuesto (p. ej., un supuesto agente terapéutico para la C3G) *in vivo* o *ex vivo*. Dichos métodos pueden comprender administrar el agente o compuesto a una rata que comprende un locus *Cfh* inactivado y evaluar la actividad terapéutica para la C3G del compuesto agente en la rata, o pueden comprender administrar un supuesto agente terapéutico C3 a una rata que comprende un locus *Cfh* inactivado y evaluar la actividad del supuesto agente terapéutico C3 en la rata. Por ejemplo, tales métodos pueden ser para evaluar la eficacia terapéutica *in vivo* de un agente o compuesto para usar en un tratamiento de la glomerulopatía C3 (C3G). Dichos métodos pueden comprender, por ejemplo, administrar el agente o compuesto a una rata que comprende un locus *Cfh* inactivado, y evaluar uno o más síntomas de C3G en la rata modificada genéticamente a la que se le ha administrado el agente o compuesto en comparación con una rata modificada genéticamente de control a la que no se le ha administrado el agente o compuesto.

El agente o compuesto puede ser cualquier agente biológico o químico. Se divulgan ejemplos de supuestos agentes o compuestos terapéuticos para la C3G.

Dichos compuestos o agentes pueden administrarse mediante cualquier método de administración (p. ej., inyección, AAV, LNP o HDD) como se divulga con más detalle en otra parte del presente documento y por cualquier vía de administración. Los medios para suministrar moléculas terapéuticas y las vías de administración se divulgan con más detalle en otra parte del presente documento.

Los métodos para evaluar la actividad de un supuesto agente terapéutico para la C3G o para evaluar la actividad terapéutica para la C3G de un agente o compuesto son bien conocidos y se proporcionan en otra parte del presente documento. Dicha evaluación puede comprender la evaluación de lecturas de actividad de la vía alternativa del complemento (AC) o la evaluación de la función renal. Por ejemplo, tales métodos pueden comprender evaluar cualquier síntoma de C3G, tales como uno o más de los siguientes: (i) niveles circulatorios de proteína C3 (disminuidos en la C3G); (ii) niveles de nitrógeno ureico en sangre (aumentados en la C3G); (iii) niveles de depósito de C3 en los riñones (p. ej., en los glomérulos de los riñones) (aumentados en la C3G); (iv) niveles de depósito de C5b-9 en los riñones (p. ej., en los glomérulos de los riñones) (aumentados en la C3G); y (v) esperanza de vida de la rata (disminuida en la C3G). Como otro ejemplo, dichos métodos pueden comprender evaluar uno o más de los siguientes: (i) niveles circulatorios de proteína C3 (disminuidos en la C3G); (ii) niveles de nitrógeno ureico en sangre (aumentados en la C3G); (iii) niveles de depósito de C3 en los riñones (p. ej., en los glomérulos de los riñones) (aumentados en la C3G); (iv) niveles de depósito de C5b-9 en los riñones (p. ej., en los glomérulos de los riñones) (aumentados en la C3G); (v) niveles de cistatina C en suero (aumentados en enfermedades glomerulares como la C3G); (vi) albúmina urinaria (albuminuria) (aumentada en enfermedades glomerulares como la C3G); (vii) grosor de la membrana basal glomerular (MBG) (aumentado en enfermedades glomerulares como la C3G); (viii) anchura del proceso del pie de los podocitos (aumentada en enfermedades glomerulares como la C3G); (ix) número de procesos del pie de los podocitos (disminuido en enfermedades glomerulares como la C3G); y (x) esperanza de vida de la rata (disminuida en la C3G). También se puede utilizar cualquier otro síntoma asociado con la enfermedad glomerular que se describe en el presente documento. El agente o compuesto puede mejorar o tratar uno o más síntomas de la C3G en comparación con una rata de control a la que no se le ha administrado el agente o compuesto candidato. Los términos "mejorar" o "tratar" significan eliminar, retrasar la aparición o reducir la prevalencia, frecuencia o gravedad de uno o más síntomas asociados con la C3G.

Uno o más síntomas evaluados pueden incluir disminución de los niveles circulatorios de C3. Dichos métodos pueden comprender evaluar los niveles circulatorios de proteína C3 en la rata modificada genéticamente a la que se le administra el agente o compuesto. Se pueden evaluar los niveles circulatorios de C3, por ejemplo, en ratas entre aproximadamente 2 semanas y aproximadamente 17 semanas, entre aproximadamente 2 semanas y aproximadamente 12 semanas, entre aproximadamente 3 semanas y aproximadamente 11 semanas, entre aproximadamente 4 semanas y aproximadamente 10 semanas, entre aproximadamente 5 semanas y aproximadamente 9 semanas, o entre aproximadamente 6 semanas y aproximadamente 8 semanas de edad. En un ejemplo específico, los niveles circulatorios de C3 se pueden evaluar aproximadamente a las 7 semanas de edad.

Como alternativa, los niveles circulatorios de C3 se pueden evaluar entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 17 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 16 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 15 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 14 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 13 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 12 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 11 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 10 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 9 semanas, o entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 8 semanas de edad. Por ejemplo, los niveles circulatorios de proteína C3 en la rata modificada genéticamente a la que se le ha administrado el agente o compuesto se pueden evaluar en comparación con los niveles circulatorios de proteína C3 en una rata modificada genéticamente de control a la que no se le ha administrado el agente o compuesto, en donde el aumento de los niveles circulatorios de proteína C3 en comparación con la rata modificada genéticamente de control indica un efecto terapéutico para el agente o compuesto. Por ejemplo, la mejora de los niveles circulatorios disminuidos de C3 por el agente o compuesto candidato en cualquiera de las ratas que comprenden un locus *Cfh* inactivado como se describe en el presente documento puede ser estadísticamente significativa. Por ejemplo, el agente o compuesto candidato puede mejorar los niveles circulatorios disminuidos de C3 (p. ej., aumentar los niveles circulatorios de C3) en cualquiera de las ratas que comprenden un locus *Cfh* inactivado como se describe en el presente documento en cualquiera de un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, en comparación con las ratas de control a las que no se trata con el compuesto o agente candidato. La evaluación de los niveles circulatorios de C3 se puede lograr utilizando una gran variedad de métodos bien conocidos.

El uno o más síntomas evaluados también pueden incluir el depósito de C3 en el riñón (particularmente en la nefrona (por ejemplo, en el glomérulo)). Dichos métodos pueden comprender evaluar los niveles de depósito de C3 en los riñones (p. ej., en los glomérulos de los riñones) en la rata modificada genéticamente a la que se le administró el agente o compuesto. Se puede evaluar el depósito de C3, por ejemplo, en ratas entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 17 semanas, entre aproximadamente 8 semanas y aproximadamente 17 semanas, o entre aproximadamente 9 semanas y aproximadamente 17 semanas de edad. Como alternativa, los niveles de depósito de C3 en los riñones pueden evaluarse entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 17 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 16 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 15 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 14 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 13 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 12 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 11 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 10 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 9 semanas, o entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 8 semanas de edad. Por ejemplo, los niveles de depósito de C3 en la rata modificada genéticamente a la que se le ha administrado el agente o compuesto se pueden evaluar en comparación con los niveles de depósito de C3 en una rata modificada genéticamente de control a la que no se le ha administrado el agente o compuesto, en donde los niveles disminuidos de depósito de C3 en comparación con a la rata modificada genéticamente de control indican un efecto terapéutico para el agente o compuesto. Por ejemplo, la mejora del depósito de C3 en el riñón por el agente o compuesto candidato en cualquiera de las ratas que comprende un locus *Cfh* inactivado como se describe en el presente documento puede ser estadísticamente significativa. Por ejemplo, el agente o compuesto candidato puede mejorar el depósito de C3 en el riñón (p. ej., disminuir el depósito de C3 en el riñón) en cualquiera de las ratas que comprenden un locus *Cfh* inactivado como se describe en el presente documento en cualquiera de un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, en comparación con las ratas de control a las que no se trata con el compuesto o agente candidato. La determinación del depósito de proteína C3 en el riñón se puede analizar mediante una gran variedad de medios conocidos, que incluye, pero sin limitación, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y microscopía electrónica (incluida la microscopía inmunoelectrónica).

El uno o más síntomas evaluados también pueden incluir el depósito del complejo de ataque a la membrana C5b-9 en el riñón (p. ej., en el glomérulo)). Dichos métodos pueden comprender evaluar los niveles de depósito de C5b-9 en los riñones (p. ej., en los glomérulos de los riñones) en la rata modificada genéticamente a la que se le administró el agente o compuesto. Se puede evaluar el depósito de C5b-9, por ejemplo, en ratas entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 17 semanas, entre aproximadamente 8 semanas y aproximadamente 17 semanas, o entre aproximadamente 9 semanas y aproximadamente 17 semanas de edad. Como alternativa, los niveles de depósito de C5b-9 en los riñones pueden evaluarse entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 17 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 16 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 15 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 14 semanas, entre

aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 13 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 12 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 11 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 10 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 9 semanas, o entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 8 semanas de edad. Por ejemplo, los niveles de depósito de C5b-9 en la rata modificada genéticamente a la que se le ha administrado el agente o compuesto se pueden evaluar en comparación con los niveles de depósito de C5b-9 en una rata modificada genéticamente de control a la que no se le ha administrado el agente o compuesto, en donde los niveles disminuidos de depósito de C5b-9 en comparación con la rata modificada genéticamente de control indican un efecto terapéutico para el agente o compuesto. Por ejemplo, la mejora de la formación y depósito del complejo de ataque a la membrana C5b-9 en el riñón por el agente o compuesto candidato en cualquiera de las ratas que comprende un locus *Cfh* inactivado como se describe en el presente documento en una cantidad estadísticamente significativa. Por ejemplo, el agente o compuesto candidato puede mejorar la formación y depósito del complejo de ataque a la membrana C5b-9 en el riñón (p. ej., disminuir los niveles de depósito de C5b-9) en cualquiera de las ratas que comprenden un locus *Cfh* inactivado como se describe en el presente documento en cualquiera de un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, en comparación con las ratas de control a las que no se trata con el compuesto o agente candidato. La determinación de la formación y depósito del complejo de ataque a la membrana C5b-9 en el riñón se puede analizar mediante una gran variedad de métodos bien conocidos, que incluye, pero sin limitación, inmunohistoquímica, inmunofluorescencia (como un anticuerpo anti-C9 marcado inmunofluorescentemente) y microscopía electrónica (incluida la microscopía inmunoelectrónica).

El uno o más síntomas evaluados también pueden incluir niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN) en el suero. Dichos métodos pueden comprender evaluar los niveles de nitrógeno ureico en sangre en la rata modificada genéticamente a la que se le administra el agente o compuesto. Se pueden evaluar los niveles de nitrógeno ureico en sangre, por ejemplo, en ratas entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 17 semanas, entre aproximadamente 8 semanas y aproximadamente 17 semanas, o entre aproximadamente 9 semanas y aproximadamente 17 semanas de edad. Como alternativa, los niveles de nitrógeno ureico en sangre se pueden evaluar entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 17 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 16 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 15 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 14 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 13 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 12 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 11 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 10 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 9 semanas, o entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 8 semanas de edad. Por ejemplo, los niveles de nitrógeno ureico en sangre en la rata modificada genéticamente a la que se le ha administrado el agente o compuesto se pueden evaluar en comparación con los niveles de nitrógeno ureico en sangre en una rata modificada genéticamente de control a la que no se le ha administrado el agente o compuesto, en donde los niveles disminuidos de nitrógeno ureico en sangre en comparación con la rata modificada genéticamente de control indican un efecto terapéutico para el agente o compuesto. Por ejemplo, la mejora de los niveles elevados de nitrógeno ureico en plasma o suero por el agente o compuesto candidato en cualquiera de las ratas que comprenden un locus *Cfh* inactivado como se describe en el presente documento puede ser estadísticamente significativa. Por ejemplo, el agente o compuesto candidato puede mejorar los niveles elevados de nitrógeno ureico en plasma o suero (p. ej., disminuir los niveles de nitrógeno ureico en plasma o suero) en cualquiera de las ratas que comprenden un locus *Cfh* como se describe en el presente documento en cualquiera de un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, en comparación con las ratas de control a las que no se trata con el compuesto o agente candidato. La evaluación de los niveles de BUN en suero y/o plasma se puede realizar utilizando una gran variedad de métodos bien conocidos.

El uno o más síntomas evaluados también pueden incluir niveles de cistatina C en suero en el suero. Dichos métodos pueden comprender evaluar los niveles de cistatina C en suero en la rata modificada genéticamente a la que se le administra el agente o compuesto. Se pueden evaluar los niveles de cistatina C en suero, por ejemplo, en ratas entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 17 semanas, entre aproximadamente 8 semanas y aproximadamente 17 semanas, o entre aproximadamente 9 semanas y aproximadamente 17 semanas de edad. Como alternativa, los niveles de cistatina C en suero se pueden evaluar entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 17 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 16 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 15 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 14 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 13 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 12 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y

aproximadamente 11 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 10 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 9 semanas, o entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 8 semanas de edad. Por ejemplo, los niveles de cistatina C en suero en la rata modificada genéticamente a la que se le ha administrado el agente o compuesto se pueden evaluar en comparación con los niveles de cistatina C en suero en una rata modificada genéticamente de control a la que no se le ha administrado el agente o compuesto, en donde los niveles disminuidos de cistatina C en suero en comparación con la rata modificada genéticamente de control indican un efecto terapéutico para el agente o compuesto. Por ejemplo, la mejora de los niveles elevados de cistatina C en plasma o suero por el agente o compuesto candidato en cualquiera de las ratas que comprenden un locus *Cfh* inactivado como se describe en el presente documento puede ser estadísticamente significativa. Por ejemplo, el agente o compuesto candidato puede mejorar los niveles elevados de cistatina C en plasma o suero (p. ej., disminuir los niveles de cistatina C en plasma o suero) en cualquiera de las ratas que comprenden un locus *Cfh* inactivado como se describe en el presente documento en cualquiera de un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, en comparación con las ratas de control a las que no se trata con el compuesto o agente candidato. La evaluación de los niveles séricos y/o plasmáticos de cistatina C en suero se puede realizar utilizando una gran variedad de métodos bien conocidos.

El uno o más síntomas evaluados también pueden incluir niveles de albúmina urinaria (albuminuria). Dichos métodos pueden comprender evaluar los niveles de albúmina urinaria en la rata modificada genéticamente a la que se le administra el agente o compuesto. Se pueden evaluar los niveles de albúmina urinaria, por ejemplo, en ratas entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 17 semanas, entre aproximadamente 8 semanas y aproximadamente 17 semanas, o entre aproximadamente 9 semanas y aproximadamente 17 semanas de edad. Como alternativa, los niveles de albúmina urinaria se pueden evaluar entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 17 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 16 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 15 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 14 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 13 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 12 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 11 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 10 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 9 semanas, o entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 8 semanas de edad. Por ejemplo, los niveles de albúmina urinaria en la rata modificada genéticamente a la que se le ha administrado el agente o compuesto se pueden evaluar en comparación con los niveles de albúmina urinaria en una rata modificada genéticamente de control a la que no se le ha administrado el agente o compuesto, en donde los niveles disminuidos de albúmina urinaria en comparación con la rata modificada genéticamente de control indican un efecto terapéutico para el agente o compuesto. Por ejemplo, la mejora de los niveles elevados de albúmina urinaria por el agente o compuesto candidato en cualquiera de las ratas que comprenden un locus *Cfh* inactivado como se describe en el presente documento puede ser estadísticamente significativa. Por ejemplo, el agente o compuesto candidato puede mejorar los niveles elevados de albúmina urinaria (p. ej., disminuir los niveles de albúmina urinaria) en cualquiera de las ratas que comprenden un locus *Cfh* inactivado como se describe en el presente documento en cualquiera de un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, en comparación con las ratas de control a las que no se trata con el compuesto o agente candidato. La evaluación de los niveles de albúmina urinaria se puede realizar utilizando una gran variedad de métodos bien conocidos y se puede cuantificar, por ejemplo, por día o normalizado a la creatinina urinaria.

Uno o más síntomas evaluados también pueden incluir patología glomerular, tal como el grosor de la membrana basal glomerular (MBG), anchura de los procesos del pie de los podocitos y el número de procesos del pie de los podocitos. Dichos métodos pueden comprender evaluar la patología glomerular en la rata modificada genéticamente a la que se le administra el agente o compuesto. Se puede evaluar la patología glomerular, por ejemplo, en ratas entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 17 semanas, entre aproximadamente 8 semanas y aproximadamente 17 semanas, o entre aproximadamente 9 semanas y aproximadamente 17 semanas de edad. Como alternativa, la patología glomerular se puede evaluar entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 17 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 16 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 15 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 14 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 13 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 12 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 11 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 10 semanas, entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 9 semanas, o entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 8 semanas de edad. Por ejemplo, la patología glomerular en la rata modificada genéticamente a la que se le ha administrado el agente o

compuesto puede evaluarse en comparación con la patología glomerular en una rata modificada genéticamente de control a la que no se le ha administrado el agente o compuesto, en la disminución del grosor de la MBG, la disminución de la anchura del proceso del pie de los podocitos o el aumento del número de procesos del pie de los podocitos (p. ej., el aumento del número de pies de los podocitos/longitud en micrómetros) en comparación con la rata modificada genéticamente de control indica un efecto terapéutico para el agente o compuesto. Por ejemplo, la mejora del aumento del grosor de la MBG, el aumento de la anchura del proceso del pie de los podocitos, o la disminución del número de procesos del pie de los podocitos por el agente o compuesto candidato en cualquiera de las ratas que comprenden un locus *Cfh* inactivado como se describe en el presente documento puede ser estadísticamente significativo. Por ejemplo, el agente o compuesto candidato puede mejorar el aumento del grosor de la MBG, el aumento de la anchura del proceso del pie de los podocitos o la disminución del número de procesos del pie de los podocitos (p. ej., la disminución del grosor de la MBG, la disminución de la anchura del proceso del pie de los podocitos o el aumento del número de procesos del pie de los podocitos) en cualquiera de las ratas que comprenden un locus *Cfh* inactivado como se describe en el presente documento en cualquiera de un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, en comparación con las ratas de control a las que no se trata con el compuesto o agente candidato. La evaluación de la patología glomerular se puede lograr utilizando una gran variedad de métodos bien conocidos, incluidos los descritos en el presente documento.

El uno o más síntomas evaluados también pueden incluir la muerte espontánea (es decir, la esperanza de vida). Dichos métodos pueden comprender evaluar la esperanza de vida de la rata modificada genéticamente a la que se le administra el agente o compuesto. Por ejemplo, la esperanza de vida de la rata modificada genéticamente a la que se le ha administrado el agente o compuesto puede evaluarse en comparación con la esperanza de vida de una rata modificada genéticamente de control a la que no se le ha administrado el agente o compuesto, en donde una mayor esperanza de vida en comparación con la rata modificada genéticamente de control indica un efecto terapéutico para el agente o compuesto. Por ejemplo, la mejora de la aparición de muerte espontánea por el agente o compuesto candidato en cualquiera de las ratas que comprenden un locus *Cfh* inactivado como se describe en el presente documento puede ser estadísticamente significativa. Por ejemplo, el agente o compuesto candidato puede mejorar la aparición de muerte espontánea (p. ej., aumentar la esperanza de vida) en cualquiera de las ratas que comprenden un locus *Cfh* inactivado como se describe en el presente documento en cualquiera de un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 %, 61 %, 62 %, 63 %, 64 %, 65 %, 66 %, 67 %, 68 %, 69 %, 70 %, 71 %, 72 %, 73 %, 74 %, 75 %, 76 %, 77 %, 78 %, 79 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %, en comparación con las ratas de control a las que no se trata con el compuesto o agente candidato.

La rata modificada genéticamente de control en los ejemplos anteriores puede ser una rata por lo demás idéntica a la que está siendo tratada con el agente o compuesto, excepto que no está siendo tratada con el agente o compuesto. Por ejemplo, la rata de control puede tener el mismo locus *Cfh* inactivado, puede ser de la misma cepa que la rata que está siendo tratada, puede ser del mismo sexo que la rata que está siendo tratada y/o puede tener la misma edad que la rata que está siendo tratada. La rata de control puede, por ejemplo, no tratarse o tratarse con una sustancia de control (p. ej., placebo) sin efecto terapéutico.

Los diversos métodos proporcionados anteriormente para evaluar la actividad *in vivo* también se pueden utilizar para evaluar la actividad de supuestos agentes terapéuticos para la C3G o evaluar la actividad terapéutica para la C3G de compuestos *ex-vivo* como se describe en otra parte del presente documento.

B. Agentes terapéuticos candidatos para la C3G

Cualquier compuesto o agente terapéutico candidato para la glomerulopatía C3 (C3G) se puede probar en las células de rata y en las ratas divulgadas en el presente documento. Dichos supuestos agentes terapéuticos pueden ser cualquier agente diseñado o adaptado para prevenir o aliviar uno o más síntomas asociados con la C3G como se describe en otra parte del presente documento. Dichos supuestos agentes terapéuticos pueden ser moléculas pequeñas o pueden ser productos biológicos tales como anticuerpos, proteínas de unión a antígenos, o ácidos nucleicos o proteínas. Los agentes o compuestos terapéuticos candidatos pueden ser, por ejemplo, compuestos químicos de molécula pequeña, anticuerpos, proteínas, ácidos nucleicos inhibidores o cualquier combinación de los mismos.

Como ejemplo, se pueden diseñar supuestos agentes terapéuticos C3G para que sean inhibidores del complemento. Ejemplos de inhibidores del complemento incluyen eculizumab (un anticuerpo monoclonal humanizado anti-complemento C5 aprobado para una enfermedad renal mediada por el complemento diferente (síndrome urémico

hemolítico atípico, aHUS); bloquea la escisión de C5, impidiendo de este modo tanto la formación de C5b-9 como la producción de la anafilatoxina C5A), el receptor soluble del complemento 1 (CR1), los inhibidores de C3 tales como Cp40 (un inhibidor peptídico de C3), los inhibidores de C5 tales como los agentes ARNip contra C5, los inhibidores de FB y FD y los bloqueadores del receptor C5a. Véase, p. ej., Nester and Smith (2016) *Seminars in Immunology* 28:241-249.

Como otro ejemplo, los supuestos agentes terapéuticos para la C3G pueden ser agentes diseñados para retardar el proceso de daño renal causado por la C3G. Dichos agentes podrían incluir, por ejemplo, corticosteroides (usados, por ejemplo, para calmar el sistema inmunitario del sujeto, al que pertenece el sistema del complemento y evitar que ataque los glomérulos), medicamentos inmunosupresores (utilizados, por ejemplo, para inhibir la función del sistema inmunitario del sujeto, que contribuye al daño renal en la C3G), los inhibidores de la ECA y BRA (medicamentos para la presión arterial utilizados, por ejemplo, para reducir la pérdida de proteínas y controlar la presión arterial), cambios en la dieta (por ejemplo, reducir la sal (sodio) y las proteínas para aligerar la carga de desechos en los riñones) e inhibidores del complemento.

La actividad de cualquier otro agente terapéutico para la C3G conocido o supuesto también se puede evaluar utilizando las ratas descritas en el presente documento. Análogamente, se puede seleccionar cualquier otra molécula para determinar la actividad terapéutica para la C3G utilizando las ratas divulgadas en el presente documento.

C. Administración de supuestos agentes terapéuticos para la C3G a ratas o células de rata

Los métodos divulgados en el presente documento pueden comprender introducir en una rata o en una célula de rata diversos agentes o compuestos (p. ej., supuestos agentes terapéuticos para la C3G, tales como anticuerpos o moléculas pequeñas), incluidos ácidos nucleicos, proteínas, complejos de ácido nucleico y proteína, peptidomiméticos, proteínas de unión a antígeno o moléculas pequeñas. "Introducir" incluye presentar a la célula de rata o a la rata la molécula (p. ej., ácido nucleico o proteína o molécula pequeña) de tal manera que obtenga acceso al interior de la célula de rata o al interior de las células dentro de la rata. La introducción se puede realizar por cualquier medio. Si se introducen múltiples componentes, se pueden introducir simultánea o secuencialmente en cualquier combinación. Adicionalmente, dos o más de los componentes pueden introducirse en la célula de rata o en la rata mediante el mismo método de suministro o mediante métodos de suministro diferentes. Análogamente, dos o más de los componentes pueden introducirse en una rata mediante la misma vía de administración o diferentes vías de administración.

Los agentes o compuestos introducidos en la rata o en la célula de rata se pueden proporcionar en composiciones que comprenden un vehículo que aumenta la estabilidad de las moléculas introducidas (p. ej., que prolonga el período en determinadas condiciones de almacenamiento (p. ej., -20 °C, 4 °C o temperatura ambiente) para las cuales los productos de degradación permanecen por debajo de un umbral, tal como por debajo del 0,5 % en peso del ácido nucleico o proteína de partida; o que aumenta la estabilidad *in vivo*). Los ejemplos no limitantes de tales vehículos incluyen microesferas de poli(ácido láctico) (PLA), microesferas de poli(ácido D,L-láctico-coglicólico) (PLGA), liposomas, micelas, micelas inversas, cocleatos lipídicos y microtúbulos lipídicos.

En el presente documento se proporcionan diversos métodos y composiciones para permitir la introducción de un supuesto agente o compuesto terapéutico C3G en una célula de rata o en una rata. Se conocen métodos para introducir agentes en diversos tipos de células e incluyen, por ejemplo, métodos de transfección estable, métodos de transfección transitoria y métodos mediados por virus.

Los protocolos de transfección, así como los protocolos para introducir agentes en las células pueden variar. Los métodos de transfección no limitativos incluyen métodos de transfección basados en química que utilizan liposomas; nanopartículas; fosfato cálcico (Graham *et al.* (1973) *Virology* 52(2):456-467, Bacchetti *et al.* (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74(4):1590-1594, y Kriegler, M (1991). *Transfer and Expression: A Laboratory Manual*. Nueva York: W. H. Freeman and Company. págs. 96-97); dendrímeros; o polímeros catiónicos tales como DEAE dextrano o polietilenimina. Los métodos no químicos incluyen electroporación, sonoporación y transfección óptica. La transfección basada en partículas incluye el uso de una pistola génica o transfección asistida por imán (Bertram (2006) *Curr. Pharm. Biotechnol.* 7(4):277-285). También se pueden usar métodos virales para la transfección.

La introducción de supuestos agentes o compuestos terapéuticos para la C3G en una célula también puede estar mediada por electroporación, por inyección intracitoplasmática, por infección vírica, por adenovirus, por virus adenoasociado, por lentivirus, por retrovirus, por transfección, por transfección mediada por lípidos o por nucleofección. La nucleofección es una tecnología de electroporación mejorada que permite que los sustratos de ácidos nucleicos se suministren no solo al citoplasma sino también a través de la membrana nuclear y al núcleo. Adicionalmente, el uso de nucleofección en los métodos descritos en el presente documento normalmente requiere muchas menos células que la electroporación regular (p. ej., solo aproximadamente 2 millones en comparación con 7 millones por electroporación regular). En un ejemplo, la nucleofección se realiza utilizando el sistema LONZA® NUCLEOFECTOR™.

La introducción de supuestos agentes o compuestos terapéuticos para la C3G en una célula (p. ej., un cigoto) también se puede lograr mediante microinyección. En cigotos (es decir, embriones en fase unicelular), la microinyección puede

realizarse en el pronúcleo materno y/o paterno o en el citoplasma. Los métodos para llevar a cabo la microinyección son bien conocidos. Véase, p. ej., Nagy *et al.* (Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R., 2003, *Manipulating the Mouse Embryo*. Cold Spring Harbor, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press); véase *también* Meyer *et al.* (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:15022-15026 y Meyer *et al.* (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:9354-9359.

Otros métodos para introducir supuestos agentes o compuestos terapéuticos para la C3G en una célula de rata o en una rata pueden incluir, por ejemplo, liberación por vectores, suministro mediado por partículas, suministro mediado por exosomas, suministro mediado por nanopartículas lipídicas, suministro mediado por péptidos que penetran en las células o suministro mediado por dispositivo implantable. Como ejemplos específicos, se puede introducir un ácido nucleico o una proteína en una célula de rata o en una rata en un vehículo tal como una microesfera de poli(ácido láctico) (PLA), una microesfera de poli(ácido D,L-láctico-co-glucólico) (PLGA), un liposoma, una micela, una micela inversa, un coqueato lipídico o un microtúbulo lipídico. Algunos ejemplos específicos de suministro a una rata incluyen suministro hidrodinámico, suministro mediado por virus (p. ej., suministro mediado por virus adenoasociados (AAV)) y suministro mediado por nanopartículas lipídicas.

La introducción de supuestos agentes o compuestos terapéuticos para la C3G en células de rata o en ratas se puede lograr mediante suministro hidrodinámico (HDD). El suministro hidrodinámico ha surgido como un método para el suministro de ADN intracelular *in vivo*. Para el suministro de genes a las células parenquimatosas, solo es necesario inyectar secuencias de ADN esenciales a través de un vaso sanguíneo seleccionado, eliminando los problemas de seguridad asociados con los vectores víricos y sintéticos actuales. Cuando se inyecta en el torrente sanguíneo, el ADN es capaz de llegar a las células de los diferentes tejidos accesibles a la sangre. El suministro hidrodinámico emplea la fuerza generada por la inyección rápida de un gran volumen de solución en la sangre incompresible en la circulación para superar las barreras físicas del endotelio y las membranas celulares que impiden que compuestos grandes e impermeables a la membrana entren en las células parenquimatosas. Además del suministro de ADN, este método es útil para el suministro intracelular eficaz de ARN, proteínas y otros compuestos pequeños *in vivo*. Véase, p. ej., Bonamassa *et al.* (2011) *Pharm. Res.* 28(4):694-701.

La introducción de supuestos agentes o compuestos terapéuticos para la C3G también se puede lograr mediante suministro mediado por virus, tal como el suministro mediado por AAV o el suministro mediado por lentivirus. Otros virus/vectores víricos ilustrativos incluyen retrovirus, adenovirus, virus vaccinia, poxvirus y virus del herpes simple. Los virus pueden infectar células en división, células que no están en división o tanto células en división como células que no están en división. Los virus pueden integrarse en el genoma del hospedador o, como alternativa, no integrarse en el genoma del hospedador. Estos virus también pueden diseñarse por ingeniería genética para que tengan una inmunidad reducida. Los virus pueden ser competentes en replicación o pueden tener replicación defectuosa (p. ej., defectuosa en uno o más genes necesarios para rondas adicionales de replicación y/o empaquetamiento del virión). Los virus pueden causar expresión transitoria, expresión duradera (p. ej., al menos 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 2 meses o 3 meses) o expresión permanente. Títulos víricos ilustrativos (p. ej., títulos de AAV) incluyen 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 10^{15} , y 10^{16} genomas vectoriales/ml.

La introducción de supuestos agentes o compuestos terapéuticos para la C3G también se puede lograr mediante suministro mediado por nanopartículas lipídicas (LNP). Las formulaciones de lípidos pueden proteger las moléculas biológicas de la degradación y al mismo tiempo mejorar su captación celular. Las nanopartículas lipídicas son partículas que comprenden una pluralidad de moléculas lipídicas asociadas físicamente entre sí mediante fuerzas intermoleculares. Estas incluyen microesferas (incluidas vesículas unilaminares y multilaminares, p. ej., liposomas), una fase dispersa en una emulsión, micelas o una fase interna en una suspensión.

La administración *in vivo* puede ser por cualquier vía adecuada, incluyendo, por ejemplo, parenteral, intravenosa, oral, subcutánea, intraarterial, intracraneal, intratecal, intraperitoneal, tópica, intranasal o intramuscular. Los modos sistémicos de administración incluyen, por ejemplo, las vías oral y parenteral. Los ejemplos de vías parenterales incluyen las vías intravenosa, intraarterial, intraósea, intramuscular, intradérmica, subcutánea, intranasal e intraperitoneal. Un ejemplo específico es la infusión intravenosa. La instilación nasal y la inyección intravítrea son otros ejemplos específicos. Los modos locales de administración incluyen, por ejemplo, las vías intratecal, intracerebroventricular, intraparenquimatosa (p. ej., suministro intraparenquimatoso localizado en el cuerpo estriado (p. ej., en el núcleo caudado o en el putamen), córtex cerebral, circunvolución precentral, hipocampo (p. ej., en la circunvolución dentada o región CA3), corteza temporal, amígdala, corteza frontal, tálamo, cerebelo, médula, hipotálamo, techo, tegmento o sustancia negra), intraocular, intraorbital, subconjuntival, intravítrea, subretiniana y transescleral. Cantidades significativamente menores de los componentes (en comparación con los enfoques sistémicos) pueden ejercer un efecto cuando se administran localmente (por ejemplo, por vía intraparenquimatosa o intravítrea) en comparación con cuando se administra por vía sistémica (por ejemplo, por vía intravenosa). Los modos de administración locales también pueden reducir o eliminar la incidencia de efectos secundarios potencialmente tóxicos que pueden ocurrir cuando se administran sistémicamente cantidades terapéuticamente eficaces de un componente. En un ejemplo particular, la vía de administración es subcutánea o intravenosa.

Las composiciones que comprenden supuestos agentes o compuestos terapéuticos para la C3G se pueden formular usando uno o más vehículos, excipientes o auxiliares fisiológica y farmacéuticamente aceptables. La formulación

puede depender de la vía de administración elegida. La expresión "farmacéuticamente aceptable" significa que el vehículo, diluyente, excipiente o auxiliar es compatible con los demás ingredientes de la formulación y no sustancialmente perjudicial para el receptor.

- 5 La frecuencia de administración y el número de dosis pueden depender de la vida media de los supuestos agentes o compuestos terapéuticos para la C3G y de la vía de administración, entre otros factores. La introducción de supuestos agentes o compuestos terapéuticos para la C3G en la célula de rata o en la rata se puede realizar una o varias veces durante un período de tiempo. Por ejemplo, la introducción se puede realizar al menos dos veces durante un período de tiempo, al menos tres veces durante un período de tiempo, al menos cuatro veces durante un período de tiempo, al menos cinco veces durante un período de tiempo, al menos seis veces durante un período de tiempo, al menos siete veces durante un período de tiempo, al menos ocho veces durante un período de tiempo, al menos nueve veces durante un período de tiempo, al menos diez veces durante un período de tiempo, al menos once veces, al menos doce veces durante un período de tiempo, al menos trece veces durante un período de tiempo, al menos catorce veces durante un período de tiempo, al menos quince veces durante un período de tiempo, al menos dieciséis veces durante un período de tiempo, al menos diecisiete veces durante un período de tiempo, al menos dieciocho veces durante un período de tiempo, al menos diecinueve veces durante un período de tiempo o al menos veinte veces durante un período de tiempo.

20 **IV. Métodos para producir ratas que comprenden un locus *Cfh* inactivado**

Se proporcionan varios métodos para producir una rata que comprende un locus *Cfh* inactivado como se divulga en otra parte del presente documento. Del mismo modo, se proporcionan varios métodos para producir un gen o locus *Cfh* de rata inactivado o para producir un genoma de rata o una célula de rata que comprende un locus *Cfh* inactivado como se divulga en otra parte del presente documento. Cualquier método o protocolo conveniente para producir un organismo modificado genéticamente es adecuado para producir dicha rata modificada genéticamente. Véase, p. ej., Cho et al. (2009) *Current Protocols in Cell Biology* 42:19.11:19.11.1-19.11.22 y Gama Sosa et al. (2010) *Brain Struct. Funct.* 214(2-3):91-109. Se pueden generar ratas modificadas genéticamente, por ejemplo, mediante la inactivación de genes en un locus *Cfh* dirigido.

30 Por ejemplo, el método para producir una rata que comprende un locus *Cfh* inactivado puede comprender: (1) modificar el genoma de una célula pluripotente para que comprenda el locus *Cfh* inactivado; (2) identificar o seleccionar la célula pluripotente modificada genéticamente que comprende el locus *Cfh* inactivado; (3) introducir la célula pluripotente modificada genéticamente en un embrión hospedador de rata; y (4) implantar y gestar el embrión hospedador en una madre subrogada. Como alternativa, el método para producir una rata que comprende un locus *Cfh* inactivado puede comprender: (1) modificar el genoma de una célula pluripotente para que comprenda el locus *Cfh* inactivado; (2) identificar o seleccionar la célula pluripotente modificada genéticamente que comprende el locus *Cfh* inactivado; (3) introducir la célula pluripotente modificada genéticamente en un embrión hospedador de rata; y (4) gestar el embrión hospedador en una madre subrogada. Opcionalmente, el embrión hospedador comprende una célula pluripotente modificada (p. ej., una célula ES de rata) se puede incubar hasta la etapa de blastocisto antes de implantarse y gestarse en la madre subrogada para producir una rata F0. La madre subrogada puede entonces producir una rata de generación F0 que comprende el locus *Cfh* inactivado.

Los métodos pueden comprender además identificar una célula o animal que tenga un locus genómico diana modificado. Se pueden usar diversos métodos para identificar células y animales que tienen una modificación genética dirigida.

La etapa de cribado puede comprender, por ejemplo, un ensayo cuantitativo para evaluar la modificación del alelo (MOA) de un cromosoma progenitor. Por ejemplo, el ensayo cuantitativo puede llevarse a cabo por una PCR cuantitativa, tal como una PCR a tiempo real (qPCR). La PCR a tiempo real puede utilizar un primer conjunto cebador que reconoce el locus diana y un segundo conjunto cebador que reconoce un locus de referencia no dirigido. El conjunto cebador puede comprender una sonda fluorescente que reconoce la secuencia amplificada. El ensayo de pérdida de alelo (LOA) invierte la lógica de detección convencional y cuantifica el número de copias del locus nativo al que se dirigió la mutación. En un clon celular dirigido correctamente, el ensayo de LOA detecta uno de los dos alelos nativos (para genes que no están en el cromosoma X o Y), alterándose el otro alelo por la modificación diana. Por ejemplo, TAQMAN® se puede utilizar para cuantificar el número de copias de una plantilla de ADN en una muestra de ADN genómico, especialmente en comparación con un gen de referencia (véase, p. ej., el documento US 6.596.541). El gen de referencia se cuantifica en el mismo ADN genómico que el gen(es) o locus(oci) diana. Por consiguiente, se realizan dos amplificaciones TAQMAN® (cada una con su respectiva sonda). Una sonda TAQMAN® determina el "Ct" (ciclo umbral) del gen de referencia, mientras que la otra sonda determina el Ct de la región del gen(es) o locus(oci) dirigida que se reemplaza con un direccionamiento exitoso (es decir, un ensayo LOA). El Ct es una cantidad que refleja la cantidad de ADN de partida para cada una de las sondas TAQMAN®, es decir, una secuencia menos abundante requiere más ciclos de PCR para alcanzar el ciclo umbral. Disminuir a la mitad el número de copias de la secuencia plantilla para una reacción TAQMAN® dará como resultado un aumento de aproximadamente una unidad Ct. Las reacciones TAQMAN® en células donde un alelo del gen(es) o locus(oci) diana ha sido reemplazado por recombinación homóloga darán como resultado un aumento de un Ct para la reacción TAQMAN® diana sin un aumento en el Ct para el gen de referencia en comparación con el ADN de células no dirigidas.

Otros ejemplos de ensayos cuantitativos adecuados incluyen hibridación *in situ* mediada por fluorescencia (FISH), hibridación genómica comparativa, amplificación isotérmica del ADN, hibridación cuantitativa con una o más sondas inmovilizadas, sondas INVADER[®], balizas moleculares TAQMAN[®] o la tecnología de sondas ECLIPSE[™] (véase, p. ej., el documento US 2005/0144655. También se puede utilizar para el cribado la secuenciación de última generación (NGS). La secuenciación de última generación también puede denominarse "NGS" o "secuenciación masiva en paralelo" o "secuenciación de alto rendimiento". En los métodos desvelados en el presente documento, no es necesario buscar células dirigidas utilizando marcadores de selección. Por ejemplo, se puede basar en los ensayos MOA (p. ej., LOA) y NGS descritos en el presente documento sin utilizar casetes de selección.

Un ejemplo de una célula pluripotente adecuada es una célula madre embrionaria (ES) de rata. La célula pluripotente modificada se puede generar, por ejemplo, mediante recombinación por (a) introducción en la célula de uno o más vectores de direccionamiento o ácidos nucleicos donantes exógenos que comprenden brazos de homología 5' y 3' correspondientes a secuencias diana 5' y 3' en el locus *Cfh* endógeno, en donde el ácido nucleico donante exógeno o vector de direccionamiento está diseñado para mutar o eliminar el codón de inicio del locus *Cfh* endógeno o eliminar toda o una parte de la secuencia codificante en el locus *Cfh* endógeno (incluido opcionalmente el codón de inicio). Del mismo modo, se puede generar un embrión de rata en fase unicelular modificado, por ejemplo, mediante recombinación por (a) introducción en el embrión en fase unicelular de uno o más vectores de direccionamiento o ácidos nucleicos de donantes exógenos que comprenden brazos de homología 5' y 3' correspondientes a secuencias diana 5' y 3' en el locus *Cfh* endógeno, en donde el ácido nucleico donante exógeno o vector de direccionamiento está diseñado para mutar o eliminar el codón de inicio del locus *Cfh* endógeno o eliminar toda o una parte de la secuencia codificante en el locus *Cfh* endógeno (incluido opcionalmente el codón de inicio). Del mismo modo, se puede generar un genoma de rata modificado o un gen o locus *Cfh* de rata inactivado, por ejemplo, mediante recombinación por (a) contacto con el genoma de la rata o el gen o locus *Cfh* de rata con más vectores de direccionamiento o ácidos nucleicos de donantes exógenos que comprenden brazos de homología 5' y 3' correspondientes a secuencias diana 5' y 3' en el locus *Cfh* endógeno, en donde el ácido nucleico donante exógeno o vector de direccionamiento está diseñado para mutar o eliminar el codón de inicio del locus *Cfh* endógeno o eliminar toda o una parte de la secuencia codificante en el locus *Cfh* endógeno (incluido opcionalmente el codón de inicio). Opcionalmente, los brazos de homología 5' y 3' pueden flanquear un ácido nucleico insertado que comprende, por ejemplo, un gen indicador o marcador de selección, y la identificación puede comprender identificar al menos una célula que comprende en su genoma el ácido nucleico insertado integrado en el locus genómico diana. Como alternativa, la célula pluripotente modificada puede generarse por (a) introducción en la célula de: (i) uno o más agentes nucleasa, en donde los agentes nucleasa inducen mellas o roturas bicatenarias en secuencias diana dentro del locus genómico diana; y (b) identificar al menos una célula que comprende una modificación (p. ej., delección de un ácido nucleico diana) en el locus genómico diana. Del mismo modo, se puede generar un embrión de rata en fase unicelular modificado por (a) introducción en el embrión de rata en fase unicelular de: (i) uno o más agentes nucleasa, en donde los agentes nucleasa inducen mellas o roturas bicatenarias en secuencias diana dentro del locus genómico diana; y (b) identificar al menos una célula que comprende una modificación (p. ej., delección de un ácido nucleico diana) en el locus genómico diana. Del mismo modo, se puede generar un genoma de rata modificado o un gen o locus *Cfh* de rata inactivado, por ejemplo, poniendo en contacto el genoma de la rata o el gen o locus *Cfh* de rata con uno o más agentes nucleasa, en donde los agentes nucleasa inducen mellas o roturas de doble hebra en secuencias diana dentro del locus genómico diana en el gen o locus *Cfh* de rata. Como alternativa, la célula pluripotente modificada puede generarse por (a) introducción en la célula de: (i) uno o más agentes nucleasa, en donde los agentes nucleasa inducen mellas o roturas bicatenarias en secuencias diana dentro del locus genómico diana; y (ii) uno o más vectores de direccionamiento o ácidos nucleicos de donante exógeno que comprenden brazos de homología 5' y 3' correspondientes a secuencias diana 5' y 3' ubicadas en suficiente proximidad a las secuencias diana de nucleasa; y (c) identificar al menos una célula que comprende la modificación deseada en el locus genómico diana. Del mismo modo, se puede generar un embrión de rata en fase unicelular modificado por (a) introducción en el embrión de rata en fase unicelular de: (i) uno o más agentes nucleasa, en donde los agentes nucleasa inducen mellas o roturas bicatenarias en secuencias diana dentro del locus genómico diana; y (ii) uno o más vectores de direccionamiento o ácidos nucleicos de donante exógeno que comprenden brazos de homología 5' y 3' correspondientes a secuencias diana 5' y 3' ubicadas en suficiente proximidad a las secuencias diana de nucleasa; y (c) identificar al menos una célula que comprende la modificación deseada en el locus genómico diana. Del mismo modo, se puede generar un genoma de rata modificado o un gen o locus *Cfh* de rata inactivado, por ejemplo, contactando el genoma de rata o el gen o locus *Cfh* de rata con (i) uno o más agentes nucleasa, en donde los agentes nucleasa inducen mellas o roturas bicatenarias en secuencias diana dentro del locus genómico diana en el gen o locus *Cfh* de rata; y (ii) uno o más vectores de direccionamiento o ácidos nucleicos de donante exógeno que comprenden brazos de homología 5' y 3' correspondientes a secuencias diana 5' y 3' ubicadas en suficiente proximidad a las secuencias diana de nucleasa. Puede usarse cualquier agente nucleasa que induzca una mella o rotura bicatenaria en una secuencia diana deseada. Los ejemplos de nucleasas adecuadas incluyen una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción (TALEN), una nucleasa de dedos de zinc (ZFN), una meganucleasa, y sistemas de repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente e intercaladas (CRISPR)/asociados a CRISPR (Cas) o componentes de dichos sistemas (p. ej., CRISPR/Cas9). Véase, p. ej., los documentos US 2013/0309670 y US 2015/0159175.

En un ejemplo específico, un método para producir una rata que comprende un locus *Cfh* endógeno inactivado puede comprender: (a) introducir en una célula madre embrionaria (ES) de rata un primer agente nucleasa que se dirige a

una primera secuencia diana en proximidad al codón de inicio del locus genómico *Cfh* endógeno, en donde el agente nucleasa escinde la primera secuencia diana para producir una célula ES de rata modificada genéticamente que comprende el locus *Cfh* endógeno inactivado; (b) introducir la célula de rata (ES) modificada genéticamente en un embrión hospedador de rata; y (c) gestar el embrión hospedador de rata en una madre subrogada, en donde la madre subrogada produce una progenie F0 de rata modificada genéticamente que comprende el locus *Cfh* endógeno inactivado. En otro ejemplo específico, un método para producir una rata que comprende un locus *Cfh* endógeno inactivado puede comprender: (a) introducir en un embrión de rata en fase unicelular un primer agente nucleasa que se dirige a una primera secuencia diana en proximidad al codón de inicio del locus genómico *Cfh* endógeno, en donde el agente nucleasa escinde la primera secuencia diana para producir un embrión de rata en fase unicelular modificado genéticamente que comprende el locus *Cfh* endógeno inactivado; y (b) gestar el embrión de rata en fase unicelular modificada genéticamente en una madre subrogada, en donde la madre subrogada produce una progenie F0 de rata modificada genéticamente que comprende el locus *Cfh* endógeno inactivado. La primera secuencia diana del primer agente nucleasa puede estar, por ejemplo, en el primer exón, cadena arriba del primer exón (p. ej., en la región 5' no traducida (5'UTR)), o cadena abajo del primer exón (p. ej., en el primer intrón) del locus *Cfh* endógeno. Por ejemplo, la secuencia diana puede estar a una distancia de aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, o aproximadamente 1000 nucleótidos del codón de inicio. Como ejemplo específico, la secuencia diana puede estar a una distancia de aproximadamente 100 nucleótidos del codón de inicio. Opcionalmente, el primer agente nucleasa es una proteína Cas9 y un ARN guía. La proteína Cas9 se puede suministrar en forma de proteína, ARNm o ADN y el ARN guía se puede suministrar en forma de ARN o ADN. Por ejemplo, tanto la proteína Cas9 como el ARN guía pueden suministrarse en forma de ADN. Por ejemplo, el ADN que codifica la proteína Cas9 puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la SEQ ID NO: 6. La secuencia de la proteína Cas9 puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en la SEQ ID NO: 7. Opcionalmente, la primera secuencia diana comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la SEQ ID NO: 12 o 13. Opcionalmente, la secuencia de ARN guía comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la SEQ ID NO: 8 o 9. El agente nucleasa puede escindir la primera secuencia diana, que puede repararse mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ), dando como resultado deleciones y/o inserciones adicionales (indeles) en el locus genómico diana que alteran el codón de inicio.

La etapa (a) en dichos métodos puede comprender además introducir en la célula ES de rata un segundo agente nucleasa que se dirige a una segunda secuencia diana en proximidad al codón de terminación del locus *Cfh* endógeno. Del mismo modo, la etapa (a) en tales métodos puede comprender además introducir en el embrión de rata en fase unicelular un segundo agente nucleasa que se dirige a una segunda secuencia diana en proximidad al codón de terminación del locus *Cfh* endógeno. La segunda secuencia diana del segundo agente nucleasa puede estar, por ejemplo, en el penúltimo intrón, en el penúltimo exón, en el último exón, cadena arriba del último exón (p. ej., en el último intrón), o cadena abajo del último exón (p. ej., en la región 3' no traducida (3' UTR)) del locus *Cfh* endógeno. Por ejemplo, la secuencia diana puede estar a una distancia de aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 1000 nucleótidos, aproximadamente 2000, aproximadamente 3000, aproximadamente 4000 o aproximadamente 5000 nucleótidos del codón de terminación. En un ejemplo específico, la secuencia diana puede estar a una distancia de aproximadamente 200 nucleótidos del codón de terminación o a una distancia de aproximadamente 3000 nucleótidos del codón de terminación. Opcionalmente, el segundo agente nucleasa es una proteína Cas9 y un ARN guía. La proteína Cas9 se puede suministrar en forma de proteína, ARNm o ADN y el ARN guía se puede suministrar en forma de ARN o ADN. Opcionalmente, la segunda secuencia diana comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la SEQ ID NO: 14 o 15. Opcionalmente, la secuencia de ARN guía comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la SEQ ID NO: 10 u 11. Los agentes nucleasa primero y segundo pueden escindir la primera y segunda secuencias diana, respectivamente, que puede repararse mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ) para eliminar la secuencia entre la primera y la segunda secuencia diana, eliminando de este modo parte o la totalidad de la secuencia codificante del locus *Cfh* endógeno.

Como alternativa, la etapa (a) en tales métodos puede comprender además introducir en la célula ES de rata un segundo agente nucleasa que se dirige a una segunda secuencia diana en proximidad al codón de inicio del locus *Cfh* endógeno que es diferente de la primera secuencia diana. Del mismo modo, la etapa (a) en dichos métodos puede comprender además introducir en el embrión de rata en fase unicelular un segundo agente nucleasa que se dirige a una segunda secuencia diana en proximidad al codón de inicio del locus *Cfh* endógeno que es diferente de la primera secuencia diana. La primera secuencia diana del primer agente nucleasa puede estar, por ejemplo, en el primer exón o cadena arriba del primer exón (p. ej., en la 5' UTR) del locus *Cfh* endógeno, y la segunda secuencia diana del segundo agente nucleasa puede estar, por ejemplo, en el primer exón o cadena abajo del primer exón (p. ej., en el primer intrón) del locus *Cfh* endógeno. Por ejemplo, la secuencia diana puede estar a una distancia de aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, o aproximadamente 1000 nucleótidos del codón de inicio. En un ejemplo específico, la secuencia diana puede estar a una distancia de aproximadamente 100 nucleótidos del codón de inicio. Opcionalmente, el segundo agente nucleasa es una proteína Cas9 y un ARN guía. La proteína Cas9 se puede suministrar en forma de proteína, ARNm o ADN y el ARN guía se puede suministrar en forma de ARN o ADN. Opcionalmente, la primera y segunda secuencias diana

flanquean el codón de inicio. Opcionalmente, la primera secuencia diana comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la SEQ ID NO: 12, y la segunda secuencia diana comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la SEQ ID NO: 13. Opcionalmente, el primer ARN guía comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la SEQ ID NO: 8, y el segundo ARN guía comprende, consiste esencialmente en, o consiste en la SEQ ID NO: 9. Los agentes nucleasa primero y segundo pueden escindir la primera y segunda secuencias diana, respectivamente, que puede repararse mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ) para eliminar la secuencia entre la primera y la segunda secuencia diana, eliminando de este modo el codón de inicio.

La etapa (a) en tales métodos puede comprender además introducir en la célula ES de rata un tercer agente nucleasa y/o un cuarto agente nucleasa que se dirige a las secuencias diana tercera y cuarta, respectivamente, en proximidad al codón de terminación del locus *Cfh* endógeno, en donde la tercera y cuarta secuencias diana son diferentes. Del mismo modo, la etapa (a) en dichos métodos puede comprender además introducir en el embrión de rata en fase unicelular un tercer agente nucleasa y/o un cuarto agente nucleasa que se dirige a la tercera y cuarta secuencias diana, respectivamente, en proximidad al codón de terminación del locus *Cfh* endógeno, en donde la tercera y cuarta secuencias diana son diferentes. La tercera y/o cuarta secuencia diana puede estar, por ejemplo, en el penúltimo intrón, en el penúltimo exón (p. ej., el exón 21), en el último exón (p. ej., el exón 22), cadena arriba del último exón (p. ej., en el último intrón), o cadena abajo del último exón (p. ej., en la 3' UTR) del locus *Cfh* endógeno. Por ejemplo, la secuencia diana puede estar a una distancia de aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 100, aproximadamente 200, aproximadamente 300, aproximadamente 400, aproximadamente 500, aproximadamente 1000 nucleótidos, aproximadamente 2000, aproximadamente 3000, aproximadamente 4000 o aproximadamente 5000 nucleótidos del codón de terminación. En un ejemplo específico, la secuencia diana puede estar a una distancia de aproximadamente 200 nucleótidos del codón de terminación o a una distancia de aproximadamente 3000 nucleótidos del codón de terminación. Opcionalmente, el tercer y/o cuarto agente nucleasa es una proteína Cas9 y un ARN guía. La proteína Cas9 se puede suministrar en forma de proteína, ARNm o ADN y el ARN guía se puede suministrar en forma de ARN o ADN. Opcionalmente, la tercera secuencia diana y/o la cuarta secuencia diana comprende, consiste esencialmente en, o consiste en las SEQ ID NOS: 14 y/u 15, respectivamente. Opcionalmente, el tercer ARN guía y/o el cuarto ARN guía comprende, consiste esencialmente en, o consiste en las SEQ ID NOS: 10 y/u 11, respectivamente. El primer y/o segundo agente nucleasa puede escindir la primera y/o segunda secuencia diana, respectivamente, y el tercer y/o cuarto agente nucleasa puede escindir la tercera y/o cuarta secuencia diana, respectivamente, que puede repararse mediante unión de extremos no homólogos (NHEJ) para eliminar la secuencia entre la primera y la segunda secuencia diana, la primera y tercera secuencias diana, la primera y cuarta secuencias diana, la segunda y tercera secuencias diana, o la segunda y cuarta secuencias diana, eliminando de este modo la mayor parte o la totalidad de la secuencia codificante del locus *Cfh* endógeno.

La etapa (a) en dichos métodos puede comprender además introducir en la célula ES de rata un ácido nucleico donante exógeno o un vector de direccionamiento que comprende un brazo de homología 5' que se hibrida con una secuencia diana 5' en el locus *Cfh* endógeno y un brazo de homología 3' que se hibrida con una secuencia diana 3' en el locus *Cfh* endógeno, en donde el ácido nucleico donante exógeno o vector de direccionamiento está diseñado para mutar o eliminar el codón de inicio del locus *Cfh* endógeno o está diseñado para eliminar parte o la totalidad de la secuencia codificante del locus *Cfh* endógeno (incluido opcionalmente el codón de inicio). Del mismo modo, la etapa (a) en dichos métodos puede comprender además introducir en el embrión de rata en fase unicelular un ácido nucleico donante exógeno o un vector de direccionamiento que comprende un brazo de homología 5' que se hibrida con una secuencia diana 5' en el locus *Cfh* endógeno y un brazo de homología 3' que se hibrida con una secuencia diana 3' en el locus *Cfh*, en donde el ácido nucleico donante exógeno o vector de direccionamiento está diseñado para mutar o eliminar el codón de inicio del locus *Cfh* endógeno o está diseñado para eliminar parte o la totalidad de la secuencia codificante del locus *Cfh* endógeno (incluido opcionalmente el codón de inicio). Como alternativa o adicionalmente, el ácido nucleico donante exógeno o el vector de direccionamiento se pueden diseñar para interrumpir el codón de inicio insertando una secuencia de inserción (flanqueada por los brazos de homología 5' y 3') en el codón de inicio o en el locus *Cfh*. En dichos métodos, el ácido nucleico donante exógeno o el vector de direccionamiento puede recombinarse con el locus diana mediante reparación dirigida por homología o puede insertarse mediante inserción mediada por NHEJ para generar el locus *Cfh* inactivado. Por ejemplo, la secuencia donante exógena o el vector de direccionamiento puede funcionar para eliminar la secuencia del genoma entre las secuencias diana 5' y 3' para generar el locus *Cfh* inactivado. En un ejemplo, la secuencia diana 5' y 3' puede flanquear el codón de inicio del locus *Cfh* endógeno. En otro ejemplo más, las secuencias diana 5' y 3' pueden flanquear el primer exón del locus *Cfh* endógeno. En otro ejemplo más, las secuencias diana 5' y 3' pueden flanquear parte o la totalidad de la secuencia codificante del locus *Cfh* endógeno.

La célula donante puede introducirse en un embrión hospedador en cualquier fase, como la fase de blastocisto o la fase de premórula (es decir, la fase de 4 células o la fase de 8 células). Se generan descendientes que pueden transmitir la modificación genética a través de la línea germinal. Véase, p. ej., la patente de EE. UU. n.º 7.294.754.

Como alternativa, el método para producir las ratas descritas en otra parte del presente documento puede comprender: (1) modificar el genoma de un embrión en fase unicelular para que comprenda el locus *Cfh* inactivado utilizando los métodos descritos anteriormente para modificar células pluripotentes; (2) seleccionar el embrión modificado genéticamente; y (3) implantar y gestar el embrión modificado genéticamente en una madre subrogada. Como

alternativa, el método para producir las ratas descritas en otra parte del presente documento puede comprender: (1) modificar el genoma de un embrión en fase unicelular para que comprenda el locus *Cfh* inactivado utilizando los métodos descritos anteriormente para modificar células pluripotentes; (2) seleccionar el embrión modificado genéticamente; y (3) gestar el embrión modificado genéticamente en una madre subrogada. Se generan descendientes que pueden transmitir la modificación genética a través de la línea germinal.

También se pueden utilizar técnicas de transferencia nuclear para generar las ratas. Brevemente, los métodos para la transferencia nuclear pueden incluir las etapas de: (1) enuclear un ovocito o proporcionar un ovocito enucleado; (2) aislar o proporcionar una célula donante o núcleo para ser combinada con el ovocito enucleado; (3) insertar la célula o núcleo en el oocito enucleado para formar una célula reconstituida; (4) implantar la célula reconstituida en el útero de un animal para formar un embrión; y (5) dejar que el embrión se desarrolle. En dichos métodos, los ovocitos generalmente se obtienen de animales fallecidos, aunque pueden aislarse también de oviductos y/u ovarios de animales vivos. Los ovocitos pueden madurar en una diversidad de medios bien conocidos antes de la enucleación. La enucleación del ovocito se puede realizar de varias maneras bien conocidas. La inserción de la célula donante o núcleo dentro del ovocito enucleado para formar una célula reconstituida puede ser por microinyección de una célula donante bajo la zona pelúcida antes de la fusión. La fusión puede inducirse por aplicación de un pulso eléctrico DC a través de un plano de contacto/fusión (electrofusión), por exposición de las células a sustancias químicas promotoras de la fusión, tales como polietilenglicol, o por medio de un virus inactivado, tal como el virus Sendai. Una célula reconstituida puede activarse por medios eléctricos y/o no eléctricos antes, durante y/o después de la fusión del donante nuclear y el ovocito receptor. Los métodos de activación incluyen pulsos eléctricos, choque químicamente inducido, penetración por esperma, incremento de los niveles de cationes divalentes en el ovocito, y reducción de la fosforilación de las proteínas celulares (como por medio de los inhibidores de cinasa) en el ovocito. Las células reconstituidas activadas, o embriones, pueden cultivarse en medios bien conocidos y luego transferirse a la matriz de un animal. Véase, p. ej., los documentos US 2008/0092249, WO 1999/005266, US 2004/0177390, WO 2008/017234 y la patente de EE. UU. n.º 7.612.250.

Los diversos métodos proporcionados en el presente documento permiten la generación de una rata F0 modificada genéticamente en donde las células de la rata F0 modificada genéticamente comprenden el locus *Cfh* humanizado. Las células de la rata F0 modificada genéticamente pueden ser heterocigotas para el locus *Cfh* inactivado o pueden ser homocigotas para el locus *Cfh* inactivado.

Si diferentes versiones de una secuencia están asociadas con un número de referencia en diferentes momentos, se entiende la versión asociada con el número de referencia en la fecha de entrada en vigor de presentación de esta solicitud. La fecha de entrada en vigor de presentación significa la primera entre la fecha de presentación real o la fecha de presentación de una solicitud de prioridad que se refiere al número de referencia, si corresponde. Del mismo modo, si diferentes versiones de una publicación, sitio web o similares se publican en diferentes momentos, se entiende la versión publicada más recientemente en la fecha de entrada en vigor de presentación de la solicitud, a menos que se indique lo contrario.

40 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos enumeradas en el listado de secuencias adjunto se muestran usando abreviaturas de letras convencionales para bases nucleotídicas y el código de tres letras para aminoácidos. Las secuencias de nucleótidos siguen la convención estándar de comenzar en el extremo 5' de la secuencia y continuar hacia adelante (es decir, de izquierda a derecha en cada línea) hasta el extremo 3'. Solo se muestra una cadena de cada secuencia de nucleótidos, pero se entiende que la cadena complementaria está incluida por cualquier referencia a la cadena que se muestra. Cuando se proporciona una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos, se entiende que también se proporcionan variantes degeneradas de codones de la misma que codifican la misma secuencia de aminoácidos. Las secuencias de aminoácidos siguen la convención estándar de comenzar en el extremo amino de la secuencia y continuar hacia adelante (es decir, de izquierda a derecha en cada línea) hasta el extremo carboxi.

Tabla 2. Descripción de Secuencias.

SEQ ID NO	Tipo	Descripción
1	ADN	Secuencia genómica de <i>Cfh</i> de rata
2	ADN	Secuencia codificante de <i>Cfh</i> de rata
3	Proteína	Secuencia de proteína CFH de rata (NP 5690932)
4	ADN	Locus genómico modificado <i>Cfh</i> de rata en el clon AA8
5	ADN	Secuencia genómica de <i>Cfh</i> de rata eliminada en el clon AA8

(continuación)

SEQ ID NO	Tipo	Descripción
6	ADN	Secuencia de ADN de Cas9
7	Proteína	Secuencia de proteína Cas9
8	ARN	ARNgu de rGU1
9	ARN	ARNgu de rGU2
10	ARN	ARNgu de rGD2
11	ARN	ARNgu de rGD3
12	ADN	Secuencia diana rGU1
13	ADN	Secuencia diana rGU2
14	ADN	Secuencia diana rGD2
15	ADN	Secuencia diana rGD3
16	ADN	Secuencia de ARNm (ADNc) de CFH de rata con N.º de registro asignado NM 130409.2
17	ADN	rTUF
18	ADN	rTUP
19	ADN	rTUR
20	ADN	rTU2F
21	ADN	rTU2P
22	ADN	rTU2R
23	ADN	AmpF1
24	ADN	AmpR1
25	ADN	AmpF2
26	ADN	AmpR2

Ejemplos

5 Ejemplo 1. Generación de ratas que comprenden un locus *Cfh* inactivado

Para generar una rata nuligénica para el alelo *Cfh*, se diseñaron ARN guía para cortar en los extremos del gen *Cfh* para colapsar (eliminar) la secuencia codificante o se diseñaron para cortar en sitios que flanquean el codón de inicio para eliminar el codón de inicio. No se utilizó ningún vector de direccionamiento. El locus *Cfh* de rata endógeno (del exón 1 al exón 22) se establece en la SEQ ID NO: 1. La secuencia codificante de *Cfh* de rata se establece en la SEQ ID NO: 2. La secuencia de proteína CFH de rata se establece en la SEQ ID NO: 3.

Los componentes CRISPR/Cas9 que incluyen cuatro ARN guía (secuencias diana de ARN guía establecidas en las SEQ ID NOS: 12-15 para rGU1, rGU2, rGD2 y rGD3, respectivamente) se introdujeron en células madre embrionarias de rata Dark Agouti. Específicamente, se electroporaron 2×10^6 células ES de rata (línea Dark Agouti DA2B) con lo siguiente: 5 µg de plásmido de expresión Cas9 (secuencia codificante de Cas9 establecida en la SEQ ID NO: 6); y 5 µg de cada uno de los ADN que codifican los siguientes ARNg: rGU1, rGU2, rGD2 y rGD3 (secuencias de ARN guía establecidas en las SEQ ID NOS: 8-11, respectivamente, dirigidos a las secuencias de *Cfh* de rata establecidas en las SEQ ID NOS: 12-15, respectivamente). La secuencia diana de rGD2 tiene una diferencia de un nucleótido (una "C" en lugar de una "A" en el resto 17) en comparación con la secuencia diana anotada en la secuencia genómica de *Cfh* de rata establecida en la SEQ ID NO: 1. La razón de esta diferencia es que el ARN guía es específico de la secuencia de la cepa Dark Agouti (la cepa de células ES de rata utilizada), mientras que la secuencia genómica proviene de la cepa Brown Norway (la cepa que se utilizó para secuenciar el genoma de la rata). La variante A/C es un SNP entre Dark Agouti y Brown Norway. Las condiciones de electroporación fueron: voltaje de 400 V; capacitancia de 100 mF; y resistencia de 0 W. Se seleccionaron colonias, se expandieron y se cribaron mediante los ensayos de pérdida de alelo TAQMAN® para detectar la pérdida del alelo endógeno de rata. Véase la **Figura 1B**. Los cebadores y sondas para los ensayos de pérdida de alelo se establecen en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Ensayos de cribado.

Uso	Cebador/Sonda	Secuencia	SEQ ID NO
TULOA	rTUF	CATAGCAGAGAGGAACTGGATGGT	17
TULOA	rTUP	GCACATACTTCTCTT	18
TULOA	rTUR	GTCAACTGCTCCCAGATAGATCCAAG	19
TU2 LOA	rTU2F	ACCACCACCTTTCTCCCTTCTGACTG	20
TU2 LOA	rTU2P	GCCGCATTATAAAAACA	21
TU2 LOA	rTU2R	TTGCTGATAATATTTCTCATAGCAA	22
NGS par 1	AmpF1	ATTTCTAACTAACTTTCAAC	23
NGS par 1	AmpR1	GTGGTAAGTTTAAAAACCGTGAA	24
NGS par 2	AmpF2	CGCCTATGCTGCTGGACTTGTGGT	25
NGS par 2	AmpR2	CTTTCACTTGACTATTGTAATTGAT	26

- 5 Se describen ensayos de modificación de alelo (MOA), incluidos ensayos de pérdida de alelo (LOA), por ejemplo, en los documentos US 2014/0178879; US 2016/0145646; WO 2016/081923; y Frendewey et al. (2010) Methods Enzymol. 476:295-307. El ensayo de pérdida de alelo (LOA) invierte la lógica de detección convencional y cuantifica el número de copias en una muestra de ADN genómico del locus nativo al que se dirigió la mutación. En un clon celular heterocigoto dirigido correctamente, el ensayo de LOA detecta uno de los dos alelos nativos (para genes que no están en el cromosoma X o Y), alterándose el otro alelo por la modificación diana.
- 10 Se seleccionaron seis clones y se muestran en la **Figura 1A** y en la **Tabla 4** a continuación. Se identificaron colonias en las que un alelo de *Cfh* estaba colapsado. También se identificaron colonias en las que sólo se eliminó el exón 1 (que contiene el codón de inicio ATG). La línea de ratas con *Cfh* inactivado se estableció utilizando el clon AA8, que tenía una delección heterocigota de 146 pb en el exón 1 que elimina el codón de inicio ATG, la secuencia codificante del exón 1 y el sitio donante de corte y empalme en el intrón 1. La secuencia eliminada se establece en la SEQ ID NO: 5, y el locus genómico *Cfh* modificado en el clon AA8 se establece en la SEQ ID NO: 4. El clon positivo AA8 se descongeló, se expandió y se reconfirmó mediante TAQMAN®. AA8 también fue confirmado mediante secuenciación de próxima generación (NGS).

Tabla 4. Clones nuligénicos para *Cfh*.

Clon	Mutación	Fecha de microinyección	Quimeras	Transmisión de la línea germinal
BE6	ΔCDS (97 kb)	6 de mayo de 2016; 20 de mayo de 2016	0	N/A
HG6	ΔCDS (97 kb)	6 de mayo de 2016; 20 de mayo de 2016	0	N/A
BB7	ΔCDS (97 kb)	20 de mayo de 2016	1M	N.º
AE1	ΔExón 1 (183 pb)	30 de septiembre de 2016	3F; 3 MPE	N.º
AA8	ΔExón 1 (146 pb)	30 de septiembre de 2016	1M	SÍ
AB5	ΔExón 1 (-900 pb)	30 de septiembre de 2016	2M	N.º

- 20 Se generaron ratas F0 y F1 utilizando métodos como se describe en los documentos US 2014/0235933, US 2014/0310828, WO 2014/130706 y WO 2014/172489. El clon de células ES de rata AA8 (Dark Agouti) heterocigoto confirmado se microinyectó en un blastocisto Sprague Dawley (SD), que a continuación se transfirió a una hembra receptora pseudopreñada (hembra receptora SD) para su gestación utilizando técnicas convencionales. Las quimeras se identificaron por el color del pelaje y las quimeras F0 macho se cruzaron con ratas hembras de tipo silvestre de la misma cepa (hembras SD). Las crías de la línea germinal (p. ej., Agouti) F1 fueron a continuación genotipadas para determinar la presencia del alelo modificado homocigoto. Las ratas F1 nuligénicas para *Cfh* homocigoto fueron 50 % Dark Agouti y 50 % Sprague Dawley.

30 Ejemplo 2. Caracterización de ratas que comprenden un locus *Cfh* inactivado

Para evaluar si las ratas nuligénicas para *Cfh* recapitulan el fenotipo de la glomerulopatía C3 (C3G), se evaluaron varias lecturas relacionadas con la activación de la vía alternativa del complemento, la patología renal y la mortalidad. La glomerulopatía C3 (C3G) se caracteriza por una hiperactivación de la activación del complemento por la vía

alternativa (AP) como resultado de factores nefríticos C3 y/o mutaciones en los genes del complemento. Debido a que aproximadamente el 50 % de los pacientes desarrollan enfermedad renal terminal (ERT) dentro de los 10 años posteriores al diagnóstico, se evaluó la supervivencia de ratas macho y hembra nuligénicas para *Cfh* (20 ratas macho, 18 ratas hembra). Como se muestra en la **Figura 2**, la mediana de la edad a la que las ratas nuligénicas para *Cfh* macho murieron fue 52 días (~1,7 meses), y la mediana de la edad a la que las ratas nuligénicas para *Cfh* hembra murieron fue de 103 días (~ 3,4 meses). La última rata nuligénica para *Cfh* macho murió a los 122 días (~4 meses), y la última rata nuligénica para *Cfh* hembra murió a los 247 días (~8,1 meses). Se observó una diferencia entre hembras y machos. La actividad del complemento en ratones hembra es menor que en ratones macho, y puede existir una diferencia de género similar en las ratas. Esta mortalidad espontánea ocurre muy temprano en la vida de las ratas nuligénicas para *Cfh* y es drásticamente menor que el promedio de vida de tres años de las ratas de laboratorio de tipo silvestre. Adicionalmente, la mortalidad espontánea observada en ratas nuligénicas para *Cfh* es un fenotipo mucho más evidente y rápido que el observado en ratones nuligénicos para *Cfh*, para los cuales se ha descrito solo un 23 % de mortalidad después de 8 meses. Véase Pickering *et al.* (2002) *Nat. Genet.* 31(4):424-428.

También se observaron niveles circulatorios más bajos de C3 tanto en ratas macho como hembra nuligénicas para *Cfh* en comparación con sus homólogas de tipo silvestre. Los niveles circulatorios de C3 se midieron en machos y hembras de tipo silvestre (WT) de 7 semanas de edad y ratas nuligénicas para *Cfh* usando un ELISA tipo sándwich de ABCAM. Las muestras y los patrones se diluyeron y se añadieron a una placa con el anticuerpo C3 unido. La placa se lavó después de la incubación y se añadió otro anticuerpo anti-C3. Después de otra incubación, se usó un anticuerpo secundario contra el anticuerpo de detección y a continuación se expuso a una solución de TMB para crear un color mensurable. La reacción se detuvo con ácido y la señal se midió a 450 nm. El complemento C3 se hidroliza constantemente, el cual puede formar C3 convertasa en fase fluida que posteriormente escinde más moléculas de C3. El CFH es un regulador negativo endógeno de la vía alternativa y es necesario para inhibir la activación/escisión de C3. Sin CFH, el C3 se consume continuamente, lo que conduce a niveles circulatorios más bajos, como se muestra en la **Figura 3**.

También se observó un aumento del depósito de C3 y C5b-9 en los riñones de ratas nuligénicas para *Cfh* en comparación con sus homólogas de tipo silvestre, lo que coincide con lo que se observa en pacientes humanos con C3G. Véase, p. ej., Barbour *et al.* (2013) *Semin. Nephrol.* 33(6):493-507 y Vivarelli *et al.* (2012) *N. Engl. J. Med.* 366(12):1163-1165. El depósito de C3 y C5b-9 se midió en muestras de riñón de tres ratas hembra de tipo silvestre de 18 semanas, 17 semanas y 17 semanas de edad, respectivamente, y tres ratas nuligénicas para *Cfh* hembra de 12 semanas, 17 semanas y 9 semanas de edad, respectivamente. La inmunohistoquímica se realizó en cortes congelados de riñón de rata utilizando una dilución 1:50 de anti-C3 de cabra conjugado con fluoresceína (MP Biomedicals n.º 55191) y una dilución 1:100 de anti-C5b-9 de conejo (Abcam ab55811), junto con una dilución 1:333,3 de anticonejo de burro conjugado con Cy5 (Jackson Immunoresearch 711-605-152). Los resultados se muestran en la **Figura 4**. Las ratas nuligénicas para *Cfh* muestran un depósito espontáneo de proteínas del complejo de ataque a la membrana (MAC) C3 y C5b-9 muy superior al observado en ratas de tipo silvestre.

La glomeruloesclerosis grave, la atrofia tubular y los cilindros proteicos en ratas nuligénicas para *Cfh* también se observaron en comparación con sus homólogas de tipo silvestre. Los cilindros se desarrollan cuando hay proteinuria (cuando la proteína se filtra a la orina). Los cilindros son el resultado de la solidificación de proteínas en la luz de los túbulos renales. Se tomaron muestras de riñón de una rata hembra de tipo silvestre a las 15 semanas de edad y de tres ratas hembra nuligénicas para *Cfh* (rata CFH KO 1, rata CFH KO 2 y rata CFH KO 3) de 12 semanas, 13 semanas y 15 semanas de edad, respectivamente. Las muestras de riñón se tiñeron con una tinción de ácido peryódico de Schiff. Brevemente, los portaobjetos se tiñeron con reactivo de Schiff después de la oxidación en ácido periódico al 1 % y a continuación se contratiñeron con hematoxilina. Como se muestra en la **Figura 5**, las ratas nuligénicas para *Cfh* mostraron una expansión drástica de la matriz de las células mesangiales y del tamaño del penacho glomerular, así como dilatación prominente de los túbulos renales. Esta patología es más grave que la patología que se ha observado en ratones nuligénicos para *Cfh*. No parece que se hayan descrito patologías tubulares en los datos publicados sobre ratones nuligénicos para *Cfh*, mientras que está claro que las ratas nuligénicas para *Cfh* tienen patologías tubulares. Las ratas nuligénicas para *Cfh* también parecen tener más glomeruloesclerosis en comparación con los datos publicados sobre ratones nuligénicos para *Cfh*. Véase, p. ej., Pickering *et al.* (2002) *Nat. Genet.* 31(4):424-428. Estos hallazgos son concordantes con la pérdida de la función renal y el aumento de la mortalidad.

El nitrógeno ureico en sangre (BUN), un marcador de la filtración glomerular, también estaba elevado en ratas nuligénicas para *Cfh* en comparación con sus homólogas de tipo silvestre, lo que sugiere una tasa de filtración glomerular reducida. Los niveles de nitrógeno ureico en sangre se midieron en ratas macho de tipo silvestre y nuligénicas para *Cfh* (**Figura 6A**) y ratas hembra de tipo silvestre y nuligénicas para *Cfh* (**Figura 6B**) semanalmente a partir de las 7 semanas de edad hasta que todas las ratas nuligénicas para *Cfh* murieron. El kit de ensayo utilizado para los niveles de nitrógeno ureico en sangre (BUN) era de BioAssay Systems. Este ensayo utiliza el método de Jung que utiliza un reactivo cromogénico que forma un complejo coloreado con la urea. Para realizar esto, el suero se diluyó 5x y se sembró en placas a un volumen de 5 µl. Se añadió un patrón. En una relación de 1:1, se añadieron a la placa 200 µl de los reactivos A y B. Después de 20 minutos, la señal se leyó a 430 nm. El nitrógeno ureico en sangre (BUN) es un marcador de la función renal. Cuando los riñones empiezan a fallar, el BUN se acumula en la sangre. El aumento de BUN en la circulación, como se observó tanto en ratas hembra como macho nuligénicas para *Cfh*, significa disminución de la función renal. Véanse las **Figuras 6A** y **6B**. Este fenotipo es más evidente que en los ratones

nuligénicos para *Cfh*. Aunque los niveles de BUN no se midieron en ratones nuligénicos para *Cfh*, se midieron los niveles de otro marcador de la función renal, creatinina sérica, y no difirieron entre ratones nuligénicos para *Cfh* y ratones de tipo silvestre. Véase, p. ej., Pickering *et al.* (2002) *Nat. Genet.* 31(4):424-428.

5 La cistatina C sérica (sCysC), un marcador de la filtración glomerular, también se midió en ratas nuligénicas para *Cfh* y sus homólogas de tipo silvestre. Los niveles de cistatina C en suero se midieron en ratas macho de tipo silvestre y nuligénicas para *Cfh* (**Figura 8A**) y ratas hembra de tipo silvestre y nuligénicas para *Cfh* (**Figura 8B**) semanalmente a partir de las 7 semanas de edad hasta que todas las ratas nuligénicas para *Cfh* murieron usando un kit de acuerdo con el protocolo del fabricante (Biovendor n.º RD391009200R). La cistatina C en suero también estaba elevada en
10 ratas nuligénicas para *Cfh* en comparación con sus homólogas de tipo silvestre, lo que sugiere una tasa de filtración glomerular reducida. Véanse las **Figuras 8A y 8B**.

A continuación, se recogió orina de ratas de tipo silvestre o nuligénicas para *Cfh* durante 16-18 horas utilizando jaulas de diuresis (Tecniplast Inc.). La albúmina urinaria y la creatina urinaria se midieron utilizando kits de Exocell (n.º de
15 catálogo NR002 y 1012 respectivamente) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La albúmina urinaria se cuantificó por día o se normalizó a creatinina urinaria y se midió tanto en ratas macho como hembra. Como se muestra en las **Figuras 9A-9D**, la albúmina urinaria por día o normalizada a creatinina estaba elevada tanto en ratas macho (**Figuras 9A y 9B**) como hembra (**Figuras 9C y 9D**) nuligénicas para *Cfh* en comparación con sus homólogas de tipo silvestre. La albuminuria es un marcador de lesión renal que sugiere un glomérulo con fugas.

20 A continuación evaluamos la lesión glomerular mediante microscopía electrónica en ratas nuligénicas para *Cfh*. Las ratas estudiadas incluyeron 5 controles de tipo silvestre (7 semanas de edad) y 7 ratas nuligénicas para *Cfh* (7 semanas de edad). Se fijaron muestras de tejido renal cortical en glutaraldehído. Los tejidos fijados se procesaron para corte y tinción para microscopía electrónica, y los glomérulos en tejidos obtenidos en un único momento se
25 evaluaron mediante microscopía electrónica. La evaluación histológica incluyó: medidas de borramiento del proceso del pie de los podocitos; grosor de la membrana basal glomerular (MBG); otras alteraciones patológicas de la MBG (si son evidentes); evaluación cualitativa de las anomalías de las células endoteliales glomerulares; y presencia y ubicación de cualquier depósito glomerular denso en electrones.

30 La enfermedad glomerular se evaluó mediante los siguientes criterios: (1) medición del borramiento del proceso del pie de los podocitos; (2) medición del grosor de la membrana basal glomerular; y (3) evaluación cualitativa de las anomalías de las células endoteliales glomerulares, presencia y ubicación de depósitos u otras anomalías ultraestructurales. Para medir el borramiento del proceso del pie de los podocitos, se evaluó el borramiento del proceso del pie en los glomérulos mediante el recuento directo del número de perfiles de proceso/ μm de longitud capilar. La
35 anchura promedio del proceso también se calculó utilizando la herramienta de medición lineal del software de imágenes Image-Pro Plus. Los datos se organizaron según grupos en el momento del análisis. Para medir el grosor de la membrana basal glomerular, el grosor de la membrana basal glomerular se midió mediante análisis de imágenes. Se realizaron cinco mediciones separadas perpendiculares al eje lineal a lo largo de la longitud de la membrana basal en cada imagen utilizando una herramienta de medición calibrada del software Image-Pro Plus. Los datos se
40 organizaron según grupos en el momento del análisis.

Los glomérulos de ratas de tipo silvestre mostraron una ultraestructura normal donde los podocitos tenían una interdigitación y anchura de los procesos del pie uniforme y regular, un grosor constante de la MBG y un revestimiento
45 endotelial típico del asa capilar. Las ratas nuligénicas para *Cfh* mostraron una patología ultraestructural sustancial, incluido un marcado aumento en el grosor de la membrana basal glomerular (MBG), interposición celular y depósitos densos en electrones en toda la estructura. Los podocitos mostraron borramiento (ensanchamiento de los procesos del pie) con contornos irregulares. El mesangio estaba expandido y contenía depósitos densos en electrones. El endotelio a menudo estaba inflamado, vacuolado con pérdida de fenestras (no cuantificado). Los resultados se muestran en la **Tabla 5**. La conclusión que se extrae de estos datos es que las ratas nuligénicas para *Cfh* tienen una
50 marcada patología glomerular que incluye borramiento y contorsión de podocitos, engrosamiento de la MBG con interposición celular y depósitos densos en electrones, expansión mesangial e inflamación endotelial con pérdida de fenestras.

Tabla 5. Evaluación General de Muestras.

	Normal	Membrana basal glomerular				Anomalías de los podocitos			Anomalías endoteliales	
		MBG engrosada	Depósitos	Interposicionamiento	Borrachamiento	Contornos irregulares	Pérdida de fenestras	Hinchamiento		
WT-2										
Glom 1	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glom 2	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glom 3:	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WT-3										
Glom 1:	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glom 2	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glom 3	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WT-7										
Glom 1	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glom 2	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glom 3	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WT-8										
Glom 1	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glom 2	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glom 3:	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WT-10										
Glom 1	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glom 2	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glom 3	✓	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KO-1										
Glom 1		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Glom 2		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Glom 3:		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

(continuación)

	Normal	Membrana basal glomerular			Anomalias de los podocitos			Anomalias endoteliales	
		MBG engrosada	Depósitos	Interposicionamiento	Borramiento	Contornos irregulares	Pérdida de fenestras	Hinchamiento	
KO-4									
Glom 1		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Glom 2:		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Glom 3		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
KO-5									
Glom 1		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Glom 2:		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Glom 3		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
KO-6									
Glom 1		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Glom 2:		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Glom 3		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
KO-9									
Glom 1		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Glom 2:		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Glom 3		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
KO-11									
Glom 1		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Glom 2:		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Glom 3		✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

5 Imágenes representativas de estos hallazgos se muestran en las **Figuras 10A, 10B, 11A, 11B, 12A y 12B**. Las **Figuras 10A y 10B** muestran micrografías electrónicas de un asa capilar glomerular (**Figura 10A**) y mesangio (**Figura 10B**) de un glomérulo de una rata de tipo silvestre (12.000X). El asa capilar muestra una ultraestructura normal donde los podocitos tienen procesos interdigitativos regulares en los pies colocados en la cara externa de una membrana basal glomerular intacta (**Figura 10A**, aumento en el recuadro). El endotelio que recubre el capilar muestra una ventana colocada normalmente. El mesangio (**Figura 10B**) tiene un aspecto normal donde las células ocupan una matriz escasa.

10 La **Figura 11A** muestra micrografías electrónicas de un asa capilar glomerular de un glomérulo de una rata nuligénica para *Cfh* con el mismo aumento que el anterior. La **Figura 11B** muestra un mayor aumento de la **Figura 11A**. El asa capilar ilustra una ultraestructura anormal donde los procesos del pie de los podocitos están borrados y descansan sobre una membrana basal glomerular marcadamente engrosada. La MBG contiene depósitos de diferentes densidades en todo el grosor de la estructura, pero más fuerte en localizaciones subendoteliales y subepiteliales. También se observa interposición de procesos celulares incrustados en la MBG (flechas). El endotelio está hinchado con pérdida de ventanas. Como se muestra en la **Figura 11B**, el endotelio que recubre el capilar muestra pérdida de ventana.

20 La **Figura 12A** muestra una micrografía electrónica del mesangio de un glomérulo de una rata nuligénica para *Cfh* con el mismo aumento que la **Figura 10B**. La **Figura 12B** muestra un mayor aumento de la **Figura 12A**. El mesangio ilustra una ultraestructura anormal donde la matriz está aumentada e incrustada con depósitos densos en electrones.

25 Los glomérulos de ratas de tipo silvestre (WT)-vehículo (Grupo A) mostraron una ultraestructura normal donde los podocitos mostraban una interdigitación uniforme y regular y un anchura de los procesos del pie, un grosor constante de la MBG y un revestimiento endotelial típico del asa capilar. Los glomérulos de ratas nuligénicas para *Cfh* (Grupo B) tenían una MBG marcadamente engrosada y borramiento epitelial medido por una mayor anchura y menos procesos del pie. Véase la **Tabla 6**.

Tabla 6. Análisis ultraestructural detallado.

Grupo	Tratamiento	Grosor MBG (micrómetros)	Ancho del proceso del pie (micrómetros)	Número de procesos del pie/longitud en micrómetros
A	WT + Vehículo	0,182	0,369	2,671
B	<i>Cfh</i> KO	1,800	2,564	0,708
Grupo A frente a Grupo B, P < 0,05				

30 A continuación se evaluó el grosor de la MBG mediante análisis de imágenes. El grosor promedio de la MBG en glomérulos de ratas de tipo silvestre se midió en 0,182 micrómetros (182 nm). Hubo un aumento de 10 veces en el grosor de la MBG en los glomérulos de ratas nuligénicas para *Cfh* donde el grosor promedio alcanzó 1,8 micrómetros debido al aumento de la matriz, depósitos densos en electrones e interposicionamiento celular. Las diferencias entre los dos grupos fueron estadísticamente significativas (P < 0,0001). Véase la **Tabla 7**.

Tabla 7. Grosor MBG.

		Datos reorganizados en fenotipos grupales (promedios de cada glomérulo)												
		100029	100029	100029	100029	100029	100029	100029	100029	100029	100029	100029	100029	100029
		WT-2	WT-3	WT-7	WT-8	WT-10	KO-1	KO-4	KO-5	KO-6	KO-9	KO-11		
Promedio	Glom 1	0,215	0,182	0,171	0,142	0,163	2,626	1,714	1,569	1,824	1,788	1,771		
Promedio	Glom 2	0,244	0,175	0,188	0,151	0,173	1,483	1,199	2,853	1,952	1,742	1,032		
Promedio	Glom 3	0,220	0,175	0,191	0,158	0,173	2,840	1,174	2,320	0,934	1,453	2,141		
	Promedio	0,226	0,177	0,184	0,151	0,170	2,316	1,362	2,244	1,570	1,661	1,648		

A continuación se evaluó la anchura del proceso del pie de los podocitos mediante análisis de imágenes. La anchura promedio del proceso del pie en los glomérulos de ratas de tipo silvestre se midió en 0,369 micrómetros (369 nm). Hubo un aumento de aproximadamente 7 veces en la anchura de los procesos del pie en los glomérulos de ratas nuligénicas para *Cfh* donde la anchura promedio alcanzó 2,564 micrómetros. Las diferencias entre los dos grupos fueron estadísticamente significativas ($P < 0,0001$). Véase la **Tabla 8**.

Tabla 8. Anchura del proceso del pie de podocitos.

		Datos reorganizados en fenotipos grupales (promedios de cada glomérulo)												
		100029	100029	100029	100029	100029	100029	100029	100029	100029	100029	100029	100029	100029
		WT-2	WT-3	WT-7	WT-8	WT-10	KO-1	KO-4	KO-5	KO-6	KO-9	KO-11		
Promedio	Glom 1	0,373	0,294	0,366	0,439	0,315	1,432	2,422	1,142	8,836	4,930	1,336		
Promedio	Glom 2	0,325	0,485	0,393	0,294	0,392	2,743	1,724	2,477	0,882	1,361	2,457		
Promedio	Glom 3	0,280	0,328	0,396	0,463	0,388	1,986	1,014	1,477	6,071	1,190	2,679		
	Promedio	0,326	0,369	0,385	0,399	0,364	2,054	1,720	1,699	5,263	2,494	2,157		

5 A continuación se evaluó el número de procesos del pie de podocitos/longitud en micrómetros mediante análisis de imágenes. El número promedio de procesos del pie en los glomérulos de ratas de tipo silvestre se midió en 2,67/micrómetros de longitud. Hubo una reducción de aproximadamente 3,8 veces en el número de procesos del pie que cubren las asas capilares en los glomérulos de ratas nuligénicas para *Cfh* donde se midió un promedio de 0,708 procesos de pie/longitud en micrómetros. Las diferencias entre los dos grupos fueron estadísticamente significativas ($P < 0,0001$). Véase la **Tabla 9**.

Tabla 9. Número de procesos del pie de los podocitos/longitud en micrómetros.

		Datos reorganizados en fenotipos grupales (promedios para cada glomérulo)												
		100029	100029	100029	100029	100029	100029	100029	100029	100029	100029	100029	100029	100029
		WT-2	WT-3	WT-7	WT-8	WT-10	KO-1	KO-4	KO-5	KO-6	KO-9	KO-11		
Promedio	Glom 1	2,653	3,073	2,690	2,310	2,986	0,732	0,614	0,968	0,133	0,580	0,772		
Promedio	Glom 2	2,684	2,272	2,472	3,091	2,485	0,641	0,699	0,480	1,149	0,826	0,818		
Promedio	Glom 3	3,086	2,883	2,412	2,392	2,584	0,604	1,055	0,777	0,234	0,875	0,787		
	Promedio	2,808	2,742	2,524	2,598	2,685	0,659	0,789	0,742	0,505	0,760	0,793		

Resumiendo, se observó mortalidad espontánea en ratas nuligénicas para *Cfh* que ocurre muy temprano en la vida de las ratas. Niveles más bajos de C3 en ratas nuligénicas para *Cfh* sugieren consumo a través de la activación no controlada de la vía alternativa del complemento. La histopatología renal en las ratas nuligénicas para *Cfh* concuerda con el depósito de C3 y C5b-9, así como glomeruloesclerosis y patologías tubulares. El nitrógeno ureico en sangre y la cistatina C en suero, ambos marcadores de la TFG, estaban elevados en ratas nuligénicas para *Cfh*, sugiriendo insuficiencia renal. De manera adicional, la albúmina urinaria estaba elevada en ratas nuligénicas para *Cfh*. Considerados en conjunto, estos fenotipos demuestran que las ratas nuligénicas para *Cfh* presentan una enfermedad similar a la glomerulopatía C3 (C3G) y muestran una evolución acelerada de la enfermedad que posibilita estudios preclínicos más eficientes y eficaces para evaluar nuevas terapias potenciales para la C3G.

REIVINDICACIONES

1. Una rata modificada genéticamente que comprende un locus *Cfh* endógeno inactivado, en donde la rata es homocigota para el locus *Cfh* endógeno inactivado y tiene uno o más síntomas de glomerulopatía C3 (C3G).
2. La rata modificada genéticamente de la reivindicación 1, en donde el codón de inicio del locus *Cfh* endógeno está mutado o eliminado en el locus *Cfh* endógeno inactivado.
3. La rata modificada genéticamente de la reivindicación 2, en donde el codón de inicio del locus *Cfh* endógeno está eliminado en el locus *Cfh* endógeno inactivado.
4. La rata modificada genéticamente de la reivindicación 3, en donde la secuencia codificante en el primer exón del locus *Cfh* endógeno está eliminado en el locus *Cfh* endógeno inactivado.
5. La rata modificada genéticamente de la reivindicación 4, en donde el sitio donante de corte y empalme en el primer intrón del locus *Cfh* endógeno está eliminado en el locus *Cfh* endógeno inactivado.
6. La rata modificada genéticamente de cualquier reivindicación anterior, en donde la rata modificada genéticamente tiene niveles circulatorios de C3 disminuidos en comparación con una rata de tipo silvestre.
7. La rata modificada genéticamente de la reivindicación 6, en donde:
 - (I) los niveles circulatorios de C3 son menos de aproximadamente 200 µg/ml, opcionalmente en donde los niveles circulatorios de C3 son menos de aproximadamente 100 µg/ml; y/o
 - (II) la rata modificada genéticamente tiene niveles circulatorios de C3 disminuidos en comparación con la rata de tipo silvestre a una edad de entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 17 semanas.
8. La rata modificada genéticamente de cualquier reivindicación anterior, en donde la rata modificada genéticamente tiene niveles elevados de nitrógeno ureico en sangre, niveles elevados de cistatina C en suero o niveles elevados de albúmina urinaria en comparación con una rata de tipo silvestre.
9. La rata modificada genéticamente de la reivindicación 8, en donde la rata modificada genéticamente tiene niveles elevados de nitrógeno ureico en sangre, niveles elevados de cistatina C en suero y niveles elevados de albúmina urinaria en comparación con una rata de tipo silvestre.
10. La rata modificada genéticamente de la reivindicación 8 o 9, en donde:
 - (I) los niveles de nitrógeno ureico en sangre son más de aproximadamente 10, más de aproximadamente 20, más de aproximadamente 30, más de aproximadamente 40, más de aproximadamente 50, más de aproximadamente 60, más de aproximadamente 70, más de aproximadamente 80, más de aproximadamente 90 o más de aproximadamente 100 mg/dl; y/o
 - (II) los niveles de cistatina C en suero son más de aproximadamente 1000, más de aproximadamente 1100, más de aproximadamente 1200, más de aproximadamente 1300, más de aproximadamente 1400, más de aproximadamente 1500, más de aproximadamente 1600, más de aproximadamente 1700, más de aproximadamente 1800, más de aproximadamente 1900 o más de aproximadamente 2000 ng/ml; y/o
 - (III) la albúmina urinaria por día es más de aproximadamente 1000, más de aproximadamente 2000, más de aproximadamente 3000, más de aproximadamente 4000, más de aproximadamente 5000, más de aproximadamente 6000, más de aproximadamente 7000, más de aproximadamente 8000, más de aproximadamente 9000, o más de aproximadamente 10.000 µg/día; y/o
 - (IV) la relación entre albúmina urinaria y creatinina urinaria es más de aproximadamente 100, más de aproximadamente 200, más de aproximadamente 300, más de aproximadamente 400, más de aproximadamente 500, más de aproximadamente 600, más de aproximadamente 700, más de aproximadamente 800, más de aproximadamente 900, más de aproximadamente 1000, más de aproximadamente 1100, más de aproximadamente 1200, más de aproximadamente 1300, más de aproximadamente 1400, más de aproximadamente 1500, más de aproximadamente 1600, más de aproximadamente 1700, más de aproximadamente 1800, más de aproximadamente 1900 o más de aproximadamente 2000 µg:mg; y/o
 - (V) la rata modificada genéticamente tiene niveles elevados de nitrógeno ureico en sangre, niveles elevados de cistatina C en suero, o niveles elevados de albúmina urinaria en comparación con la rata de tipo silvestre a una edad de entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 17 semanas.
11. La rata modificada genéticamente de cualquier reivindicación anterior, en donde la rata modificada genéticamente tiene un mayor depósito de C3 en los riñones en comparación con una rata de tipo silvestre, opcionalmente, en donde la rata modificada genéticamente tiene un mayor depósito de C3 en los riñones en comparación con la rata de tipo silvestre a una edad de entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 17 semanas.
12. La rata modificada genéticamente de cualquier reivindicación anterior, en donde la rata modificada genéticamente

tiene un mayor depósito de C5b-9 en los riñones en comparación con una rata de tipo silvestre, opcionalmente, en donde la rata modificada genéticamente tiene un mayor depósito de C5b-9 en los riñones en comparación con la rata de tipo silvestre a una edad de entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 17 semanas.

5 13. La rata modificada genéticamente de cualquier reivindicación anterior, en donde la rata modificada genéticamente tiene una patología glomerular más pronunciada en comparación con una rata de tipo silvestre, en donde la patología glomerular más pronunciada comprende un grosor aumentado de la membrana basal glomerular, aumento de la anchura del proceso del pie de los podocitos o disminución del número de procesos del pie de los podocitos en comparación con la rata de tipo silvestre.

10 14. La rata modificada genéticamente de la reivindicación 13, en donde la patología glomerular más pronunciada comprende un grosor aumentado de la membrana basal glomerular, aumento de la anchura del proceso del pie de los podocitos y disminución del número de procesos del pie de los podocitos en comparación con la rata de tipo silvestre.

15 15. La rata modificada genéticamente de la reivindicación 13 o 14, en donde:

(I) el aumento en el grosor de la membrana basal glomerular es al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, al menos aproximadamente 7 veces, al menos aproximadamente 8 veces, al menos aproximadamente 9 veces, o al menos aproximadamente 10 veces en comparación con la rata de tipo silvestre; y/o

(II) el grosor promedio de la membrana basal glomerular en los glomérulos de la rata modificada genéticamente es al menos aproximadamente 0,2, al menos aproximadamente 0,3, al menos aproximadamente 0,4, al menos aproximadamente 0,5, al menos aproximadamente 0,6, al menos aproximadamente 0,7, al menos aproximadamente 0,8, al menos aproximadamente 0,9, al menos aproximadamente 1,0, al menos aproximadamente 1,1, al menos aproximadamente 1,2, al menos aproximadamente 1,3, al menos aproximadamente 1,4, al menos aproximadamente 1,5, al menos aproximadamente 1,6, al menos aproximadamente 1,7 o al menos aproximadamente 1,8 micrómetros; y/o

(III) el aumento en la anchura del proceso del pie de los podocitos es al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 4 veces, al menos aproximadamente 5 veces, al menos aproximadamente 6 veces, o al menos aproximadamente 7 veces en comparación con la rata de tipo silvestre; y/o

(IV) el promedio de la anchura del proceso del pie en los glomérulos de la rata modificada genéticamente es de al menos aproximadamente 0,4, al menos aproximadamente 0,5, al menos aproximadamente 0,6, al menos aproximadamente 0,7, al menos aproximadamente 0,8, al menos aproximadamente 0,9, al menos aproximadamente 1,0, al menos aproximadamente 1,5, al menos aproximadamente 2,0 o al menos aproximadamente 2,5 micrómetros; y/o

(V) la disminución en el número de procesos del pie de los podocitos es al menos aproximadamente 2 veces, al menos aproximadamente 2,5 veces, al menos aproximadamente 3 veces, al menos aproximadamente 3,5 veces, o al menos aproximadamente 3,8 veces en comparación con la rata de tipo silvestre; y/o

(VI) el número promedio de procesos del pie de los podocitos por micrómetro de longitud en la rata modificada genéticamente es menos de aproximadamente 2,5, menos de aproximadamente 2, menos de aproximadamente 1,5, menos de aproximadamente 1, menos de aproximadamente 0,9 o menos de aproximadamente 0,8; y/o

(VII) la rata modificada genéticamente tiene una patología glomerular más pronunciada en comparación con la rata de tipo silvestre a una edad de entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 17 semanas.

16. La rata modificada genéticamente de cualquier reivindicación anterior, en donde la rata modificada genéticamente tiene una esperanza de vida menor en comparación con una rata de tipo silvestre, opcionalmente, en donde la mediana de la esperanza de vida de la rata modificada genéticamente es menos de aproximadamente 150 días.

17. Un método para evaluar la eficacia terapéutica *in vivo* de un agente para su uso en un tratamiento de la glomerulopatía C3 (C3G), que comprende:

(a) administrar el agente a la rata modificada genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16; y
 (b) evaluar uno o más síntomas de C3G en la rata modificada genéticamente a la que se le ha administrado el agente en comparación con una rata modificada genéticamente de control a la que no se le ha administrado el agente.

18. El método de la reivindicación 17, en donde la etapa (b) comprende evaluar:

- (i) niveles circulatorios de C3;
- (ii) niveles de nitrógeno ureico en sangre;
- (iii) niveles de cistatina C en suero;
- (iv) niveles de albúmina urinaria;
- (v) depósito de C3 en los riñones;
- (vi) depósito de C5b-9 en los riñones;

- (vii) grosor de la membrana basal glomerular;
 (viii) anchura del proceso del pie de los podocitos;
 (ix) número de pies de los podocitos;
 (x) esperanza de vida; o
 5 (xi) una combinación de los mismos.
19. El método de la reivindicación 17 o 18, en donde la edad de la rata modificada genéticamente está entre aproximadamente 7 semanas y aproximadamente 17 semanas.
- 10 20. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 17-19, en donde:
- (I) la etapa (b) comprende evaluar los niveles circulatorios de C3, en donde los niveles circulatorios aumentados de C3 en la rata modificada genéticamente a la que se le administró el agente en comparación con la rata modificada genéticamente de control indica un efecto terapéutico para el supuesto agente terapéutico para la C3G;
 15 y/o
 (II) la etapa (b) comprende evaluar los niveles de nitrógeno ureico en sangre, en donde los niveles disminuidos de nitrógeno ureico en sangre en la rata modificada genéticamente a la que se le administró el agente en comparación con la rata modificada genéticamente de control indica un efecto terapéutico para el supuesto agente terapéutico para la C3G; y/o
 20 (III) la etapa (b) comprende evaluar los niveles de cistatina C en suero, en donde los niveles disminuidos de cistatina C en suero en la rata modificada genéticamente a la que se le administró el agente en comparación con la rata modificada genéticamente de control indica un efecto terapéutico para el supuesto agente terapéutico para la C3G; y/o
 25 (IV) la etapa (b) comprende evaluar los niveles de albúmina urinaria, en donde los niveles disminuidos de albúmina urinaria en la rata modificada genéticamente a la que se le administró el agente en comparación con la rata modificada genéticamente de control indica un efecto terapéutico para el supuesto agente terapéutico para la C3G; y/o
 30 (V) la etapa (b) comprende evaluar el depósito de C3 en el riñón, en donde los niveles disminuidos de depósito de C3 en el riñón en la rata modificada genéticamente a la que se le administró el agente en comparación con la rata modificada genéticamente de control indica un efecto terapéutico para el supuesto agente terapéutico para la C3G; y/o
 35 (VI) la etapa (b) comprende evaluar el depósito de C5b-9 en el riñón, en donde los niveles disminuidos de depósito de C5b-9 en el riñón en la rata modificada genéticamente a la que se le administró el agente en comparación con la rata modificada genéticamente de control indica un efecto terapéutico para el supuesto agente terapéutico para la C3G; y/o
 40 (VII) la etapa (b) comprende evaluar el grosor de la membrana basal glomerular, en donde la disminución del grosor de la membrana basal glomerular en la rata modificada genéticamente a la que se le administró el agente en comparación con la rata modificada genéticamente de control indica un efecto terapéutico para el supuesto agente terapéutico para la C3G; y/o
 45 (VIII) la etapa (b) comprende evaluar la anchura del proceso del pie de los podocitos, en donde la disminución de la anchura del proceso del pie de los podocitos en la rata modificada genéticamente a la que se le administró el agente en comparación con la rata modificada genéticamente de control indica un efecto terapéutico para el supuesto agente terapéutico para la C3G; y/o
 50 (IX) la etapa (b) comprende evaluar el número de procesos del pie de los podocitos, en donde el aumento del número de procesos del pie de los podocitos en la rata modificada genéticamente a la que se le administró el agente en comparación con la rata modificada genéticamente de control indica un efecto terapéutico para el supuesto agente terapéutico para la C3G; y/o
 (X) la etapa (b) comprende evaluar la esperanza de vida, en donde una mayor esperanza de vida en la rata modificada genéticamente a la que se le administró el agente en comparación con la rata modificada genéticamente de control indica un efecto terapéutico para el supuesto agente terapéutico para la C3G.
21. Un método para producir la rata modificada genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, que comprende:
- 55 (a) modificar el genoma de una célula pluripotente de rata, en donde la célula pluripotente de rata es una célula madre embrionaria (ES) de rata para producir una célula ES de rata modificada genéticamente que comprende el locus *Cfh* endógeno inactivado;
 (b) identificar o seleccionar la célula ES de rata modificada genéticamente que comprende el locus *Cfh* endógeno inactivado;
 60 (c) introducir la célula ES de rata modificada genéticamente en un embrión hospedador de rata; y
 (d) gestar el embrión hospedador de rata en una madre subrogada, en donde la madre subrogada produce una progenie F0 de rata modificada genéticamente que comprende el locus *Cfh* endógeno inactivado.
22. Un método para producir la rata modificada genéticamente de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16, que
 65 comprende:

(I)

5 (a) introducir en una célula madre embrionaria (ES) de rata un primer agente nucleasa que se dirige a una primera secuencia diana próxima al codón de inicio del locus genómico *Cfh* endógeno, en donde el agente nucleasa escinde la primera secuencia diana para producir una célula ES de rata modificada genéticamente que comprende el locus *Cfh* endógeno inactivado;

(b) introducir la célula de rata (ES) modificada genéticamente en un embrión hospedador de rata; y

10 (c) gestar el embrión hospedador de rata en una madre subrogada, en donde la madre subrogada produce una progenie F0 de rata modificada genéticamente que comprende el locus *Cfh* endógeno inactivado; o

10 (II) (a) introducir en un embrión de rata en fase unicelular un primer agente nucleasa que se dirige a una primera secuencia diana próxima al codón de inicio del locus genómico *Cfh* endógeno, en donde el agente nucleasa escinde la primera secuencia diana para producir un embrión de rata en fase unicelular modificado genéticamente que comprende el locus *Cfh* endógeno inactivado; y

15 (b) gestar el embrión de rata en fase unicelular modificado genéticamente en una madre subrogada, en donde la madre subrogada produce una progenie F0 de rata modificada genéticamente que comprende el locus *Cfh* endógeno inactivado.

20 23. Una célula de rata modificada genéticamente que comprende un locus *Cfh* endógeno inactivado, en donde la célula de rata es homocigota para el locus *Cfh* endógeno inactivado.

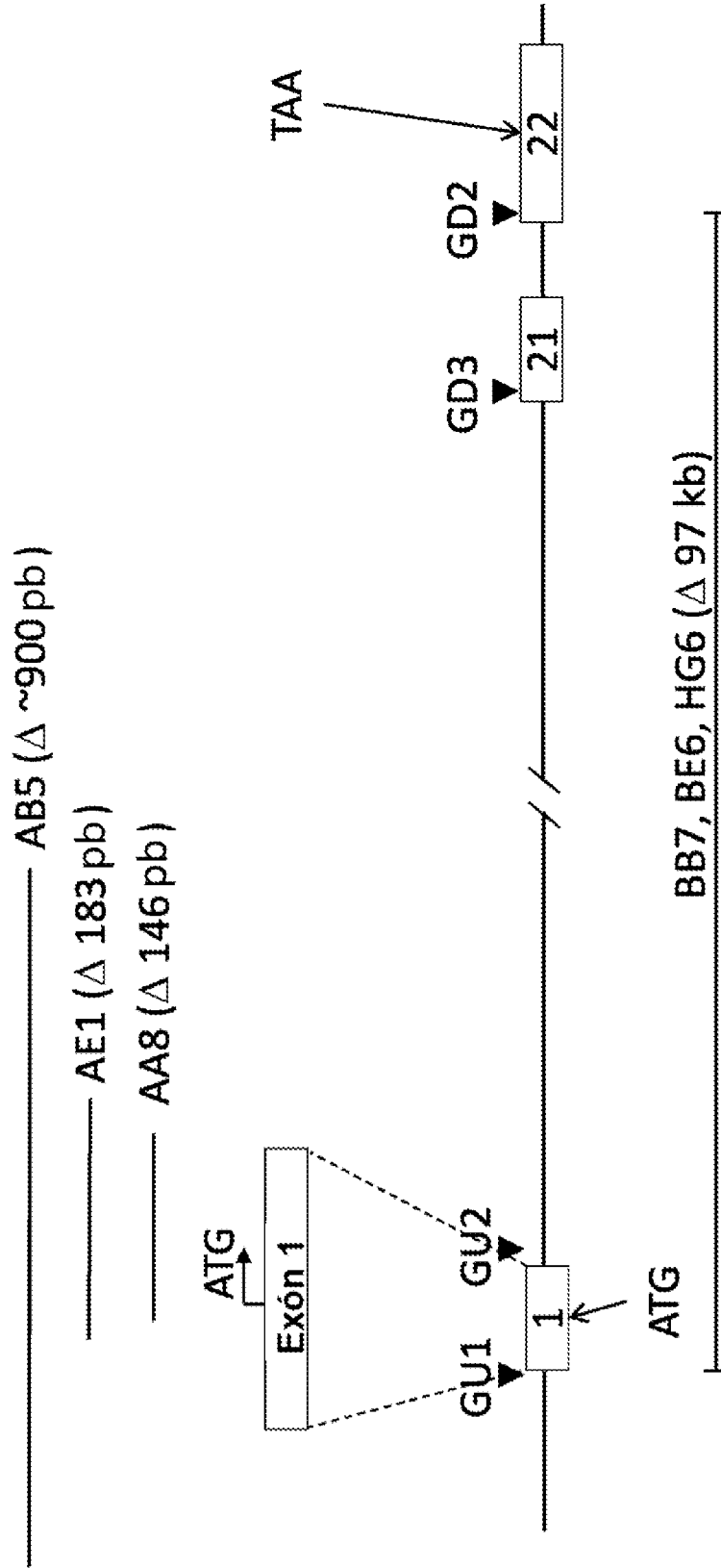


FIG. 1A

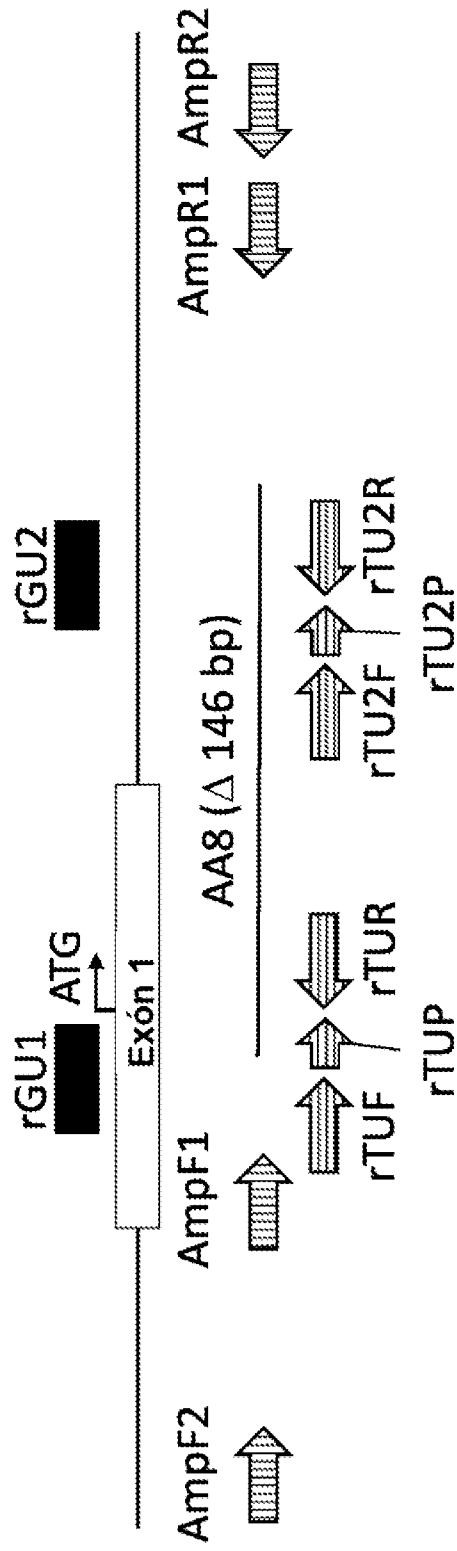


FIG. 1B

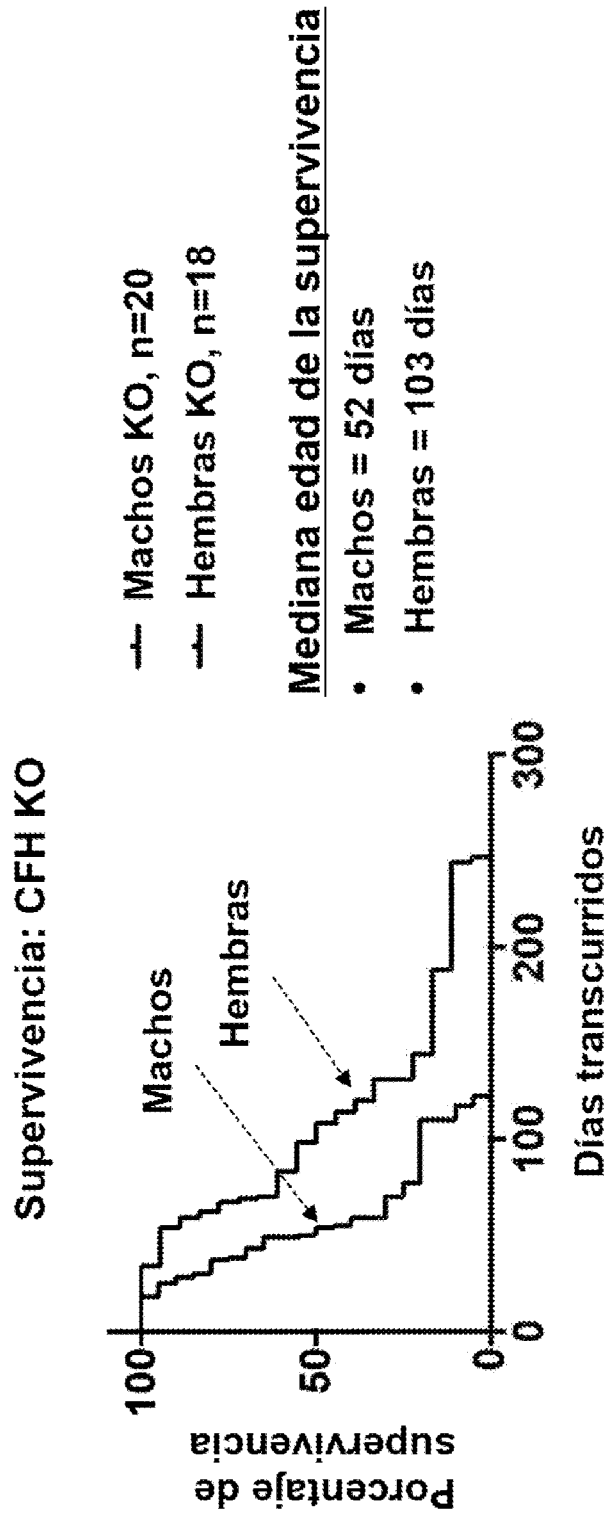


FIG. 2

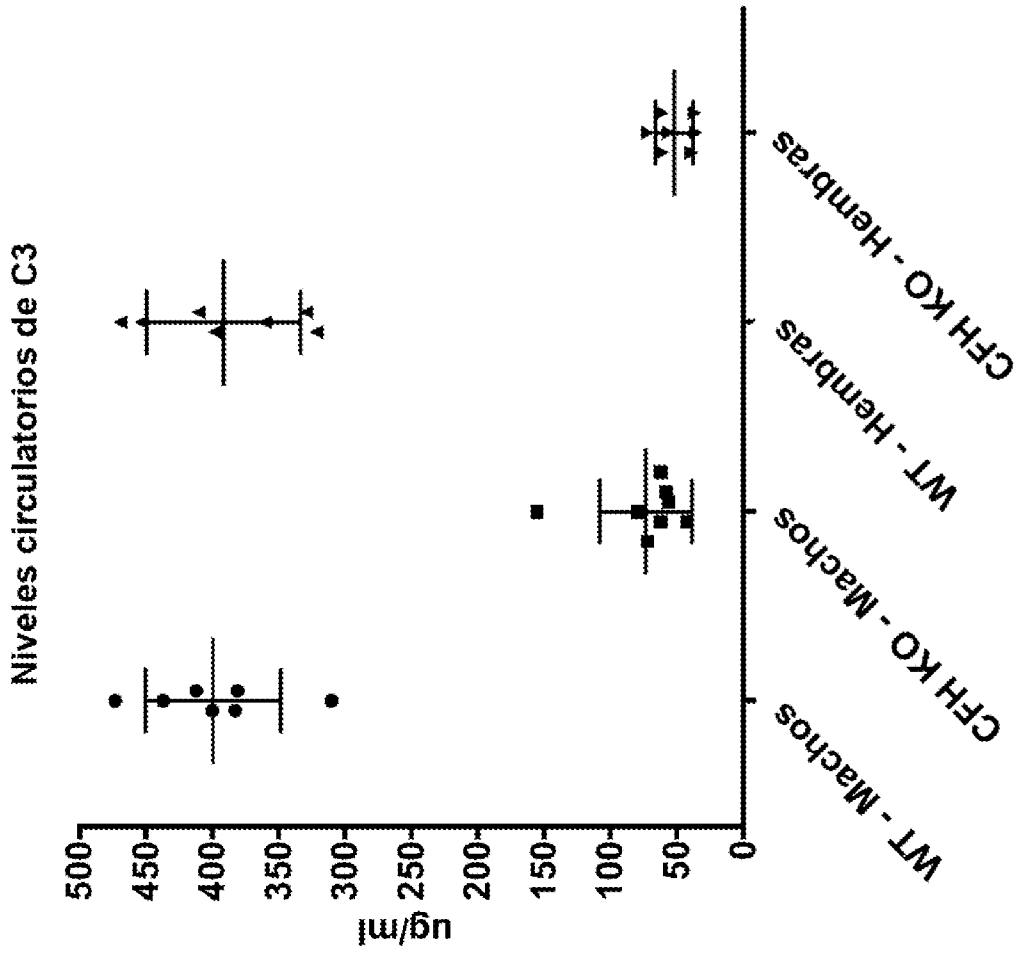


FIG. 3

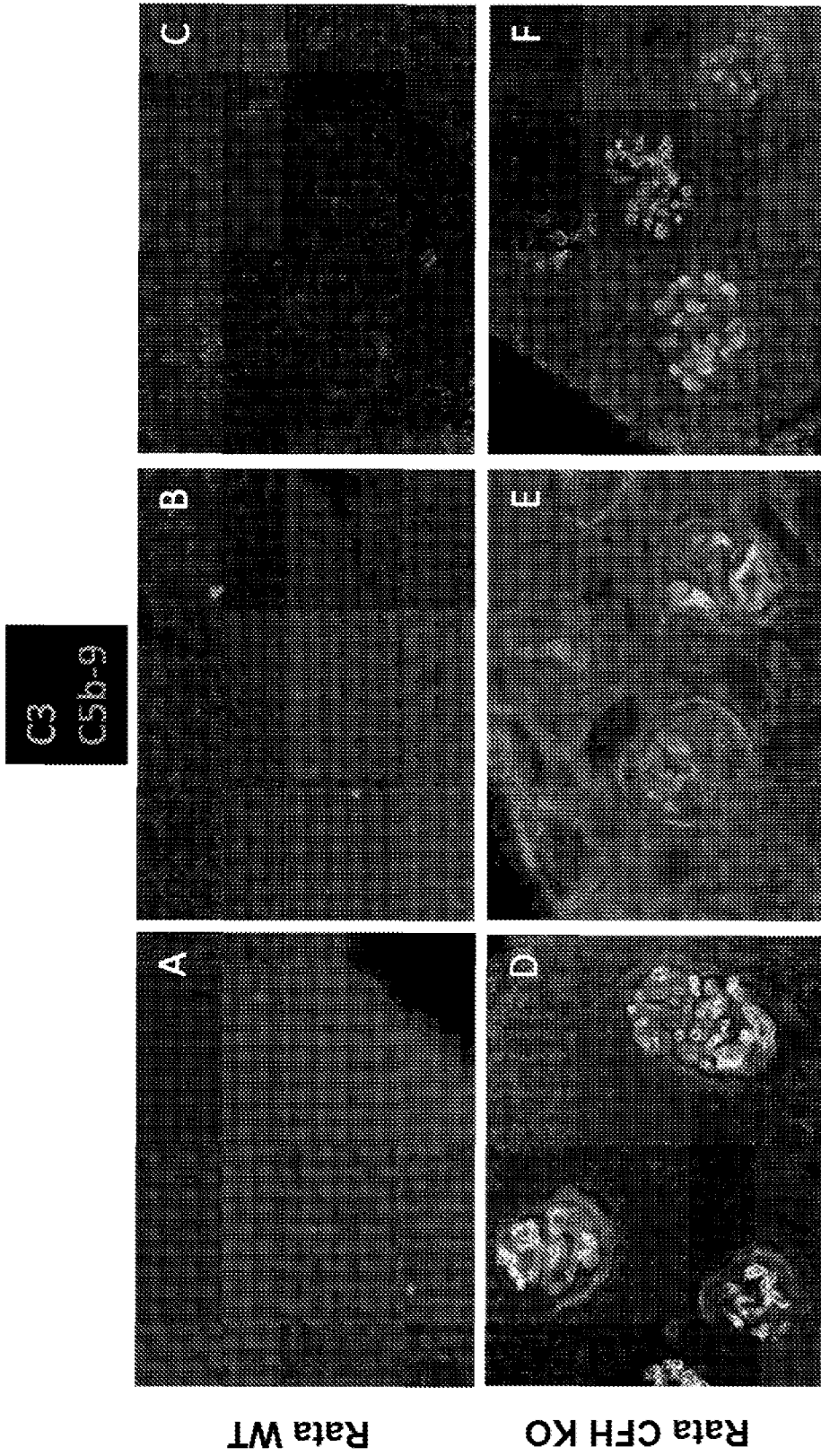


FIG. 4

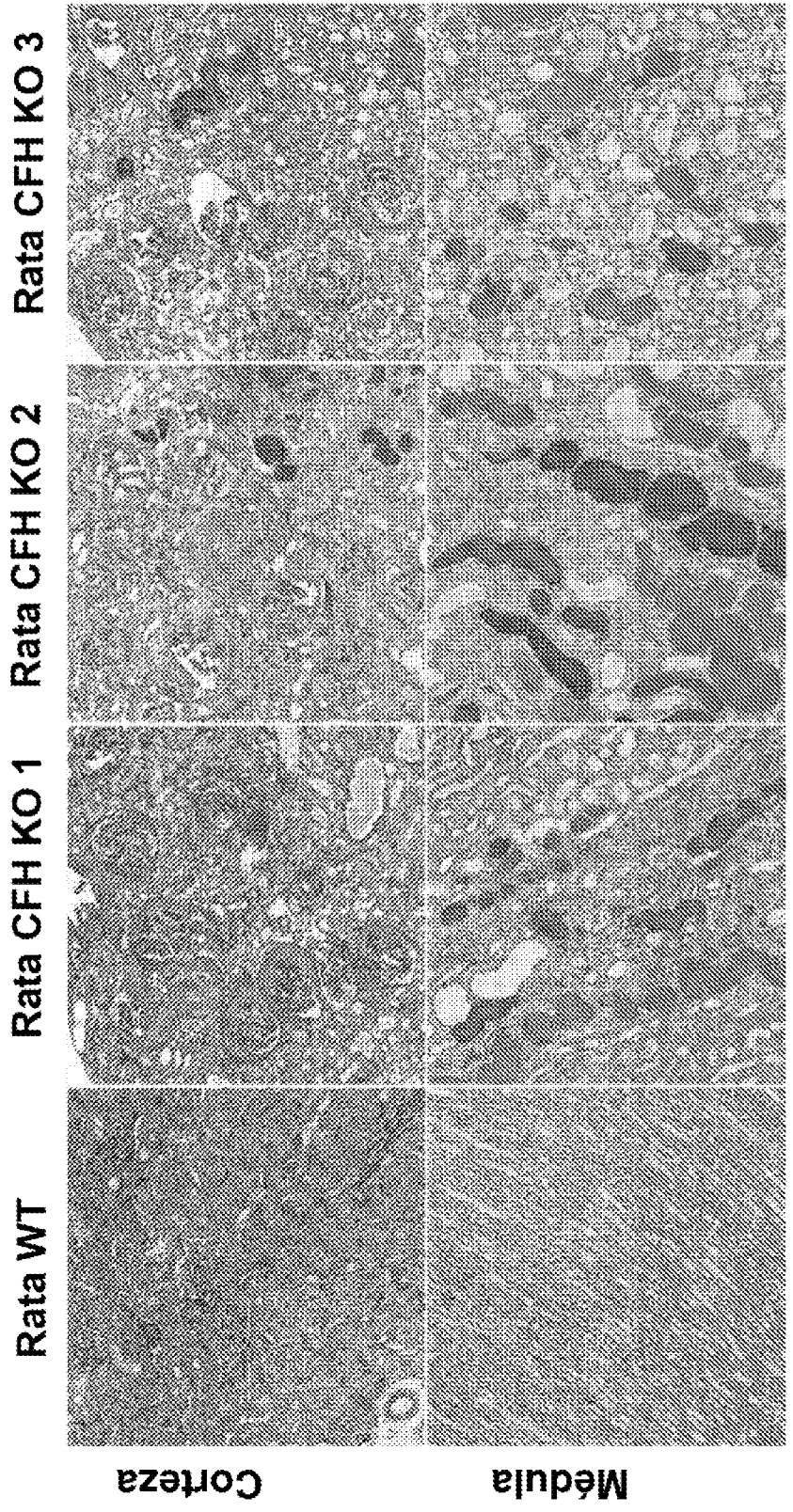


FIG. 5

FIG. 6A

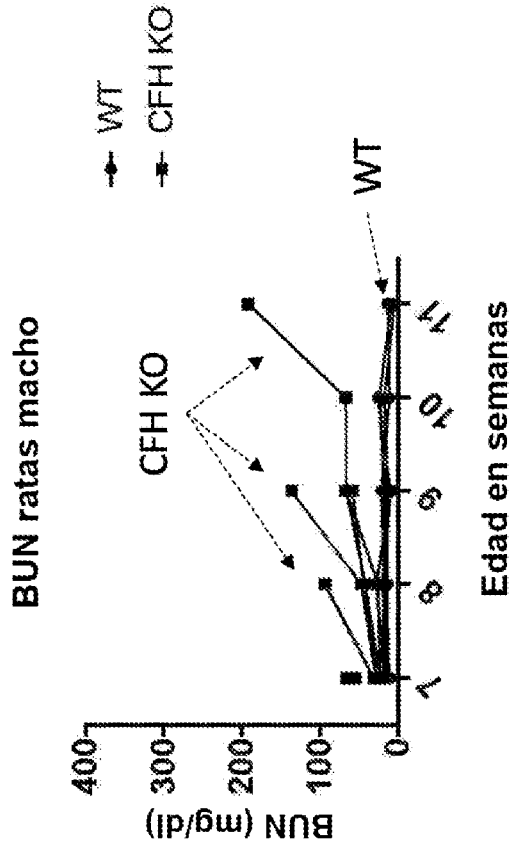
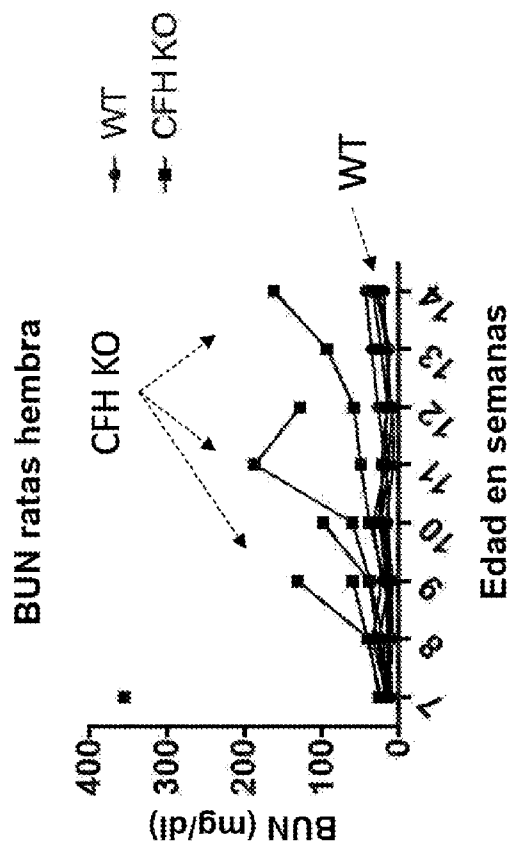


FIG. 6B



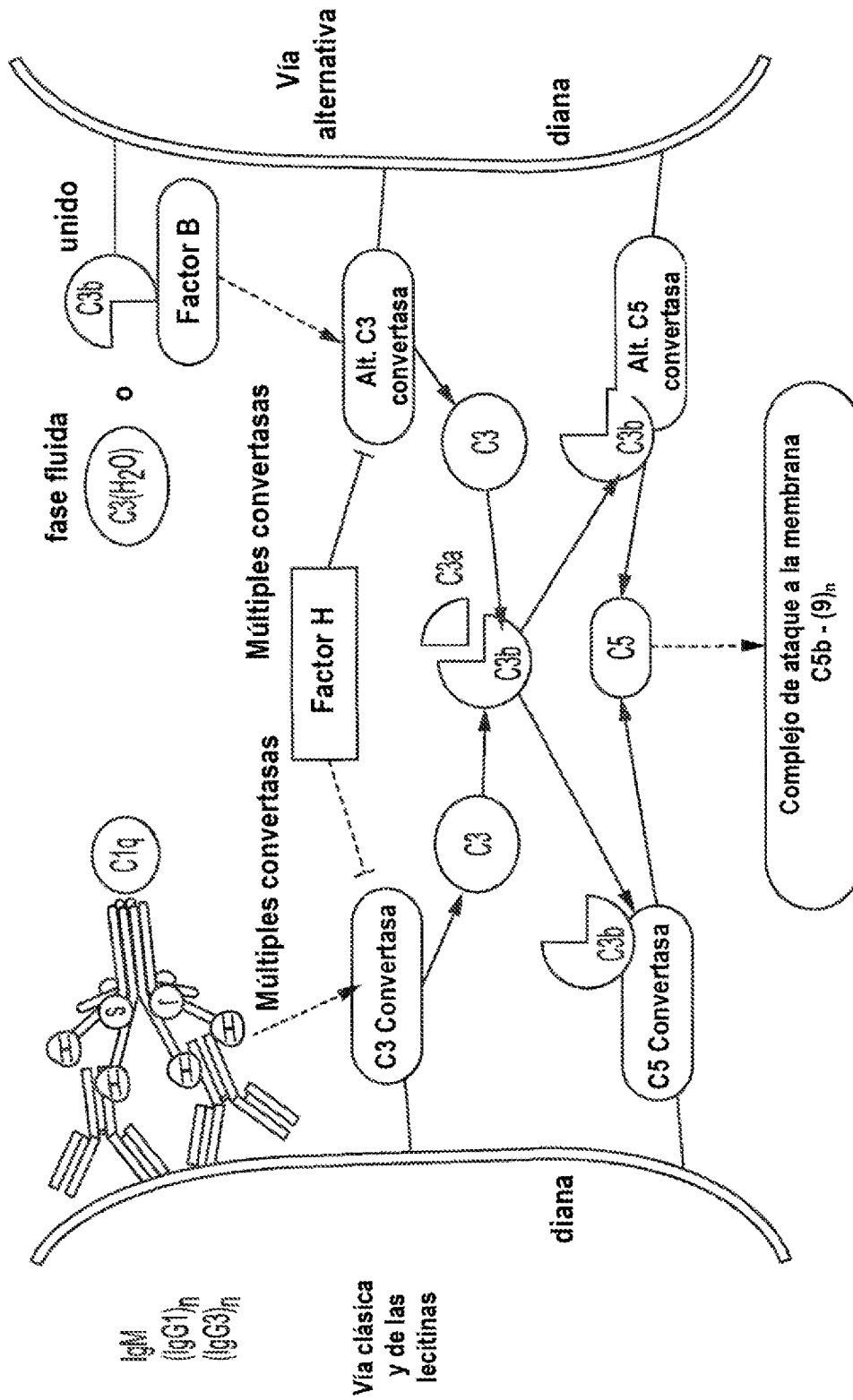
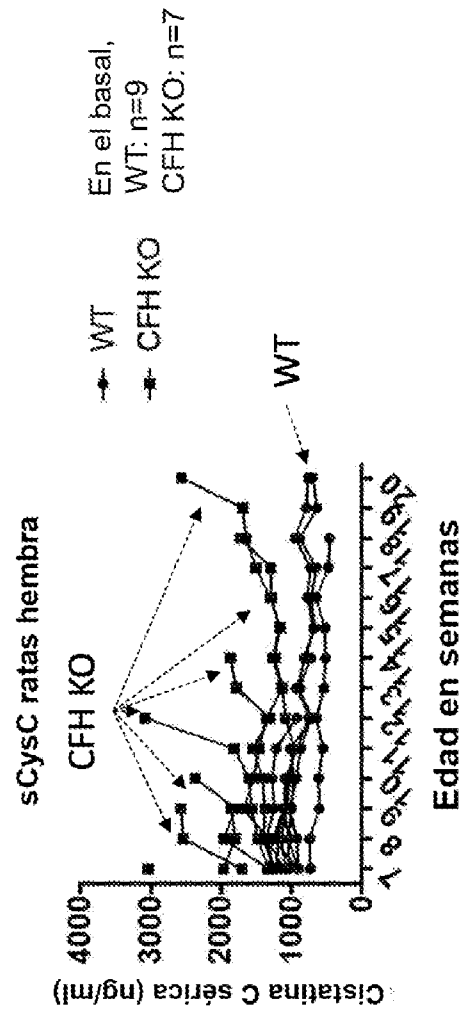
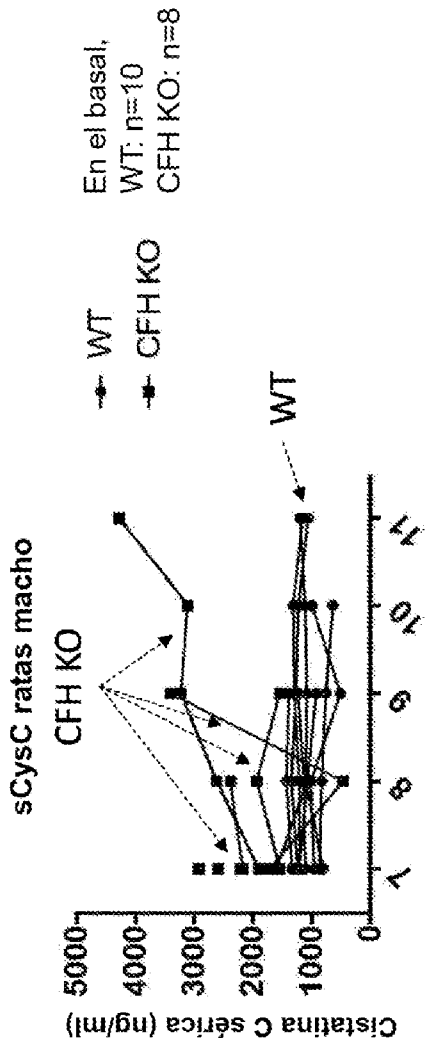


FIG 7



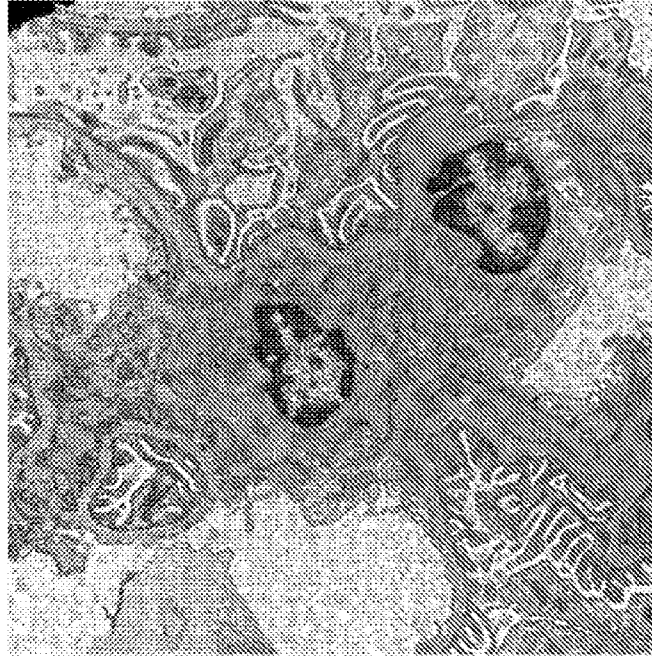


FIG. 10B

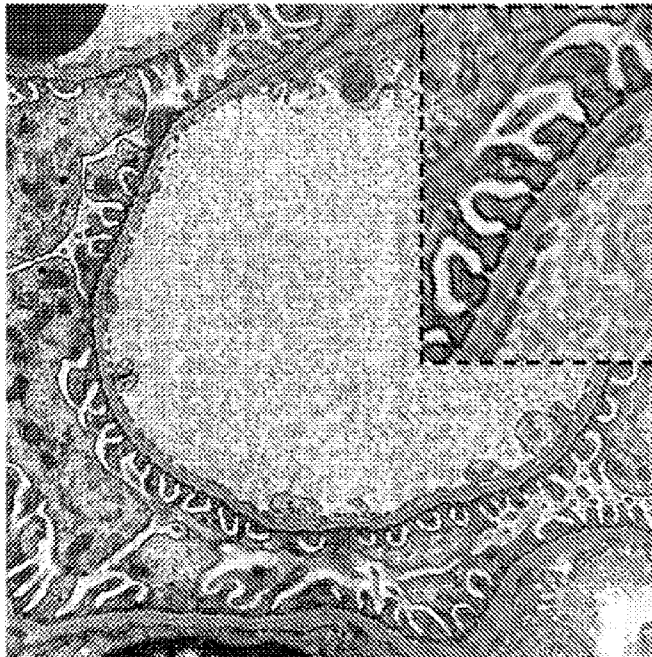


FIG. 10A



FIG. 11B

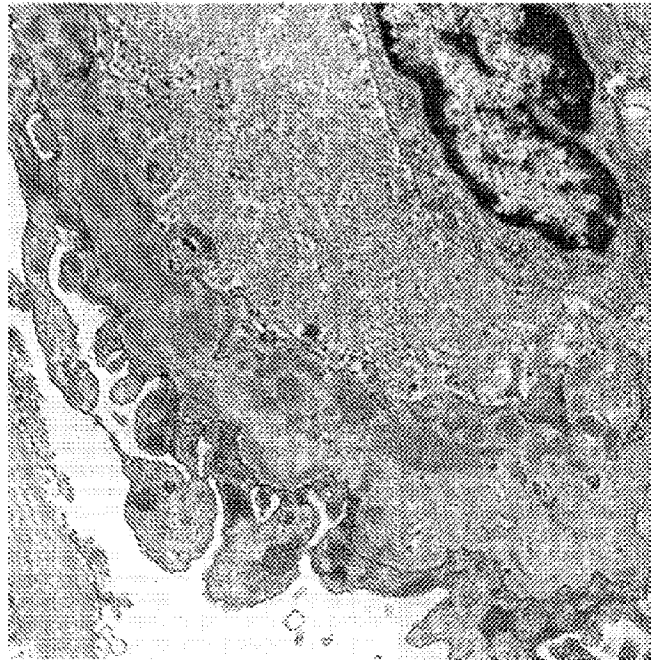


FIG. 11A

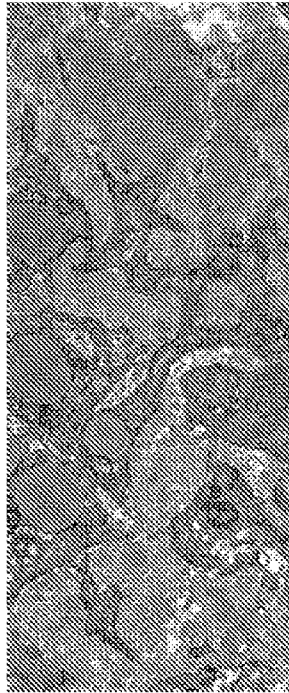


FIG. 12B

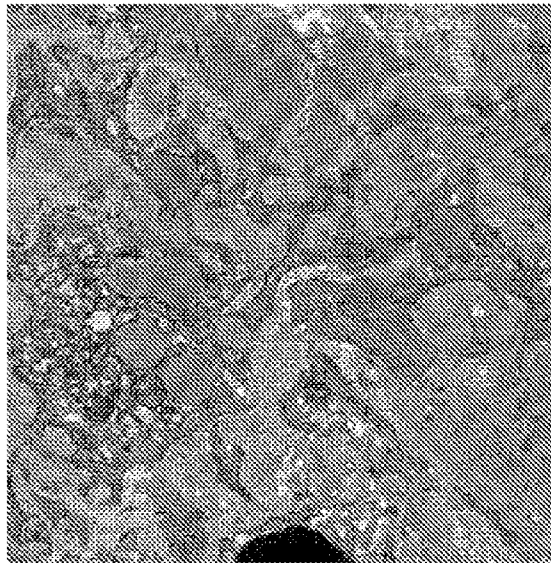


FIG. 12A