

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 953 875**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2018 PCT/US2018/019721**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.08.2018 WO18157058**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2018 E 18710956 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2023 EP 3585158**

54 Título: **Modelos de retinosquiasis en roedor**

30 Prioridad:

27.02.2017 US 201762463872 P
24.10.2017 US 201762576256 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.11.2023

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591-6707, US

72 Inventor/es:

BRYDGES, SUSANNAH;
TANG, YAJUN;
LIU, YANG;
CAO, JINGTAI y
ROMANO, CARMELO

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

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

ES 2 953 875 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

Modelos de retinosquiasis en roedor

5 Referencia cruzada a las solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 62/463,872, presentada el 27 de febrero de 2017 y la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 62/576,256, presentada el 24 de octubre de 2017.

10 Antecedentes

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente 180 millones de personas en todo el mundo tienen discapacidad visual, de los cuales casi 6 millones dan cuenta de todas las causas de la ceguera infantil (Blindness: Vision 2020, The Global Initiative for the Elimination of Avoidable Blindness, ficha técnica núm. 213, Organización Mundial de la Salud, revisado en 2000). La retinosquiasis juvenil ligada al cromosoma X (XLRS), causada por mutaciones en el gen Retinosquiasina-1 (*Rs1*), es una degeneración macular de inicio temprano en niños varones caracterizada por la división de las capas internas de la retina, lo que resulta en una pérdida grave de la visión. Las opciones de tratamiento actuales se limitan a servicios y accesorios para corregir la visión deficiente tales como dispositivos ópticos (por ejemplo, lente de aumento), no ópticos (por ejemplo, iluminación de tareas, soportes de lectura, etc.) y electrónicos.

20

Resumen

La presente descripción abarca el reconocimiento de que es conveniente modificar genéticamente roedores para proporcionar sistemas *in vivo* mejorados para identificar y desarrollar nuevos agentes terapéuticos y, en algunas modalidades, regímenes terapéuticos, que pueden usarse para el tratamiento y/o prevención de la retinosquiasis (por ejemplo, la retinosquiasis ligada al cromosoma X). En consecuencia, la presente invención proporciona un roedor modificado genéticamente cuyo genoma comprende una mutación en el exón 3 o el exón 5 de un gen *Rs1* endógeno de roedor, en donde:

25

- la mutación en el exón 3 codifica una sustitución de aminoácidos C59S en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor, y la mutación en el exón 5 codifica una sustitución de aminoácidos R141C en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor;
- 30 - el roedor es un ratón o una rata; y
- el roedor muestra uno o más síntomas de retinosquiasis cuando el roedor es un roedor hembra homocigótico para la mutación, o cuando el roedor es un roedor macho hemocigótico para la mutación.

35

En algunas modalidades, los sistemas *in vivo* descritos en la presente descripción pueden usarse para identificar y desarrollar nuevos agentes terapéuticos para tratar enfermedades, trastornos y/o afecciones relacionados con los ojos. En algunas modalidades, los sistemas *in vivo* proporcionados también pueden usarse para identificar y desarrollar nuevos agentes terapéuticos para tratar enfermedades, trastornos y/o afecciones asociadas con la pérdida de la visión. También se describen roedores, en algunos casos, que comprenden una interrupción en un gen *Rs1* y/o gen *Rs1* silenciado funcionalmente de cualquier otra manera, de manera que un polipéptido *RS1* del huésped no se expresa o produce, y son convenientes, por ejemplo, para su uso en la identificación y desarrollo de agentes terapéuticos que restauran y/o mejoran la estructura y/o función retiniana. Se proporcionan roedores que comprenden un gen *Rs1* modificado genéticamente, variante o mutante de manera que se produce una variante o mutante de polipéptido *RS1* a partir del gen *Rs1* modificado genéticamente, variante o mutante, y son convenientes, por ejemplo, para su uso en la identificación y desarrollo de agentes terapéuticos que restauran y/o mejoran la estructura y/o

40

función retiniana. En algunas modalidades, los roedores descritos en la presente descripción proporcionan sistemas (o modelos) *in vivo* mejorados para la retinosquiasis. En algunas modalidades, los roedores descritos en la presente descripción proporcionan sistemas (o modelos) *in vivo* mejorados para enfermedades, trastornos y/o afecciones relacionadas con los ojos.

- 5 Los roedores proporcionados son convenientes para su uso como modelos animales para la retinosquiasis. Los roedores proporcionados se caracterizan por una o más mutaciones puntuales en una secuencia codificante en un gen *Rs1*. En algunas modalidades, una mutación en un gen *Rs1* afecta una o más retinas de un roedor que comprende la mutación. En algunas modalidades, una mutación en un gen *Rs1* de un roedor, como se describe en la presente descripción, resulta en la formación, desarrollo o aparición de uno o más de los siguientes fenotipos en el roedor:
- 10 Fenotipo similar a la retinosquiasis (por ejemplo, división de las capas retinianas internas, degeneración retiniana y disminución de la agudeza visual); esquiasis de la mácula o retina; deterioro de la agudeza visual; fibrosis retiniana; y pigmentación retiniana; y, en determinadas modalidades, los fenotipos incluyen el desarrollo de estructuras quísticas dentro de la retina interna y reducción de las respuestas de la onda b y a del ERG en comparación con el roedor de tipo salvaje, seguido de una pérdida de células fotorreceptoras. En algunas modalidades, una mutación en un gen *Rs1* de un roedor, como se describe en la presente descripción, resulta en fenotipos funcionales y morfológicos de inicio temprano (por ejemplo, en o para el día 15, 18, 21, 24 o 27 posnatal) de la retina en el roedor. En algunas modalidades, los defectos funcionales de inicio temprano de la retina pueden reflejarse por (i) reducción de la onda b con relación a la onda a (que resulta en un ERG negativo) en análisis de ERG adaptados a la luz y adaptados a la oscuridad; (ii) disminución de los valores de respuesta máxima y sensibilidad de las ondas b del ERG; (iii) disminución de los valores de respuesta máxima de las ondas a del ERG; o (iv) una combinación de (i)-(iii), en comparación con los roedores de tipo salvaje. En algunas modalidades, los defectos morfológicos de inicio temprano de la retina pueden reflejarse por esquiasis, una zona elipsoide (EZ) más amplia, una retina externa más delgada o una de sus combinaciones, en comparación con los roedores de tipo salvaje.
- 25 También se describe una interrupción (por ejemplo, una delección) en un gen *Rs1* de roedor que resulta de una inserción de una secuencia de ácido nucleico en un gen *Rs1* endógeno en un locus *Rs1* endógeno que, en algunos casos determinados, comprende un gen indicador. En algunos casos, una interrupción es o comprende una delección, en la totalidad o en parte, de un gen *Rs1* endógeno que elimina la expresión o producción del producto génico (por ejemplo, ARNm o polipéptido). En algunas modalidades, una mutación (por ejemplo, una mutación puntual) en un gen *Rs1* de roedor resulta de una inserción de una secuencia de ácido nucleico en un gen *Rs1* endógeno en un locus *Rs1* endógeno que, en algunas modalidades determinadas, comprende un exón sintético (por ejemplo, un exón sintético que comprende una mutación puntual). En algunas modalidades, una mutación es o comprende una o más mutaciones puntuales en un gen *Rs1* que resulta en la expresión de una variante de polipéptido RS1 que tiene una función reducida o alterada en comparación con un polipéptido RS1 de tipo salvaje; en algunas modalidades determinadas, el nivel de una variante de polipéptido RS1 en un roedor es menor que el nivel de un polipéptido RS1 de tipo salvaje en un roedor de tipo salvaje. En algunas modalidades, una variante de polipéptido RS1, como se describe en la presente descripción, incluye una o más sustituciones de aminoácidos en comparación con un polipéptido RS1 de tipo salvaje. En particular, el roedor comprende una mutación en el exón 3 o el exón 5 de un gen *Rs1* endógeno de roedor, en donde la mutación en el exón 3 codifica una sustitución de aminoácidos C59S en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor y la mutación en el exón 5 codifica una sustitución de aminoácidos R141C en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor.
- 35 En algunos casos, un gen *Rs1* modificado genéticamente es o comprende un gen *Rs1* heterólogo (por ejemplo, un gen *Rs1* humano). En algunos casos, un gen *Rs1* modificado genéticamente incluye material genético que codifica un polipéptido RS1 heterólogo, en su totalidad o en parte. En algunos casos, un gen *Rs1* modificado genéticamente
- 40

incluye material genético que codifica un dominio discoidina de un polipéptido heterólogo, cuyo dominio discoidina contiene una sustitución de aminoácidos en comparación con un polipéptido RS1 heterólogo de tipo salvaje u original. En algunas modalidades, un gen *Rs1* modificado genéticamente incluye una o más mutaciones en comparación con un gen *Rs1* de tipo salvaje u original (por ejemplo, endógeno u homólogo) que resulta en la expresión de una variante de polipéptido RS1. En algunas modalidades, un gen *Rs1* modificado genéticamente incluye material genético que codifica un dominio discoidina de un polipéptido RS1 de roedor, cuyo dominio discoidina contiene una sustitución de aminoácidos en comparación con un polipéptido RS1 de roedor de tipo salvaje u original. En algunos casos, un gen *Rs1* modificado genéticamente incluye material genético que codifica un dominio discoidina de un polipéptido RS1 heterólogo, cuyo dominio discoidina contiene una sustitución de aminoácidos en comparación con un polipéptido RS1 heterólogo de tipo salvaje u original; por ejemplo, un gen *Rs1* modificado genéticamente incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio discoidina de un polipéptido RS1 humano, cuyo dominio discoidina contiene una sustitución de aminoácidos en comparación con un polipéptido RS1 humano de tipo salvaje. En algunas modalidades, un dominio discoidina de un polipéptido RS1 codificado por un gen *Rs1* modificado genéticamente, como se describe en la presente descripción, incluye una o más sustituciones de aminoácidos en comparación con un polipéptido RS1 de tipo salvaje u original. Por tanto, en algunas modalidades, un gen *Rs1* de roedor modificado genéticamente, como se describe en la presente descripción, codifica un polipéptido RS1 caracterizado por un dominio discoidina que incluye una sustitución de aminoácidos (por ejemplo, una variante de polipéptido RS1).

También se describe un roedor que comprende en su genoma una delección, en la totalidad o en parte, de la secuencia codificante de un gen *Rs1* endógeno en un locus *Rs1* endógeno. En algunos casos, una delección resulta en la falta de un polipéptido RS1 funcional producido a partir de un locus *Rs1*. En algunos casos, una delección es de al menos los exones 2-3. En algunos casos determinados, una delección es de al menos una porción del exón 1 y los exones 2-3. En algunos casos, una delección es o comprende los nucleótidos de un gen *Rs1* endógeno que abarca desde inmediatamente 3' del codón de inicio (ATG) hasta los últimos seis nucleótidos del exón tres, inclusive. En algunos casos, un locus *Rs1* que comprende una delección comprende además un gen indicador. En algunos casos, un gen indicador se une operativamente a un promotor de *Rs1*. En algunos casos, un promotor de *Rs1* es un promotor de *Rs1* endógeno (por ejemplo, el promotor de *Rs1* endógeno en el locus *Rs1* que comprende una delección). En algunos casos, un promotor de *Rs1* es un promotor de *Rs1* heterólogo.

También se describe un locus *Rs1* que carece (o incluye una delección) de una porción del exón 1 y los exones 2-3, por ejemplo, carece de los nucleótidos desde inmediatamente 3' del codón de inicio (ATG), a través del exón 2, hasta los últimos seis nucleótidos del exón 3, y comprende una secuencia codificante del gen indicador que se fusiona en marco al codón de inicio (ATG) del locus *Rs1*. En algunas modalidades determinadas, una secuencia codificante del gen indicador (por ejemplo, la secuencia codificante de un gen *lacZ*) se une operativamente a (o está bajo el control transcripcional de) un promotor de *Rs1* endógeno en el locus *Rs1*.

En algunas modalidades, un gen indicador es un gen *lacZ*. En algunas modalidades, un indicador se selecciona del grupo que consiste en luciferasa, proteína verde fluorescente (GFP), GFP potenciada (eGFP), proteína cian fluorescente (CFP), proteína amarilla fluorescente (YFP), proteína amarilla fluorescente potenciada (eYFP), proteína azul fluorescente (BFP), proteína azul fluorescente potenciada (eBFP), DsRed y MmGFP. En algunas modalidades, el patrón de expresión de un gen indicador se asemeja al patrón de expresión de un gen *Rs1* (por ejemplo, un gen *Rs1* de tipo salvaje en un locus *Rs1*). En algunas modalidades, la expresión de un gen indicador se asemeja al patrón de expresión de un polipéptido RS1 de tipo salvaje u original.

El roedor proporcionado es uno cuyo genoma comprende un gen *Rs1* modificado genéticamente, cuyo gen *Rs1* modificado genéticamente comprende una o más mutaciones puntuales en un exón y codifica un polipéptido RS1 que tiene una o más sustituciones de aminoácidos en comparación con un polipéptido RS1 de tipo salvaje. Un polipéptido

RS1 que tiene una o más sustituciones de aminoácidos en comparación con un polipéptido RS1 de tipo salvaje también se denomina en la presente descripción como una variante o mutante de polipéptido RS1.

En algunas modalidades, las sustituciones de aminoácidos descritas en la presente descripción resultan en la eliminación o reducción significativa del nivel del polipéptido RS1 funcional producido en un roedor debido a, por ejemplo, el plegado incorrecto de proteínas que puede resultar en la agregación de la variante de polipéptido RS1 (o mutante) localizado en el retículo endoplasmático de un roedor como se describe en la presente descripción, el ensamblaje defectuoso de la subunidad unida por enlaces disulfuro, e incapacidad del polipéptido RS1 para insertarse en la membrana del ER como parte del proceso de secreción de proteínas. El roedor modificado genéticamente proporcionado, es un roedor cuyo genoma comprende una mutación en el exón 3 o el exón 5 de un gen *Rs1* endógeno de roedor, en donde:

- la mutación en el exón 3 codifica una sustitución de aminoácidos C59S en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor, y la mutación en el exón 5 codifica una sustitución de aminoácidos R141C en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor;
- el roedor es un ratón o una rata; y
- el roedor muestra uno o más síntomas de retinosquiasis cuando el roedor es un roedor hembra homocigótico para la mutación, o cuando el roedor es un roedor macho hemicigótico para la mutación.

En algunas modalidades, una variante de polipéptido RS1 también incluye una sustitución de aminoácidos en la secuencia señal, por ejemplo, una sustitución de un residuo hidrófobo con prolina o con un residuo hidrófilo o cargado. En algunas modalidades, una variante de polipéptido RS1 incluye una sustitución de aminoácidos en las regiones que flanquean el dominio discoidina, es decir, en la región RS1 y el segmento C terminal de un polipéptido RS1. En particular en algunas modalidades, una variante de polipéptido RS1 incluye una sustitución de C59S. En algunas modalidades, una variante de polipéptido RS1 puede incluir además una sustitución de una cisteína en una posición seleccionada del grupo que consiste en 38, 40 y 223.

En algunas modalidades, una variante de polipéptido RS1 incluye una sustitución de aminoácidos en el dominio discoidina, en donde la variante de polipéptido RS1 incluye una sustitución de un residuo que no es cisteína, en el dominio discoidina, con cisteína. En particular en modalidades específicas, la sustitución es una sustitución R141C. En algunas modalidades, una variante de polipéptido RS1 puede incluir además una sustitución de una cisteína en una posición seleccionada del grupo que consiste en 63, 83, 110, 142 y 219, con un residuo que no es cisteína. En algunas modalidades, una variante de polipéptido RS1 incluye una sustitución en el dominio discoidina de un residuo cargado con un residuo sin carga, un residuo sin carga con un residuo cargado, o un residuo cargado con un residuo de carga inversa. En otras modalidades, una variante de polipéptido RS1 incluye una sustitución en el dominio discoidina mediante la inserción o eliminación de prolina (es decir, reemplazar un residuo de prolina con otro residuo, o viceversa). En aún otras modalidades, una variante de polipéptido RS1 incluye una sustitución en el dominio discoidina mediante la inserción o eliminación de un residuo polar (es decir, reemplazar un residuo polar con un residuo no polar, o viceversa).

En algunas modalidades, se proporciona un roedor que expresa un polipéptido RS1 que incluye una sustitución de aminoácidos que es una sustitución C59S o R141C. En algunas modalidades, un gen *Rs1* modificado genéticamente comprende una mutación puntual en el exón tres y codifica un polipéptido RS1 que tiene una sustitución C59S; en algunas modalidades determinadas, una mutación puntual en el exón tres es o comprende un cambio de codones de TGT a AGT. En algunas modalidades, un gen *Rs1* modificado genéticamente comprende una mutación puntual en el exón cinco y codifica un polipéptido RS1 que tiene una sustitución R141C; en algunas modalidades determinadas, una mutación puntual en el exón cinco es o comprende un cambio de codones de CGC a TGC.

En algunas modalidades, un roedor descrito en la presente descripción es un animal macho. También se entiende que un animal macho que comprende una interrupción o mutación en un gen *Rs1* en un locus *Rs1* endógeno en el

cromosoma X es hemicigótico para la interrupción o mutación.

En algunas modalidades, un roedor proporcionado es un animal hembra. En algunas modalidades, un roedor hembra es homocigótico o heterocigótico para una delección en un gen *Rs1* en un locus *Rs1* endógeno como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, un roedor hembra es homocigótico o heterocigótico para un gen *Rs1* modificado genéticamente (o mutante), como se describe en la presente descripción, que está en un locus *Rs1* endógeno.

En algunas modalidades, un gen *Rs1* modificado genéticamente comprende además uno o más marcadores de selección. En algunas modalidades, un gen *Rs1* modificado genéticamente comprende además uno o más sitios de reconocimiento de la recombinasa específica de sitio. En algunas modalidades, un gen *Rs1* modificado genéticamente comprende además un gen de recombinasa y un marcador de selección flanqueado por el uno o más sitios de reconocimiento de la recombinasa específica de sitio, cuyos sitios de reconocimiento de la recombinasa específica de sitio se orientan para dirigir una escisión.

En algunas modalidades, uno o más sitios de reconocimiento de la recombinasa específica de sitio incluyen *loxP*, *lox511*, *lox2272*, *lox2372*, *lox66*, *lox71*, *loxM2*, *lox5171*, FRT, FRT11, FRT71, attp, att, FRT, Dre, rox, o una de sus combinaciones. En algunas modalidades, un gen de recombinasa se selecciona del grupo que consiste en Cre, Flp (por ejemplo, Flpe, Flpo) y Dre. En algunas modalidades determinadas, uno o más sitios de reconocimiento de la recombinasa específica de sitio, son sitios *lox* (por ejemplo, *loxP*), y un gen de recombinasa codifica una recombinasa Cre.

En algunas modalidades, un gen de recombinasa se une operativamente a un promotor que dirige la expresión del gen de recombinasa en células diferenciadas y no dirige la expresión del gen de recombinasa en células indiferenciadas. En algunas modalidades, un gen de recombinasa se une operativamente a un promotor que es transcripcionalmente competente y regulado por el desarrollo.

En algunas modalidades de un gen de recombinasa unido operativamente a un promotor, el promotor se selecciona del grupo que consiste en protamina (Prot; por ejemplo, Prot1 o Prot5), Blimp1, Blimp1 (fragmento de 1 kb), Blimp1 (fragmento de 2 kb), Gata6, Gata4, Igf2, Lhx2, Lhx5 y Pax3. En algunas modalidades de un gen de recombinasa unido operativamente a un promotor, el promotor es o comprende la SEQ ID NO:30, la SEQ ID NO:31 o la SEQ ID NO:32. En algunas modalidades de un gen de recombinasa unido operativamente a un promotor, el promotor es o comprende la SEQ ID NO: 30.

En algunas modalidades, se selecciona un marcador de selección del grupo que consiste en neomicina fosfotransferasa (*neo^R*), higromicina B fosfotransferasa (*hyg^R*), puromicina N-acetiltransferasa (*puro^R*), blastidina S desaminasa (*bsr^R*), xantina/guanina fosforribosiltransferasa (*gpt*) y timidina cinasa del virus del herpes simple (HSV-tk). En algunas modalidades, un marcador de selección está bajo el control transcripcional de un promotor seleccionado del grupo que consiste en un promotor de UbC, un promotor de Ubi, un promotor de hCMV, un promotor de mCMV, un promotor CAGGS, un promotor de EF1, un promotor de pgkl, un promotor de beta actina y un promotor de ROSA26. En algunas modalidades determinadas, un marcador de selección es *neo^R* o *hyg^R* y está bajo el control transcripcional de un promotor de Ubi.

El roedor proporcionado desarrolla uno o más signos, síntomas y/o afecciones de (o asociados con) retinosquisis cuando el roedor es un roedor hembra homocigótico para la mutación, o cuando el roedor es un roedor macho hemicigótico para la mutación.

También se proporciona una célula o tejido aislado de roedor cuyo genoma comprende una mutación en el exón 3 o el exón 5

de un gen *Rs1* endógeno de roedor, en donde:

- la mutación en el exón 3 codifica una sustitución de aminoácidos C59S en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor,

y la mutación en el exón 5 codifica una sustitución de aminoácidos R141C en el polipéptido Rs1 endógeno de roedor;

- la célula o tejido de roedor es una célula o tejido de ratón, o una célula o tejido de rata; y
- un roedor cuyo genoma comprende dicha mutación muestra uno o más síntomas de retinosquiasis cuando el roedor es un roedor hembra homocigótico para la mutación, o cuando el roedor es un roedor macho hemicigótico para la mutación.

En algunas modalidades, una célula es un linfocito. En algunas modalidades, una célula se selecciona de un linfocito B, una célula dendrítica, un macrófago, un monocito y un linfocito T. En algunas modalidades, una célula se deriva de o se relaciona con un tipo de célula del ojo o la retina. En algunas modalidades determinadas, una célula es una célula ganglionar del ojo, célula bipolar, célula amacrina, célula horizontal, cono, bastón o célula del epitelio pigmentario de la retina. En algunas modalidades, un tejido se selecciona de tejido adiposo, vejiga, cerebro, mama, médula ósea, ojo, corazón, intestino, riñón, hígado, pulmón, ganglio linfático, músculo, páncreas, plasma, suero, piel, bazo, estómago, timo, testículo, ovario y una de sus combinaciones. En algunas modalidades determinadas, el tejido ocular se selecciona de la esclerótica, la coroides o la retina.

En algunas modalidades, se proporciona una célula inmortalizada hecha, generada, producida u obtenida a partir de una célula o tejido aislado de roedor como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, se proporciona una célula madre embrionaria (ES) de roedor, cuyo genoma comprende una mutación en el exón 3 o el exón 5 de un gen *Rs1* endógeno de roedor, en donde:

- la mutación en el exón 3 codifica una sustitución de aminoácidos C59S en el polipéptido Rs1 endógeno de roedor, y la mutación en el exón 5 codifica una sustitución de aminoácidos R141C en el polipéptido Rs1 endógeno de roedor;

- la célula ES de roedor es una célula ES de ratón o una célula ES de rata; y
- un roedor cuyo genoma comprende dicha mutación muestra uno o más síntomas de retinosquiasis cuando el roedor es un roedor hembra homocigótico para la mutación, o cuando el roedor es un roedor macho hemicigótico para la mutación. En algunas modalidades determinadas, una célula madre embrionaria de roedor es una célula madre embrionaria de ratón y es de una cepa 129, una cepa C57BL o una mezcla de las mismas. En algunas modalidades determinadas, una célula madre embrionaria de roedor es una célula madre embrionaria de ratón y es una mezcla de las cepas 129 y C57BL. En algunas modalidades determinadas, una célula madre embrionaria de roedor es una célula madre embrionaria de ratón y es de una cepa C57BL cuyo genoma carece de una mutación *Crb1^{rd8}* (es decir, cuyo genoma comprende un gen *Crbs1* de tipo salvaje). En algunas modalidades, una célula ES no humana, como se describe en la presente descripción, comprende una cualquiera de la SEQ ID NO:23, la SEQ ID NO:26 y la SEQ ID NO:28. En algunas modalidades, una célula ES no humana, como se describe en la presente descripción, comprende una cualquiera de la SEQ ID NO:33, la SEQ ID NO:34, la SEQ ID NO:36, la SEQ ID NO:37, la SEQ ID NO:39 y la SEQ ID NO:40.

En algunas modalidades determinadas, una célula madre embrionaria de roedor es una célula madre embrionaria de ratón y es de una cepa 129, una cepa C57BL o una mezcla de las mismas. En algunas modalidades determinadas, una célula madre embrionaria de roedor es una célula madre embrionaria de ratón y es una mezcla de las cepas 129 y C57BL. En algunas modalidades determinadas, una célula madre embrionaria de roedor es una célula madre embrionaria de ratón y es de una cepa C57BL cuyo genoma carece de una mutación *Crb1^{rd8}* (es decir, cuyo genoma comprende un gen *Crbs1* de tipo salvaje). En algunas modalidades, una célula ES no humana, como se describe en la presente descripción, comprende una cualquiera de la SEQ ID NO:23, la SEQ ID NO:26 y la SEQ ID NO:28. En algunas modalidades, una célula ES no humana, como se describe en la presente descripción, comprende una cualquiera de la SEQ ID NO:33, la SEQ ID NO:34, la SEQ ID NO:36, la SEQ ID NO:37, la SEQ ID NO:39 y la SEQ ID NO:40.

En algunas modalidades, se proporciona el uso de una célula madre embrionaria de roedor, como se describe en la presente descripción, para producir un roedor. En algunas modalidades determinadas, una célula ES de roedor es una célula ES de ratón y se usa para producir un ratón cuyo genoma comprende una mutación en el exón 3 o el exón 5 de un gen *Rs1* endógeno de roedor, en donde la mutación en el exón 3 codifica una sustitución de aminoácidos C59S en el polipéptido Rs1 endógeno de roedor, y la mutación en el exón 5 codifica una sustitución de aminoácidos R141C en el polipéptido Rs1 endógeno de roedor. Un ratón cuyo genoma comprende dicha mutación muestra uno o más síntomas de retinosquiasis cuando el ratón es un ratón hembra homocigótico para la mutación, o cuando el ratón es un ratón macho hemicigótico para la mutación. En algunas modalidades determinadas, una célula ES de roedor es una célula ES de rata y se usa para producir una rata cuyo genoma comprende una mutación en el exón 3 o el exón 5 de un gen *Rs1* endógeno de roedor, en donde la mutación en el exón 3 codifica una sustitución de aminoácidos C59S en el polipéptido Rs1 endógeno de roedor, y la mutación en el exón 5 codifica una sustitución de aminoácidos R141C en el

polipéptido Rs1 endógeno de roedor. Una rata cuyo genoma comprende dicha mutación muestra uno o más síntomas de retinosquiasis cuando la rata es una rata hembra homocigótica para la mutación, o cuando la rata es una rata macho hemicigótica para la mutación.

5 En algunas modalidades, se proporciona un embrión de roedor hecho, producido, generado u obtenido a partir de una célula ES de roedor, como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades determinadas, un embrión de roedor es un embrión de ratón; en algunas modalidades, un embrión de rata. En algunas modalidades determinadas, un embrión de roedor proporcionado comprende la SEQ ID NO:25, la SEQ ID NO:27 o la SEQ ID NO:29. En algunas modalidades determinadas, un embrión de roedor proporcionado comprende la SEQ ID NO:38 o la SEQ ID NO:41.

10 En algunas modalidades, se proporciona el uso de un embrión de roedor, descrito en la presente descripción, para producir un roedor. En algunas modalidades determinadas, un embrión de roedor es un embrión de ratón y se usa para producir un ratón cuyo genoma comprende una mutación en el exón 3 o el exón 5 de un gen *Rs1* endógeno de roedor, en donde la mutación en el exón 3 codifica una sustitución de aminoácidos C59S en el polipéptido Rs1 endógeno de roedor, y la mutación en el exón 5 codifica una sustitución de aminoácidos R141C en el polipéptido Rs1 endógeno de roedor. Un ratón cuyo genoma comprende dicha mutación muestra uno o más síntomas de retinosquiasis cuando el ratón es un ratón hembra homocigótica para la mutación, o cuando el ratón es un ratón macho hemicigótico para la mutación. En algunas modalidades determinadas, un embrión de roedor es un embrión de rata y se usa para producir una rata cuyo genoma comprende una mutación en el exón 3 o el exón 5 de un gen *Rs1* endógeno de roedor, en donde la mutación en el exón 3 codifica una sustitución de aminoácidos C59S en el polipéptido Rs1 endógeno de roedor, y la mutación en el exón 5 codifica una sustitución de aminoácidos R141C en el polipéptido Rs1 endógeno de roedor. Una rata cuyo genoma comprende dicha mutación muestra uno o más síntomas de retinosquiasis cuando la rata es una rata hembra homocigótica para la mutación, o cuando la rata es una rata macho hemicigótica para la mutación.

20 En algunas modalidades, se proporciona un kit que comprende un roedor, una célula o tejido aislado de roedor, una célula inmortalizada, una célula ES de roedor o un embrión de roedor, como se describe en la presente descripción. También se describe un kit, como se describe en la presente descripción, para su uso en la fabricación y/o el desarrollo de un fármaco (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo) para la terapia o el diagnóstico. También se describe un kit, como se describe en la presente descripción, para su uso en la fabricación y/o el desarrollo de un fármaco (por ejemplo, un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo) para el tratamiento, la prevención o la mejora de una enfermedad, trastorno o afección.

25 En algunas modalidades, se proporciona una construcción de ácido nucleico o vector dirigido, como se describe en la presente descripción. En particular, la presente invención proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico a integrar en un gen *Rs1* de roedor en un locus *Rs1* de roedor, flanqueada por una secuencia de nucleótidos 5' y una secuencia de nucleótidos 3' que son homólogas a las secuencias de nucleótidos en el locus *Rs1* de roedor, en donde la integración de la secuencia de ácido nucleico en el gen *Rs1* de roedor resulta en un gen *Rs1* modificado genéticamente en un locus *Rs1* endógeno de roedor, cuyo gen *Rs1* modificado genéticamente comprende una mutación en el exón 3 o el exón 5 de un gen *Rs1* endógeno de roedor, en donde:

- 30
- la mutación en el exón 3 codifica una sustitución de aminoácidos C59S o R141C en el polipéptido Rs1 endógeno de roedor, y la mutación en el exón 5 codifica una sustitución de aminoácidos R141C en el polipéptido Rs1 endógeno de roedor;
 - 40 - el roedor es un ratón o una rata; y
 - un roedor que comprende el gen *Rs1* modificado genéticamente en su genoma muestra uno o más síntomas de retinosquiasis cuando el roedor es un roedor hembra homocigótica para el gen *Rs1* modificado genéticamente, o

cuando el roedor es un roedor macho hemicigótico para el gen *Rs1* modificado genéticamente. En algunas modalidades determinadas, una construcción de ácido nucleico o vector dirigido proporcionado, comprende un gen (o locus) *Rs1*, en su totalidad o en parte, como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades determinadas, una construcción de ácido nucleico o vector dirigido proporcionado, comprende un fragmento de ADN que incluye un gen (o locus) *Rs1*, en su totalidad o en parte, como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, se proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico a integrar en un gen *Rs1* de roedor en un locus *Rs1* de roedor, flanqueada por una secuencia de nucleótidos 5' y una secuencia de nucleótidos 3' que son homólogas a las secuencias de nucleótidos en el locus *Rs1* de roedor, en donde la integración de la secuencia de ácido nucleico en el gen de *Rs1* de roedor resulta en un gen *Rs1* modificado genéticamente que codifica un polipéptido RS1 que tiene una sustitución de aminoácidos como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, la secuencia de ácido nucleico a integrar, comprende un exón *Rs1* mutante de manera que la integración de la secuencia de ácido nucleico en un gen *Rs1* de roedor resulte en un gen *Rs1* modificado genéticamente que codifica un polipéptido RS1 que tiene una sustitución de aminoácidos. En algunas modalidades determinadas, una construcción de ácido nucleico o vector dirigido proporcionado comprende una cualquiera de la SEQ ID NO: 23, la SEQ ID NO: 26 y la SEQ ID NO: 28. En algunas modalidades determinadas, una construcción de ácido nucleico o vector dirigido proporcionado comprende la SEQ ID NO:36 y la SEQ ID NO:37, o la SEQ ID NO:39 y la SEQ ID NO:40. En algunas modalidades determinadas, una construcción de ácido nucleico o vector dirigido proporcionado comprende uno o más marcadores de selección. En algunas modalidades determinadas, una construcción de ácido nucleico o vector dirigido proporcionado comprende uno o más sitios de recombinación específica de sitio (por ejemplo, *loxP*, *Frt* o sus combinaciones). En algunas modalidades determinadas, una construcción de ácido nucleico o vector dirigido proporcionado se representa en los dibujos.

En algunas modalidades, se proporciona el uso de una construcción de ácido nucleico o vector dirigido, como se describe en la presente descripción, para producir una célula ES de roedor, una célula de roedor, un embrión de roedor y/o un roedor.

En algunas modalidades, se proporciona un método para producir un roedor modificado genéticamente que comprende modificar un genoma de roedor de modo que el genoma modificado comprenda una mutación en el exón 3 o el exón 5 de un gen *Rs1* endógeno de roedor; y producir un roedor modificado genéticamente que comprende el genoma modificado, en donde:

- la mutación en el exón 3 codifica una sustitución de aminoácidos C59S en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor, y la mutación en el exón 5 codifica una sustitución de aminoácidos R141C en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor;
- el roedor es un ratón o una rata; y
- el roedor muestra uno o más síntomas de retinosquiasis cuando el roedor es un roedor hembra homocigótico para la mutación, o cuando el roedor es un roedor macho hemicigótico para la mutación. El método puede comprender:
 - (a) introducir una secuencia de ácido nucleico en el genoma de una célula madre embrionaria de roedor de modo que un exón de un gen *Rs1* endógeno en un locus *Rs1* se muta para codificar un polipéptido RS1 que incluye una mutación en el exón 3 o el exón 5 de un gen *Rs1* endógeno de roedor, en donde la mutación en el exón 3 codifica una sustitución de aminoácidos C59S en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor, y la mutación en el exón 5 codifica una sustitución de aminoácidos R141C en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor; cuya secuencia de ácido nucleico comprende un polinucleótido que es homólogo a una secuencia en el locus *Rs1*; (b) obtener una célula madre embrionaria de roedor modificada genéticamente a partir de (a); y (c) crear un roedor mediante el uso de la célula madre embrionaria de roedor modificada genéticamente de (b).

En algunas modalidades de un método para producir un roedor, un exón tres de un gen *Rs1* se muta para codificar un polipéptido RS1 que incluye una sustitución C59S. En algunas modalidades determinadas de un método para producir un roedor, un exón tres de un gen *Rs1* se muta para codificar un polipéptido RS1 que incluye una sustitución C59S, se produce una delección de 25 pb en el intrón dos de un gen *Rs1* y se produce una delección de 28 pb en el intrón tres de un gen *Rs1*. En algunas modalidades de un método para producir un roedor, un exón cinco de un gen *Rs1* se muta para codificar un polipéptido RS1 que incluye una sustitución R141C. En algunas modalidades de un método para producir un roedor, un exón cinco de un gen *Rs1* se muta para codificar un polipéptido RS1 que incluye una sustitución R141C, se produce una delección 10 pb en el intrón cuatro de un gen *Rs1* y se produce una delección de 29 pb en el intrón cinco de un gen *Rs1*. En algunas modalidades de un método para producir un roedor, se elimina una porción del exón 1 y los exones 2-3 de la secuencia codificante en un locus *Rs1*. En algunas modalidades determinadas de un método para producir un roedor, se eliminan 13 716 pb de un gen *Rs1* en un locus *Rs1*.

En algunas modalidades de un método para producir un roedor, una secuencia de ácido nucleico comprende además uno o más marcadores de selección. En algunas modalidades de un método para producir un roedor, una secuencia de ácido nucleico comprende además uno o más sitios de reconocimiento de la recombinasa específica de sitio. En algunas modalidades de un método para producir un roedor, una secuencia de ácido nucleico comprende además un gen de recombinasa y un marcador de selección flanqueado por el uno o más sitios de reconocimiento de la recombinasa específica de sitio, cuyos sitios de reconocimiento de la recombinasa específica de sitio se orientan para dirigir una escisión. En algunas modalidades de un método para producir un roedor, una secuencia de ácido nucleico comprende además un gen indicador que está aguas abajo del marcador de selección.

En algunas modalidades de un método para producir un roedor, un gen de recombinasa se une operativamente a un promotor que dirige la expresión del gen de recombinasa en células diferenciadas y no dirige la expresión del gen de recombinasa en células indiferenciadas. En algunas modalidades de un método para producir un roedor, un gen de recombinasa se une operativamente a un promotor que es transcripcionalmente competente y regulado por el desarrollo.

En algunas modalidades de un método para producir un roedor, el método comprende además una etapa de cruzamiento del roedor generado en (c) de modo que se crea un roedor homocigótico para la delección, u homocigótico para el gen *Rs1* mutante (o modificado genéticamente).

En algunas modalidades, se proporciona un método para producir un roedor, el método comprende modificar un genoma de roedor de modo que el genoma modificado comprenda

30 modificar un genoma de roedor de modo que el genoma modificado comprenda una mutación en el exón 3 o el exón 5 de un gen *Rs1* endógeno de roedor; y

producir un roedor modificado genéticamente que comprende el genoma modificado, en donde:

- la mutación en el exón 3 codifica una sustitución de aminoácidos C59S en el polipéptido Rs1 endógeno de roedor, y la mutación en el exón 5 codifica una sustitución de aminoácidos R141C en el polipéptido Rs1 endógeno de roedor;
- el roedor es un ratón o una rata; y
- el roedor muestra uno o más síntomas de retinosquisis cuando el roedor es un roedor hembra homocigótico para la mutación, o cuando el roedor es un roedor macho hemocigótico para la mutación.

En algunas modalidades, un genoma de roedor se modifica mediante la utilización de células madre embrionarias (ES); es decir, el genoma de una célula ES se modifica, y la célula ES con un genoma modificado se usa para producir un roedor que comprende el genoma modificado. En algunas modalidades de un método para producir un roedor, el genoma se modifica de modo que comprende un gen *Rs1* modificado genéticamente que codifica un polipéptido RS1 que tiene una sustitución C59S o R141C. En algunos casos de un método para producir un roedor, el genoma se

modifica de modo que comprenda una delección de al menos una porción del exón 1 y los exones 2-3 de la secuencia codificante en el locus *Rs1*; en algunas modalidades determinadas, de modo que comprenda una delección de 13 716 pb en el gen *Rs1* en un locus *Rs1*.

5 En algunas modalidades, se proporciona un roedor hecho, generado, producido, obtenido u obtenible a partir de un método, como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, un método para identificar un agente terapéutico para el tratamiento de la retinosquiasis, el método comprende

(a) administrar un agente a un roedor cuyo genoma comprende una mutación en el exón 3 o el exón 5 de un gen *Rs1* endógeno de roedor, en donde:

- 10 - la mutación en el exón 3 codifica una sustitución de aminoácidos C59S en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor, y la mutación en el exón 5 codifica una sustitución de aminoácidos R141C en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor;
- el roedor es un ratón o una rata; y
 - el roedor es un roedor hembra homocigótico para el gen *Rs1* modificado genéticamente o un roedor macho hemocigótico para el gen *Rs1* modificado genéticamente, y muestra uno o más síntomas de retinosquiasis,

15 (b) realizar uno o más ensayos para determinar si el agente tiene un efecto sobre el uno o más síntomas de retinosquiasis; y

(c) identificar el agente como un agente terapéutico cuando el agente tiene un efecto terapéutico sobre el uno o más síntomas de retinosquiasis.

20 También se describe un roedor cuyo genoma comprende un gen indicador unido operativamente al codón de inicio (ATG) de un gen *Rs1*, en donde el gen indicador se ubica en el lugar de una porción del exón 1 y los exones 2-3 del gen *Rs1*, lo que resulta en la delección de 13 716 pb de la secuencia del gen *Rs1*.

También se describe un roedor cuyo genoma comprende un gen *Rs1* modificado genéticamente caracterizado por la presencia de una mutación puntual en el exón tres de TGT a AGT, una delección de 25 pb en el intrón dos y una delección de 28 pb en el intrón tres, cuyo gen *Rs1* modificado genéticamente codifica un polipéptido RS1 que tiene una sustitución C59S.

25

En algunas modalidades, el roedor proporcionado es uno cuyo genoma comprende un gen *Rs1* modificado genéticamente caracterizado por la presencia de una mutación puntual en el exón cinco de CGC a TGC, una delección de 10 pb en el intrón cuatro y una delección de 29 pb en el intrón cinco, cuyo gen *Rs1* modificado genéticamente codifica un polipéptido RS1 que tiene una sustitución R141C.

30 En algunas modalidades, se proporciona un modelo de retinosquiasis en roedor, cuyo roedor expresa o produce un polipéptido RS1 que tiene una sustitución de aminoácidos como se describe en la presente descripción, que tiene una sustitución de aminoácidos C59S o una sustitución de aminoácidos R141C.

En algunas modalidades, se proporciona un modelo de retinosquiasis en roedor, cuyo roedor tiene un genoma que comprende un gen *Rs1* modificado genéticamente, como se describe en la presente descripción.

35 También se describe un modelo de retinosquiasis en roedor, cuyo roedor tiene un genoma que comprende una delección, en la totalidad o en parte, de la secuencia codificante en un gen (o locus) *Rs1*, como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, se proporciona un modelo de retinosquiasis en roedor, obtenido al proporcionar un roedor, cuyo roedor expresa un polipéptido RS1 que tiene una sustitución de aminoácidos como se describe en la presente descripción; de esta manera se proporciona dicho modelo de retinosquiasis en roedor.

40

También se describe un roedor o célula, como se describe en la presente descripción, para su uso en la fabricación y/o el desarrollo de un fármaco para la terapia o el diagnóstico.

También se describe un roedor o célula, como se describe en la presente descripción, para su uso en la fabricación de

un medicamento para el tratamiento, la prevención o la mejora de una enfermedad, trastorno o afección.

También se describe el uso de un roedor o una célula, como se describe en la presente descripción, en la fabricación y/o el desarrollo de un fármaco o vacuna para su uso en la medicina, tal como el uso como un medicamento.

5 También se describe el uso de un roedor o célula, como se describe en la presente descripción, en la fabricación y/o el desarrollo de un fármaco para la terapia génica de la retinosquisis.

En algunas modalidades, una enfermedad, trastorno o afección es la retinosquisis. En algunas modalidades, una enfermedad, trastorno o afección es una enfermedad, trastorno o afección relacionada con los ojos o resulta a partir de la delección de la función y/o actividad de *Rs1*.

10 En diversas modalidades, uno o más fenotipos, como se describe en la presente, descripción es o son en comparación con una referencia o control. En algunas modalidades, una referencia o control incluye un roedor que tiene una modificación, como se describe en la presente descripción, una modificación que es diferente a una modificación, como se describe en la presente descripción o ninguna modificación (por ejemplo, un roedor de tipo salvaje).

15 En diversas modalidades, un roedor, como se describe en la presente descripción, es un ratón; en algunas modalidades, es una rata. En algunas modalidades, un ratón, como se describe en la presente descripción, se selecciona del grupo que consiste en una cepa 129, una cepa BALB/C, una cepa C57BL/6 y una cepa mixta 129xC57BL/6; en algunas modalidades determinadas, una cepa C57BL/6.

Breve descripción de los dibujos

20 El expediente de patente o solicitud contiene al menos un dibujo realizado en color. La Oficina proporcionará copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujo(s) a color, previa solicitud y pago de la tasa necesaria.

Los dibujos incluidos en la presente descripción, compuestos por las siguientes figuras, son solamente con propósitos de ilustración y no de limitación.

25 La Figura 1 muestra un diagrama, que no está a escala, de la organización de un gen retinosquisina-1 (*Rs1*) no humano (por ejemplo, de ratón) (parte superior) y el producto génico (parte inferior). Parte superior: los exones se numeran debajo de cada exón, también se indican las regiones no traducidas (recuadros abiertos) y las secuencias codificantes (barras verticales). Parte inferior: se indican la secuencia líder (LS), el dominio *Rs1* (*Rs1*), el dominio discoidina (DD) y la región C terminal (CT), junto con la ubicación de mutaciones de cisteína y de sentido erróneo ligadas a la enfermedad seleccionadas (adaptado de la Figura 1 de Wu, W.W.H. y otros, 2003, J. Biol. Chem. 278(30):28139-146).

30 La Figura 2 muestra un diagrama, que no está a escala, de un vector dirigido para crear una delección en un gen *Rs1* en un roedor, como se describe en el Ejemplo 1. Un gen indicador *lacZ* se inserta, en una unión operativa, a un codón de inicio (ATG) de *Rs1* de ratón en el exón uno y se elimina la porción restante del exón 1 hasta los últimos 6 nucleótidos del exón 3 del locus *Rs1* de ratón (delección de 13 716 pb). El vector dirigido *Rs1-lacZ-SDC* contiene un casete de selección con fármaco autoeliminable (por ejemplo, un gen de resistencia a neomicina flanqueado por secuencias *loxP*; véanse las patentes de Estados Unidos núms. 8,697,851, 8,518,392 y 8,354,389). Tras la recombinación homóloga, la secuencia contenida en el vector dirigido se inserta en el lugar de los exones 1-3 de un locus *Rs1* endógeno murino, como se muestra. El casete de selección con fármaco se elimina de una manera dependiente del desarrollo, es decir, la progenie derivada de los ratones cuyas células de la línea germinal contienen una interrupción en un locus *Rs1*, como se describió anteriormente, liberarán el marcador de selección de las células diferenciadas durante el desarrollo. Los exones consecutivos (barras verticales) se indican por el número encima de cada exón, y también se indican las regiones no traducidas (recuadro abierto) y la secuencia codificante (barras cerradas). *lacZ*: gen de la β -galactosidasa; Cre: gen de la recombinasa Cre; Neo: gen de resistencia a neomicina.

40 La Figura 3 muestra un diagrama, que no está a escala, de la organización genómica de un gen *Rs1* murino que ilustra

una interrupción ilustrativa (por ejemplo, una deleción de 13 716 pb de los exones 1-3), como se describe en el Ejemplo 1. Los exones (barras cerradas) se numeran encima de cada exón, y también se indican las regiones no traducidas (recuadros abiertos). Las ubicaciones aproximadas de las sondas (es decir, Rs1K0mTU, Rs1K0mTD), empleadas en un ensayo de cribado descrito en el Ejemplo 1, se indican mediante barras verticales gruesas.

5 La Figura 4 muestra un diagrama, que no está a escala, de un gen *Rs1* murino interrumpido ilustrativo, como se describe en el Ejemplo 1. Se muestra una deleción de los exones 1-3 (deleción de 13 716 pb) de un locus *Rs1* de ratón como resultado de la inserción de un gen indicador *lacZ* unido operativamente a un codón de inicio (ATG) de *Rs1* de ratón. Los exones (barras verticales) se numeran encima de cada exón, y también se indican las regiones no traducidas (recuadro abierto) y la secuencia codificante restante (rectángulo con bandas). Las ubicaciones de las uniones de nucleótidos seleccionadas se marcan con una línea por debajo de cada unión y se indican por la SEQ ID NO.

La Figura 5 muestra un diagrama, que no está a escala, de un vector dirigido para crear un gen *Rs1* mutante en un roedor (por ejemplo, ratón), como se describe en el Ejemplo 1. Los exones consecutivos (barras verticales) se indican con un número por encima o por debajo de cada exón. Una mutación puntual ilustrativa en el exón tres (C59S; TGT a AGT) se indica por encima del exón tres mediante la inserción de un fragmento de ADN sintético y elementos del casete mediante la recombinación homóloga. El vector dirigido Rs1C59S-SDC contiene un casete de selección con fármaco autoeliminable (por ejemplo, un gen de resistencia a higromicina flanqueado por secuencias *loxP*; véanse las patentes de Estados Unidos núms. 8,697,851, 8,518,392 y 8,354,389). Tras la recombinación homóloga, el fragmento de ADN sintético contenido en el vector dirigido se inserta en el lugar del exón tres de un locus *Rs1* endógeno murino, como se muestra. El casete de selección con fármaco se elimina de una manera dependiente del desarrollo, es decir, la progenie derivada de los ratones cuyas células de la línea germinal contienen una interrupción en un locus *Rs1*, como se describió anteriormente, liberarán el marcador de selección de las células diferenciadas durante el desarrollo. Las ubicaciones de las uniones de nucleótidos seleccionadas se marcan con una línea por debajo de cada unión y se indican por la SEQ ID NO.

25 La Figura 6 muestra un diagrama, que no está a escala, de una vista en primer plano del exón tres de un gen *Rs1* de ratón y el diseño del gen *Rs1* mutante ilustrado en la Figura 5 (véase también el Ejemplo 1). El exón tres (rectángulo negro) con la mutación puntual diana (C59S) y los intrones circundantes se muestran junto con dos pequeñas deleciones diseñadas para los ensayos TAQMAN®. La integración del vector dirigido mediante recombinación homóloga resulta en un exón tres que codifica una porción de un polipéptido RS1 que tiene una sustitución C59S y dos pequeñas deleciones (25 pb y 28 pb) en los intrones circundantes en el gen *Rs1* mutante. La ubicación aproximada de las sondas (es decir, Rs1-C59SmTU y Rs1-C59SmTD) empleadas en un ensayo de cribado descrito en el Ejemplo 1 se indican mediante barras verticales gruesas.

La Figura 7 muestra un diagrama, que no está a escala, de una vista en primer plano de un gen *Rs1* mutante en un roedor (por ejemplo, ratón) creado después de la escisión, mediada por la recombinasa, del casete contenido dentro del vector dirigido descrito en el Ejemplo 1. El exón tres, con la mutación puntual que resulta en una sustitución C59S en el producto génico Rs1, se muestra con un sitio *loxP* restante. La ubicación de la unión de nucleótidos que se mantiene después de la escisión del casete, mediada por la recombinasa, se marca con una línea por debajo de la unión y se indica por la SEQ ID NO.

La Figura 8 muestra un diagrama, que no está a escala, de un vector dirigido para crear un gen *Rs1* mutante en un roedor (por ejemplo, ratón), como se describe en el Ejemplo 1. Los exones consecutivos (barras verticales) se indican con un número por encima o por debajo de cada exón. Una mutación puntual ilustrativa en el exón cinco (R141C; CGC a TGC) se indica por encima del exón cinco mediante la inserción de un fragmento de ADN sintético y elementos del casete mediante la recombinación homóloga. El vector dirigido Rs1R141C-SDC contiene un casete selección con

fármaco autoeliminable (por ejemplo, un gen de resistencia a higromicina flanqueado por secuencias *loxP*; véanse las patentes de Estados Unidos núms. 8,697,851, 8,518,392 y 8,354,389). Tras la recombinación homóloga, el fragmento de ADN sintético contenido en el vector dirigido se inserta en el lugar del exón cinco de un locus *Rs1* endógeno murino, como se muestra. El casete de selección con fármaco se elimina de una manera dependiente del desarrollo, es decir, la progenie derivada de los ratones cuyas células de la línea germinal contienen una interrupción en un locus *Rs1*, como se describió anteriormente, liberarán el marcador de selección de las células diferenciadas durante el desarrollo. Las ubicaciones de las uniones de nucleótidos seleccionadas se marcan con una línea por debajo de cada unión y se indican por la SEQ ID NO.

La Figura 9 muestra un diagrama, que no está a escala, de una vista en primer plano del exón cinco de un gen *Rs1* de ratón y el diseño del gen *Rs1* mutante ilustrado en la Figura 8 (véase también el Ejemplo 1). Se muestran el exón cinco (rectángulo negro) con la mutación puntual diana (R141C) y los intrones circundantes junto con dos pequeñas delecciones diseñadas para los ensayos TAQMAN®. La integración del vector dirigido mediante recombinación homóloga resulta en un exón cinco que codifica una porción de un polipéptido RS1 que tiene una sustitución R141C y dos pequeñas delecciones (10 pb y 29 pb) en los intrones circundantes en el gen *Rs1* mutante. La ubicación aproximada de las sondas (es decir, *Rs1*-R141CmTU y *Rs1*-R141CmTD) empleadas en un ensayo de cribado descrito en el Ejemplo 1 se indica mediante barras verticales gruesas.

La Figura 10 muestra un diagrama, que no está a escala, de una vista en primer plano de un gen *Rs1* mutante en un roedor (por ejemplo, ratón) creado después de la escisión, mediada por la recombinasa, del casete contenido dentro del vector dirigido descrito en el Ejemplo 1. El exón cinco, con la mutación puntual que resulta en una sustitución R141C en el producto génico *Rs1*, se muestra con un sitio *loxP* restante. La ubicación de la unión de nucleótidos que se mantiene después de la escisión del casete, mediada por la recombinasa, se marca con una línea por debajo de la unión y se indica por la SEQ ID NO.

Las Figuras 11A-11C muestran la distribución del ARNm de *Rs1* y la expresión de proteínas en retinas de animales deficientes de *Rs1* (*Rs1*^{KO}) y mutantes de *Rs1* (*Rs1*^{C59S}, *Rs1*^{R141C}) mediante la expresión de *lacZ*, RNASCOPE® e inmunohistoquímica (IHC). A, tinción de *lacZ* que demuestra señales positivas a X-gal en la ONL y el IS del fotorreceptor de los animales *Rs1*^{KO}. B, Expresión de ARNm de *Rs1* a través de RNASCOPE® que demuestra la expresión de ARNm de *Rs1* endógeno en animales de tipo salvaje (WT). No se detectó ARNm de *Rs1* en las retinas de los animales *Rs1*^{KO}. C, IHC que muestra la distribución de proteínas RS1 en todas las capas retinianas de los animales WT. No se detectó expresión de la proteína RS1 en los animales *RS1*^{KO} y se limitó a la ONL y los IS de los animales *Rs1*^{C59S} y *Rs1*^{R141C} (GCL: capa de células ganglionares; IPL: capa plexiforme interna; INL: capa nuclear interna; OPL: capa plexiforme externa; ONL: capa nuclear externa; IS: segmentos internos; RPE: epitelio pigmentario de la retina). *Rs1*: rojo; DAPI: azul.

Las Figuras 12A-12D muestran la expresión de la proteína RS1 en las retinas de los animales deficientes de *Rs1* (*Rs1*^{KO}) y mutantes de *Rs1* (*Rs1*^{C59S}, *Rs1*^{R141C}) mediante ensayos de transferencia Western y ELISA. A, transferencia Western del gel de SDS-PAGE, en condiciones reductoras, que muestran la expresión de RS1 en cepas macho derivadas de *Rs1*^{KO} y C57BL/6. B, transferencia Western del gel de SDS-PAGE, en condiciones reductoras, que muestran la expresión de RS1 en animales macho de tipo salvaje (WT) y *Rs1*^{C59S}. C, transferencia Western del gel de SDS-PAGE, en condiciones reductoras, que muestran la expresión de RS1 en animales machos de tipo salvaje (WT) y *Rs1*^{R141C}. D, ensayo ELISA que muestra el nivel de proteína RS1 en animales machos de tipo salvaje (WT), *Rs1*^{KO}, *Rs1*^{C59S} y *Rs1*^{R141C}. El por ciento de la proteína RS1 expresada en animales mutantes de *Rs1* en comparación con las camadas de tipo salvaje se indica encima de cada barra. D, expresión de la proteína RS1 en las retinas de los animales hembra inactivados para *Rs1* en ensayos de transferencia Western y ELISA. KO: homocigótica inactivada para *Rs1* (*Rs1*^{-/-}); HET: heterocigótica inactivada para *Rs1* (*Rs1*^{-/+}). Los animales hembra RS1 HET tenían una

cantidad de proteína RS1 similar a la de los animales machos y hembras de tipo salvaje ("WT").

Las Figuras 13A-13D muestran los cambios patológicos en las retinas de los animales deficientes de *Rs1* (*Rs1^{KO}*) y mutantes de *Rs1* (*Rs1^{C59S}*, *Rs1^{R141C}*) mediante análisis histológico, IHC y tomografía de coherencia óptica (OCT). A, el examen histológico de las cavidades y la división en la INL mostradas (triángulos rojos) y la desorganización general de la INL y la OPL, degeneración de los fotorreceptores con adelgazamiento de la ONL (flecha vertical de doble cabeza roja) y los segmentos internos/externos (línea vertical roja) en animales macho *Rs1^{KO}*, *Rs1^{C59S}* y *Rs1^{R141C}*. B, la IHC con marcadores celulares específicos de la retina (proteína ácida fibrilar glial GFAP y vimentina) reveló gliosis de la INL (* indicó células de Muller activadas) en animales macho *Rs1^{KO}*. C, Se observaron retinosquiasis y degeneración del fotorreceptor en animales macho *Rs1^{KO}*, *Rs1^{C59S}* y *Rs1^{R141C}* mediante imágenes *in vivo* mediante el uso de tomografía de coherencia óptica (OCT) Spectralis Heidelberg. D, No se observó esquiasis en las hembras heterocigóticas inactivadas para *RS1* (*Rs1^{+/-}*) ("Het"), mientras que las hembras homocigóticas inactivadas para *RS1* (*Rs1^{-/-}*) ("KO") tenían un fenotipo que coincidía con el macho hemi KO.

Las Figuras 14A-D muestran el análisis de la función retiniana externa mediante electroretinogramas de campo completo (ERG) adaptados a la oscuridad (DA-) y adaptados a la luz (LA-) en animales de 20 semanas de edad. A, ERG representativos obtenidos en condiciones adaptadas a la oscuridad de animales macho de tipo salvaje (WT), *Rs1^{KO}* (KO), *Rs1^{C59S}* (C59S) y *Rs1^{R141C}* (R141C). B, ERG representativos obtenidos en condiciones adaptadas a la luz de animales macho de tipo salvaje (WT), *Rs1^{KO}* (KO), *Rs1^{C59S}* (C59S) y *Rs1^{R141C}* (R141C). C, amplitud representativa de los componentes principales del ERG adaptado a la oscuridad y a la luz representado en función de la luminancia del estímulo. Los puntos de datos indican el promedio (\pm DE) de seis animales macho. En comparación con el tipo salvaje, las ondas a y b de los animales macho *Rs1^{KO}*, *Rs1^{C59S}* y *Rs1^{R141C}* (R141C) se redujeron en amplitud. La luminancia del estímulo (A y B) se señala a la izquierda del gráfico con forma de onda que está más a la izquierda. D, ERG representativos obtenidos en condiciones adaptadas a la oscuridad y adaptadas a la luz de animales hembra de tipo salvaje (*Rs1^{+/+}*), homocigótica inactivada (*Rs1^{-/-}*) y heterocigótica inactivada (*Rs1^{+/-}*). Los ERG de las hembras portadoras (heterocigóticas) coincidieron con los de los controles WT en todas las condiciones. En comparación, el fenotipo de ERG de las hembras homocigóticas inactivadas fue comparable al de los machos hemocigóticos inactivados, con una forma de onda negativa y una onda a de amplitud reducida.

La Figura 15 muestra el diseño experimental para un estudio descrito en el Ejemplo 4 para investigar el fenotipo de inicio temprano de la retina en los ratones *Rs1* KO. Los ratones ♂*Rs1* (-/Y) o *Rs1* (+/Y) y ♀*Rs1* (+/-) se criaron para obtener ratones *Rs1* KO: *Rs1* (-/Y) o *Rs1* (-/-), y ratones *Rs1* WT: *Rs1* (+/Y) o *Rs1* (+/+). El ERG se realizó en P15, 18, 21 y 24, y cada ratón se sometió a dos o menos ERG u OCT con un intervalo de 6 días.

Las Figuras 16A-16F ilustran los fenotipos de inicio temprano de los ratones *Rs1* KO en el análisis de ERG y OCT. La función retiniana externa se evaluó mediante ERG de campo completo adaptado a la oscuridad (DA-) (A y D) y adaptado a la luz (LA-) (B y E), que muestran una reducción de la onda b con relación a la onda a, lo que resulta en un ERG negativo (datos de cuantificación no mostrados) en todos los puntos de tiempo. El fenotipo de la retinosquiasis estuvo presente durante todo el curso del tiempo de observación (P15-P24) (C y F, indicado por triángulos amarillos). Las Figuras 17A-17B muestran cambios en los parámetros del ERG a lo largo del tiempo de ratones *Rs1* KO y ratones de tipo salvaje (WT) (análisis de Naka-Rushton). En comparación con el control WT, los valores de R_{máx} de la onda a y de la onda b en P15 fueron menores en los ratones *Rs1* KO; los valores de R_{máx} y sensibilidad de las ondas b del ERG DA y el ERG LA se redujeron en gran medida en los ratones *Rs1* KO en P15. A las edades más antiguas, los valores de R_{máx} reducidos persistieron, pero los valores de sensibilidad fueron comparables en los ratones *Rs1* KO y WT.

La Figura 18 muestra los cambios en las imágenes de la OCT a lo largo del tiempo. Se observó esquiasis prominente en la INL y la OPL (asterisco) y no se observaron evidencias de ELM en P15, que tendió a moderarse en puntos de tiempo

posteriores. La zona elipsoide (EZ) en la retina *Rs1* KO fue más amplia que la WT durante todo el período.

Las Figuras 19A-19C muestran los resultados de un análisis de OCT cuantitativo. La retina (que incluye la retina externa) en los ratones WT se adelgazó ligeramente durante el período de desarrollo (C). La retina (A y B) en los ratones *Rs1* KO se volvió más delgada, principalmente relacionada con la esquisis moderada, y la retina externa en la retina *Rs1* KO fue más delgada que la WT durante el período (C).

La Figura 20 muestra el alineamiento de los polipéptidos RS1 de ratón, rata y humano. La secuencia señal está subrayada. Las posiciones en las que difieren las secuencias se identifican mediante “**”

Definiciones

Interrupción: Una interrupción puede lograr o representar una inserción, una delección, una sustitución, un reemplazo, una mutación de sentido erróneo, o un desplazamiento del marco de una(s) secuencia(s) de ADN, o cualquiera de sus combinaciones. Las inserciones pueden incluir la inserción de genes completos o fragmentos de genes, por ejemplo, exones, que pueden ser de un origen distinto al de la secuencia endógena (por ejemplo, una secuencia heteróloga). Una interrupción puede aumentar la expresión y/o actividad de un gen o producto génico (por ejemplo, de una proteína codificada por un gen). Una interrupción puede disminuir la expresión y/o actividad de un gen o producto génico. Una interrupción puede alterar la secuencia de un gen o un producto génico codificado (por ejemplo, un polipéptido codificado). Una interrupción puede truncar o fragmentar un gen o un producto génico codificado (por ejemplo, una proteína codificada). Una interrupción puede extender un gen o un producto génico codificado. Una interrupción puede lograr el ensamble de un polipéptido de fusión. Una interrupción puede afectar el nivel, pero no la actividad de un gen o producto génico. Una interrupción puede afectar la actividad, pero no el nivel de un gen o producto génico. Una interrupción puede no tener un efecto significativo sobre el nivel de un gen o producto génico. En algunas modalidades, una interrupción puede no tener un efecto significativo sobre la actividad de un gen o producto génico. Una interrupción puede no tener un efecto significativo sobre el nivel o la actividad de un gen o producto génico.

Roedor: El roedor de la presente invención es una rata o un ratón.

Homología sustancial: como se usa en la presente descripción, se refiere a una comparación entre secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos. Como apreciarán los expertos en la técnica, generalmente dos secuencias se consideran “*sustancialmente homólogas*” si contienen residuos homólogos en las posiciones correspondientes. Los residuos homólogos pueden ser residuos idénticos. Alternativamente, los residuos homólogos pueden ser residuos no idénticos con características estructurales y/o funcionales apropiadamente similares. Por ejemplo, como conocen bien los expertos en la técnica, determinados aminoácidos se clasifican, típicamente, como aminoácidos “*hidrófobos*” o “*hidrófilos*”, y/o por tener cadenas laterales “*polares*” o “*no polares*”. La sustitución de un aminoácido por otro del mismo tipo puede considerarse frecuentemente una sustitución “*homóloga*”. Las clasificaciones típicas de aminoácidos se resumen más abajo.

35	Alanina	Ala	A	No polar	Neutro	1,8
	Arginina	Arg	R	Polar	Positivo	-4,5
	Asparagina	Asn	N	Polar	Neutro	-3,5
	Ácido aspártico	Asp	D	Polar	Negativo	-3,5
	Cisteína	Cys	C	No polar	Neutro	2,5
40	Ácido glutámico	Glu	E	Polar	Negativo	-3,5
	Glutamina	Gln	Q	Polar	Neutro	-3,5
	Glicina	Gly	G	No polar	Neutro	-0,4
	Histidina	His	H	Polar	Positivo	-3,2

ES 2 953 875 T3

	Isoleucina	Ile	I	No polar	Neutro	4,5
	Leucina	Leu	L	No polar	Neutro	3,8
	Lisina	Lys	K	Polar	Positivo	-3,9
	Metionina	Met	M	No polar	Neutro	1,9
5	Fenilalanina	Phe	F	No polar	Neutro	2,8
	Prolina	Pro	P	No polar	Neutro	-1,6
	Serina	Ser	S	Polar	Neutro	-0,8
	Treonina	Thr	T	Polar	Neutro	-0,7
	Triptófano	Trp	W	No polar	Neutro	-0,9
10	Tirosina	Tyr	Y	Polar	Neutro	-1,3
	Valina	Val	V	No polar	Neutro	4,2

Aminoácidos Ambiguos	3 letras	1 letra
Asparagina o ácido aspártico	Asx	B
Glutamina o ácido glutámico	Glx	Z
Leucina o Isoleucina	Xle	J
Aminoácido no especificado o desconocido	Xaa	X

Como se conoce bien en esta técnica, las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos pueden compararse mediante el uso de cualquiera de una variedad de algoritmos, que incluyen los disponibles en programas de computadora comerciales, tales como BLASTN para secuencias de nucleótidos y BLASTP, gapped BLAST y PSI-BLAST para secuencias de aminoácidos. Tales programas ilustrativos se describen en Altschul S. F. y otros, 1990, J. Mol. Biol., 215(3): 403-410; Altschul, S. F. y otros, 1997, Methods in Enzymology; Altschul, S. F. y otros, 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-3402; Baxevanis, A.D., y B. F. F. Ouellette (eds.) Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; y Misener y otros (eds.) Bioinformatics Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 132), Humana Press, 1998. Además de identificar las secuencias homólogas, los programas mencionados anteriormente típicamente proporcionan una indicación del grado de homología. En algunas modalidades, dos secuencias se consideran sustancialmente homólogas si al menos 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de sus residuos correspondientes son homólogos a lo largo de un segmento de residuos en cuestión. En algunas modalidades, el segmento en cuestión es una secuencia completa. En algunas modalidades, el segmento en cuestión es de al menos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o más residuos. En algunas modalidades, el segmento en cuestión incluye residuos contiguos a lo largo de una secuencia completa. En algunas modalidades, el segmento en cuestión incluye residuos discontinuos a lo largo de una secuencia completa, por ejemplo, residuos no contiguos reunidos por la conformación plegada de un polipéptido o una porción del mismo. En algunas modalidades, el segmento en cuestión es de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más residuos. Identidad sustancial: como se usa en la presente descripción, se refiere a una comparación entre secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos. Como apreciarán los expertos en la técnica, generalmente, dos secuencias se consideran "*sustancialmente idénticas*" si contienen residuos idénticos en las posiciones correspondientes. Como se conoce bien en esta técnica, las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos pueden compararse mediante el uso de cualquiera de una variedad de algoritmos, que incluyen los disponibles en programas de computadora comerciales tales como BLASTN para las secuencias de nucleótidos y BLASTP, gapped BLAST, y PSI-BLAST para las secuencias de aminoácidos. Tales programas ilustrativos se describen en Altschul S. F. y otros, 1990, J. Mol. Biol., 215(3): 403-10; Altschul, S.F. y otros, 1996, Meth. Enzymol. 266:460-80; Altschul, S.F. y otros, 1997, Nucleic Acids Res., 25:3389-402; Baxevanis, A.D. y B.F.F. Ouellette (eds.) Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins, Wiley, 1998; y Misener y otros (eds.) Bioinformatics Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, Vol. 132,

Humana Press, 1998. Además de identificar secuencias idénticas, los programas mencionados anteriormente típicamente proporcionan una indicación del grado de identidad. En algunas modalidades, dos secuencias se consideran sustancialmente idénticas si al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de sus residuos correspondientes son idénticos a lo largo de un segmento de residuos en cuestión. En algunas modalidades, el segmento en cuestión es una secuencia completa. En algunas modalidades, el segmento en cuestión es de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más residuos.

Vector dirigido o construcción dirigida: como se usa en la presente descripción, se refiere a una molécula de polinucleótido que comprende una región dirigida. Una región dirigida comprende una secuencia que es idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia en una célula, tejido o animal diana y permite la integración de la construcción dirigida (y/o una secuencia contenida en ella) en una posición dentro del genoma de la célula, tejido o animal, a través de la recombinación homóloga. También se incluyen regiones dirigidas que se dirigen a una posición de la célula, tejido o animal a través del intercambio de casetes mediado por la recombinasa, mediante el uso de sitios de reconocimiento de la recombinasa específica de sitio (por ejemplo, sitios *loxP* o *Frt*). En algunas modalidades, una construcción dirigida, como se describe en la presente descripción, comprende además una secuencia de ácido nucleico o gen (por ejemplo, un gen indicador, un gen homólogo, un gen heterólogo o un gen mutante) de interés particular, un marcador de selección, secuencias de control y/o reguladoras, y otras secuencias de ácido nucleico que codifican una recombinasa o un polipéptido recombinogénico. En algunas modalidades, una construcción dirigida puede comprender un gen de interés en su totalidad o en parte, en donde el gen de interés codifica un polipéptido, en su totalidad o en parte, que tiene una función similar a la de una proteína codificada por una secuencia endógena. En algunas modalidades, una construcción dirigida puede comprender un gen mutante de interés, en su totalidad o en parte, en donde el gen mutante de interés codifica una variante de polipéptido, en su totalidad o en parte, que tiene una función similar a la de un polipéptido codificado por una secuencia endógena. En algunas modalidades, una construcción dirigida puede comprender un gen indicador, en su totalidad o en parte, en donde el gen indicador codifica un polipéptido que se identifica y/o mide fácilmente mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica.

Variante: como se usa en la presente descripción, se refiere a una entidad que muestra una identidad estructural significativa con una entidad de referencia, pero se diferencia estructuralmente de la entidad de referencia en la presencia o nivel de uno o más restos químicos en comparación con la entidad de referencia. En algunas modalidades, una “*variante*” también se diferencia funcionalmente de su entidad de referencia. Por ejemplo, una “*variante de polipéptido*” puede diferenciarse de un polipéptido de referencia como resultado de una o más diferencias en la secuencia de aminoácidos y/o una o más diferencias en los restos químicos (por ejemplo, carbohidratos, lípidos, etcétera) unidos covalentemente a la cadena principal del polipéptido. En algunas modalidades, una “*variante de polipéptido*” muestra una identidad de secuencia general con un polipéptido de referencia que es al menos de 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 % o 99 %. Alternativamente o adicionalmente, en algunas modalidades, una “*variante de polipéptido*” no comparte al menos un elemento de la secuencia característico con un polipéptido de referencia. En algunas modalidades, el polipéptido de referencia tiene una o más actividades biológicas. En algunas modalidades, una “*variante de polipéptido*” comparte una o más de las actividades biológicas del polipéptido de referencia. En algunas modalidades, una “*variante de polipéptido*” carece de una o más de las actividades biológicas del polipéptido de referencia. En algunas modalidades, una “*variante de polipéptido*” muestra un nivel reducido de una o más actividades biológicas en comparación con el polipéptido de referencia. En algunas modalidades, un polipéptido de interés se considera una “*variante*” de un polipéptido original o de referencia si el polipéptido de interés tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la del original excepto por un pequeño número de alteraciones de la secuencia en posiciones particulares. Típicamente, menos de 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, o 2 % de los residuos en la variante se sustituyen en comparación con el original. En algunas

modalidades, una "variante" tiene 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 residuo(s) sustituido(s) en comparación con un original. Frecuentemente, una "variante" tiene un número muy pequeño (por ejemplo, menos de 5, 4, 3, 2, o 1) de residuos funcionales sustituidos (es decir, residuos que participan en una actividad biológica particular). Además, típicamente, una "variante" no tiene más de 5, 4, 3, 2, o 1 adiciones o deleciones y, frecuentemente, no tiene adiciones o deleciones, en comparación con el original. Además, cualquiera de las adiciones o deleciones tienen, típicamente, menos de aproximadamente 10, aproximadamente 9, aproximadamente 8, aproximadamente 7, aproximadamente 6 y, comúnmente, tienen menos de aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3 o aproximadamente 2 residuos. En algunas modalidades, un polipéptido original o de referencia es uno que se encuentra en la naturaleza. Como comprenderán los expertos en la técnica, una pluralidad de variantes de un polipéptido de interés particular puede encontrarse comúnmente en la naturaleza, particularmente cuando el polipéptido de interés es un polipéptido de un agente infeccioso.

Descripción detallada de determinadas modalidades

Se proporcionan roedores que son ratones o ratas que tienen mutación(es) en el material genético que codifica un polipéptido Retinosquisina-1 (RS1). En particular, la presente invención proporciona un roedor modificado genéticamente cuyo genoma comprende una mutación en el exón 3 o el exón 5 de un gen *Rs1* endógeno de roedor, en donde:

- la mutación en el exón 3 codifica una sustitución de aminoácidos C59S en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor, y la mutación en el exón 5 codifica una sustitución de aminoácidos R141C en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor;
- el roedor es un ratón o una rata; y
- el roedor muestra uno o más síntomas de retinosquiasis cuando el roedor es un roedor hembra homocigótico para la mutación, o cuando el roedor es un roedor macho hemocigótico para la mutación. También se describen roedores que tienen una delección, en la totalidad o en parte, de la secuencia codificante de un gen *Rs1*, que resulta en un gen *Rs1* mutante que no produce un polipéptido RS1 en el roedor. Los roedores proporcionados tienen una o más mutaciones en una secuencia codificante de un gen *Rs1*, que resultan en un gen *Rs1* mutante que codifica una variante o mutante de polipéptido RS1 que incluye una o más sustituciones de aminoácidos en comparación con un polipéptido RS1 de tipo salvaje (es decir, el polipéptido RS1 codificado por el gen *Rs1* sin las mutaciones). Las mutaciones son mutaciones en el exón 3 o el exón 5 de un gen *Rs1* endógeno de roedor. La mutación en el exón 3 codifica una sustitución de aminoácidos C59S en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor, y la mutación en el exón 5 codifica una sustitución de aminoácidos R141C en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor. Tales una o más sustituciones de aminoácidos, como se describe en la presente descripción, resultan en la eliminación o reducción significativa del polipéptido RS1 funcional producido y la formación de características patológicas y funcionales asociadas con la retinosquiasis (por ejemplo, retinosquiasis ligada al cromosoma X, XLR5) en los roedores. Por lo tanto, los roedores proporcionados son particularmente útiles para el desarrollo e identificación de candidatos terapéuticos para el tratamiento y/o mejora de la retinosquiasis. Tales roedores proporcionan una fuente de células para identificar y desarrollar agentes terapéuticos (por ejemplo, terapias génicas) para el tratamiento y/o mejora de la retinosquiasis. Además, tales roedores proporcionan la capacidad de un sistema de modelo animal útil para el desarrollo de agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones relacionados con los ojos.

En algunas modalidades, los roedores descritos en la presente descripción son animales machos. En algunas modalidades, los roedores descritos en la presente descripción son animales hembras. En algunas modalidades, los roedores descritos en la presente descripción son animales hembras heterocigóticos para una interrupción o mutación(es) en un gen *Rs1*, como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, los roedores descritos en la presente descripción son animales hembras homocigóticos para una interrupción o mutación(es) en un

gen *Rs1*, como se describe en la presente descripción.

Diversos aspectos de la presente descripción se describen en detalle en las siguientes secciones. El uso de dichas secciones no pretende ser limitante. Cada sección puede aplicarse a una o más modalidades descritas en la presente descripción. En esta solicitud, el uso de “o” significa “y/o”, a menos que se indique de cualquier otra manera.

5 Retinosquisina-1 y retinosquiasis

Retinosquisina-1 es un gen pequeño que tiene aproximadamente 32,4 kb de largo, que contiene seis exones y cinco intrones ubicados en el cromosoma Xp22.2, y codifica un ARNm de 3,1 kb que se traduce en un polipéptido precursor de 224 aminoácidos llamado retinosquisina.

La retinosquisina se expresa como un monómero que contiene cuatro dominios diferentes: Secuencia señal N terminal (23 aminoácidos) que dirige la translocación de proteínas al exterior de la célula; un dominio *Rs1* único (un motivo de secuencia muy conservado de 39 aminoácidos de longitud); un dominio discoidina (157 aminoácidos), que contribuye a la función adhesiva de *RS1* para preservar la arquitectura de las células retinianas y para establecer una conectividad sináptica apropiada; y un segmento C terminal (5 aminoácidos).

La retinosquisina se ensambla en el retículo endoplasmático y se secreta como homooctámero funcional unido por enlaces disulfuro (ocho subunidades unidas entre sí mediante enlaces disulfuro Cys59- Cys223. Las subunidades dentro del octámero se organizan además en dímeros mediados por enlaces disulfuro Cys(40)-Cys(40). El *RS1* está unido por fuerzas iónicas a la parte externa de la membrana plasmática del segmento interno del fotorreceptor y funciona en las interacciones célula-célula y la adhesión celular. El *RS1* se expresa en la retina, de forma prominente por los segmentos internos del bastón y el cono, las células bipolares y la glándula pineal. La inmunotinción en la retina localiza la retinosquisina en los segmentos internos de los fotorreceptores, las células bipolares y las capas plexiformes externa e interna. Existe una homología de secuencia alta en humanos, ratones, ratas y conejos (96 % de identidad y 97,8 % de similitud entre ratones y humanos; véase también la Figura 20).

La retinosquiasis es una enfermedad ocular grave clasificada en formas degenerativas, hereditarias, traccionales y exudativas. En particular, la retinosquiasis juvenil ligada al cromosoma X (*XLRS*), una forma hereditaria de la retinosquiasis, es una degeneración macular de inicio temprano caracterizada por la pérdida de agudeza visual, la división anómala de las capas neurosensoriales de la retina y una reducción de la onda b en un electroretinograma (ERG). Las mutaciones en el gen Retinosquisina-1 (*RS1*) causan la *XLRS* y se transmite en un patrón recesivo ligado al cromosoma X que causa la enfermedad solo en hombres. Las mutaciones en el producto génico *RS1* resultan en la ausencia completa de un polipéptido *RS1*, o la producción de un polipéptido *RS1* defectuoso que tiene una función reducida o ninguna función. Se ha informado que casi 200 mutaciones del gen *RS1* se asocian con la *XLRS* y se manifiestan en un fenotipo muy variable entre las personas (por ejemplo, revisado en Kim, D.Y. y S. Mukai, 2013, Sem. Ophthalmol. 28(5- 6):392-6). De las casi 200 mutaciones informadas, aproximadamente el 40 % de las mutaciones causantes de la enfermedad son mutaciones sin sentido o de desplazamiento del marco, que se prevé que resulten en la ausencia de un polipéptido de longitud completa. Sin embargo, aproximadamente el 50 % (100/191) de las mutaciones causantes de la enfermedad son mutaciones de sentido erróneo, que permiten la producción del polipéptido mutante de longitud completa (Molday, R.S. y otros, 2012, Prog. Retin. Eye Res. 31:195-212). La mayoría de estas mutaciones (85/191) se encuentran en el dominio discoidina y resultan en un polipéptido mal plegado, funcionalmente incompetente.

Existe un espectro de fenotipos para la *XLRS*. Las lesiones maculares quísticas que afectan a la fóvea son características clínicas de la *XLRS*. En particular, la esquisis foveal con patrón de “rueda de carros” o “radial” es un hallazgo característico en el examen de fondo de ojo, que se presenta en cerca del 100 % de los casos, y la esquisis puede ocurrir periféricamente en hasta el 50 % de los pacientes o desprendimientos de retina. La esquisis periférica puede conducir a orificios y desgarros de la hoja interna con posibilidad de hemorragia por vasos que cruzan sin

soporte. Los cambios periféricos adicionales incluyen pigmentación que se asemeja a la retinitis pigmentaria, fibrosis retiniana y manchas blancas, y distrofia vitreoretiniana. Los ERG muestran una marcada reducción de la onda b y una onda a anómala en algunos pacientes, pero en muchos, la onda a se mantiene normal.

La presentación clínica de la XLRS y el curso de la enfermedad es variable y se presenta desde temprano en el nacimiento hasta más tarde en la edad escolar con solo síntomas visuales leves. Estas variaciones y gravedad clínica no parecen correlacionarse con el genotipo, y los portadores hembra son asintomáticos. Actualmente, la OCT de dominio espectral (SD-OCT) es la técnica diagnóstica principal para esta enfermedad, mientras que las opciones de tratamiento existentes se limitan a servicios y accesorios para corregir la visión deficiente. Los inhibidores de la anhidrasa carbónica (IAC, tópicos y orales, aprobados para su uso en el glaucoma) han mostrado una mejora en la agudeza visual en aproximadamente el 50 % de los ojos tratados en estudios pequeños informados.

Roedores que tienen un gen *Rs1* mutante o modificado genéticamente

Aunque se ha logrado un progreso significativo en la comprensión de la XLRS, muchos de los mecanismos precisos de la XLRS se mantienen desconocidos. La presente descripción se basa en la creación de sistemas *in vivo* mejorados para generar y desarrollar tratamientos para la XLRS que dependen de estructuras genéticas únicas que no están presentes actualmente en los sistemas establecidos. Por tanto, la presente descripción se basa en el reconocimiento de que los sistemas *in vivo* mejorados para generar y desarrollar tratamientos para la XLRS pueden proporcionarse mediante la generación de alteraciones genéticas en un locus *Rs1* endógeno en un roedor, tal como un roedor (por ejemplo, un ratón). Como se describe en la presente descripción, la presente descripción demuestra específicamente, entre otras cosas, estrategias ilustrativas para crear roedores con deficiencia de *Rs1* y con *Rs1* modificado genéticamente (por ejemplo, *Rs1* mutante) (por ejemplo, un ratón) que recapitulan un fenotipo de la enfermedad XLRS humana. Sin desear limitarse a ninguna teoría particular, las estrategias descritas en la presente descripción pueden emplearse para crear otros roedores con deficiencia de *Rs1* y/o con *Rs1* modificado genéticamente según se desee. Por ejemplo, los roedores con *Rs1* modificado genéticamente pueden crearse para contener genes *Rs1* modificados genéticamente que contengan mutaciones, o combinaciones de mutaciones, distintas de las descritas en la sección Ejemplos que aparece más abajo. Los ejemplos de mutaciones que pueden introducirse genéticamente en un gen *Rs1* endógeno pueden encontrarse en la base de datos de variación de la secuencia de retinosquias ligada al cromosoma X (RETINOSCHISISDB®).

En la presente descripción también se describen roedores que tienen una delección en el genoma, en la totalidad o en parte, de la secuencia codificante del gen *Rs1* en un locus *Rs1* endógeno, que resulta en la falta de un polipéptido RS1 funcional que se produzca en los roedores. En casos, la delección incluye al menos los exones 2-3 del gen *Rs1*. El exón 2 codifica los aminoácidos 18-26 del polipéptido RS1 (los aminoácidos 18-23 son los últimos 5 aminoácidos de la secuencia señal). El exón 3 codifica los aminoácidos 27-61 del polipéptido RS1. En algunos casos, la delección incluye al menos una porción del exón 1 y los exones 2-3 del gen *Rs1*. Por ejemplo, la porción del exón 1 que comienza desde inmediatamente 3' al codón de inicio ATG hasta el extremo 3' del exón 1 y codifica los aminoácidos 2-17 del polipéptido RS1 puede incluirse en la delección. En casos específicos, la delección es de un fragmento genómico contiguo que comienza inmediatamente después del codón de inicio ATG en el exón 1, a través del exón 2, hasta el extremo 3' del exón 3 o hasta los seis nucleótidos en el extremo 3' del exón 3 del gen *Rs1*.

En algunos de los casos en los que el locus *Rs1* tiene una delección, en la totalidad o en parte, de la secuencia codificante del gen *Rs1*, el locus *Rs1* incluye un gen indicador. En algunos casos, el gen indicador se une operativamente a un promotor de *Rs1*, por ejemplo, el promotor de *Rs1* endógeno en el locus *Rs1* que tiene una delección, en la totalidad o en parte, de la secuencia codificante del gen *Rs1*. En algunos casos, el locus *Rs1* tiene una delección de un fragmento genómico contiguo que comienza inmediatamente después del codón de inicio ATG en el exón 1 hasta el extremo 3' del exón 3 (o hasta los seis nucleótidos en el extremo 3' del exón 3) del gen *Rs1*, y la

secuencia codificante del gen indicador se fusiona en marco al codón de inicio ATG del gen *Rs1*. Como resultado de una unión operativa al promotor de *Rs1* endógeno en el locus *Rs1*, la expresión del gen indicador se asemeja al patrón de expresión del gen *Rs1*. Los genes indicadores adecuados para su uso en la presente descripción incluyen, por ejemplo, *lacZ* y genes que codifican una proteína indicadora tal como luciferasa, la proteína verde fluorescente (GFP), la GFP potenciada (eGFP), la proteína cian fluorescente (CFP), la proteína amarilla fluorescente (YFP), la proteína amarilla fluorescente potenciada (eYFP), la proteína azul fluorescente (BFP), la proteína azul fluorescente potenciada (eBFP), DsRed y MmGFP.

Los roedores proporcionados tienen una o más mutaciones puntuales en la secuencia codificante de un gen *Rs1* endógeno que resulta en una variante de polipéptido RS1 que incluye una o más sustituciones de aminoácidos con relación al polipéptido RS1 de tipo salvaje (codificado por el gen *Rs1* sin las mutaciones puntuales); por ejemplo, una variante de polipéptido RS1 de roedor (por ejemplo, ratón o rata) que incluye una o más sustituciones de aminoácidos con relación al polipéptido RS1 de roedor de tipo salvaje, o una variante de polipéptido RS1 humano que incluye una o más sustituciones de aminoácidos con relación al polipéptido RS1 humano de tipo salvaje. En particular, el roedor comprende una mutación en el exón 3 o el exón 5 de un gen *Rs1* endógeno de roedor, en donde la mutación en el exón 3 codifica una sustitución de aminoácidos C59S en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor, y la mutación en el exón 5 codifica una sustitución de aminoácidos R141C en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor

Las sustituciones de aminoácidos descritas en la presente descripción resultan en la eliminación o reducción significativa del nivel del polipéptido RS1 funcional producido a partir de un alelo *Rs1* mutante (es decir, un gen *Rs1* que tiene una delección o una mutación puntual). Las sustituciones de aminoácidos pueden conducir a la eliminación o reducción significativa del nivel del polipéptido RS1 funcional producido como resultado, por ejemplo, del plegado incorrecto de un polipéptido, ensamble defectuoso de una subunidad u oligómero, e incapacidad de un polipéptido para insertarse en la membrana del ER como parte del proceso de secreción de proteínas.

Una sustitución de aminoácidos está en la secuencia señal, lo que resulta en una incapacidad de una variante de polipéptido RS1 que tiene la sustitución de aminoácidos para insertarse en la membrana del ER para su secreción. Por ejemplo, la sustitución de residuos hidrófobos en la secuencia señal con prolina o con residuos hidrófilos/cargados puede prevenir que la secuencia señal adopte una estructura secundaria de hélice α , que se requiere para su inserción en la membrana del ER. En casos específicos, tal sustitución de aminoácidos es una sustitución L13 (por ejemplo, L13P).

En algunas modalidades, una sustitución de aminoácidos está en las regiones que flanquean el dominio discoidina, es decir, la región *Rs1* compuesta por los aminoácidos 24-62 y el segmento C terminal (compuesto por los aminoácidos 220-224). En particular, la mutación comprende una mutación en el exón 3 que codifica una sustitución de aminoácidos C59S en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor. En modalidades específicas, una sustitución adicional puede ser una sustitución de cisteína en la posición 38, 40, 42, 223 con un residuo que no es cisteína, por ejemplo, Ser, Arg, Trp, Tyr o Gly. C40 es responsable de formar dímeros unidos por enlaces disulfuro C40-C40, y C59 y C223 forman enlaces disulfuro intermoleculares para permitir el ensamble de los dímeros de RS1 en el octámero. La sustitución de Cys en 40, 59 o 223 puede tener solo un efecto limitado sobre el plegado y la secreción de proteínas, pero aún así resulta en la incapacidad de un polipéptido RS1 mutante que comprende tal sustitución para funcionar como una proteína de adhesión celular. En algunas modalidades, la cisteína en la posición 40 o 223 también se ha sustituido con Ser, Arg, Trp, Tyr o Gly. Los ejemplos específicos de sustituciones incluyen C38S, C40S, C42S, C223S, C223R y C223Y.

En otras modalidades, una sustitución de aminoácidos está en el dominio discoidina del polipéptido RS1, que está compuesto por los aminoácidos 63-219.

En algunas modalidades, también puede presentarse una sustitución en el dominio discoidina que es una sustitución

de uno de los cinco residuos de Cys en el dominio discoidina: C63, C83, C110, C142 y C219. Cys63 y Cys219, y Cys110-Cys142, forman dos enlaces disulfuro intramoleculares que son importantes para el plegado de las proteínas. En algunas modalidades, la cisteína en una de las posiciones 63, 83, 110, 142 o 219 también se ha sustituido con un residuo que no es cisteína, por ejemplo, Ser, Arg, Trp, Tyr o Gly. Los ejemplos específicos de sustituciones incluyen

5 C63S, C83S, C110S, C110Y, C142S, C142R, C142W, C219S, C219R, C219W y C219G.

Una sustitución en el dominio discoidina puede ser una sustitución de un residuo de aminoácido no implicado directamente en la formación de enlaces disulfuro pero que es importante para el plegado de la proteína, la formación o estabilidad del dominio discoidina, y/o las interacciones intermoleculares entre subunidades adyacentes. Los ejemplos de tales residuos incluyen residuos muy conservados del núcleo, inaccesibles al disolvente, tales como E72, G109, E146, R182 y P203, así como también R141 y D143. En una modalidad de la presente invención, el gen *Rs1* endógeno de roedor comprende una mutación en el exón 5 que codifica una sustitución de aminoácidos R141C en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor. En algunas modalidades específicas, una sustitución adicional es una que reemplaza un residuo que no es cisteína con cisteína, lo que puede afectar el intercambio de tioles; por ejemplo, W92C, W96C, R182C, R200C, P203C, y R209C. En algunas otras modalidades específicas, una sustitución adicional es una que afecta la carga de las proteínas al eliminar o invertir la carga de los residuos de aminoácidos o al reemplazar un residuo sin carga con un residuo cargado, sin afectar los residuos tiol; por ejemplo, E72K, W96R, R102W, R102Q, G109E, G109R, R141H, D143V, N179D y R213W. En otras modalidades, una sustitución adicional es una que puede afectar la estabilidad de la conformación mediante la inserción o eliminación de residuos de Pro; por ejemplo, S73P, L127P, P192S, P192T, P193S y P203L. En aún otras modalidades, una sustitución adicional es una que puede afectar el núcleo hidrófobo mediante la inserción o eliminación de residuos polares (es decir, reemplazar un residuo hidrófobo con un residuo polar o reemplazar un residuo polar con un residuo hidrófobo); por ejemplo, I136T y N163Y.

En algunas modalidades, los animales no humanos descritos en la presente descripción comprenden una o más mutaciones puntuales en un gen *Rs1* que resultan en una sustitución de cisteína [Cys, C] por serina [Ser, S], o la sustitución de arginina [Arg, R] por cisteína [Cys, C] en el polipéptido RS1 codificado. En algunas modalidades determinadas, la sustitución de un gen *Rs1* endógeno de roedor es una sustitución C59S. En algunas modalidades determinadas, la sustitución de un gen *Rs1* endógeno de roedor es una sustitución R141C.

También se hace referencia a roedores que comprenden un gen *Rs1* modificado genéticamente que comprende además material genético de una especie heteróloga (por ejemplo, un ser humano). En algunos casos, los roedores, como se describe en la presente descripción, comprenden un gen *Rs1* modificado genéticamente que es un gen *Rs1* humano mutante, en donde el gen *Rs1* humano mutante codifica un polipéptido RS1 humano que incluye una sustitución descrita en la presente descripción anteriormente, por ejemplo, una sustitución C59S o una sustitución R141C. En algunos casos determinados, los roedores, como se describe en la presente descripción, comprenden un gen *Rs1* humano mutante que se inserta aleatoriamente en el genoma del roedor de manera que se expresa un polipéptido RS1 humano que incluye una sustitución descrita en la presente descripción anteriormente, por ejemplo, una sustitución C59S o una sustitución R141C.

Secuencias de Retinosquisina-1

Las secuencias de *Rs1* humanas y no humanas ilustrativas se exponen en las SEQ ID NO: 1-22 y se resumen en la Tabla 1.

40 Un casete autoeliminable ilustrativo empleado para la interrupción de un alelo *Rs1* de roedor (por ejemplo, ratón) que incluye un gen indicador *lacZ*, un gen de la recombinasa *Cre* bajo el control transcripcional de un promotor de la protamina 1 de ratón y un gen de resistencia a neomicina flanqueado por sitios *loxP* bajo el control transcripcional de un promotor de ubiquitina se expone en la SEQ ID NO: 23 (8202 pb).

ES 2 953 875 T3

Una deleción ilustrativa de un alelo *Rs1* de roedor (por ejemplo, ratón) (la secuencia de los exones 1-3 se elimina de un locus *Rs1* endógeno de roedor) se expone en la SEQ ID NO: 24 (13 716 pb).

Una porción ilustrativa de un alelo *Rs1* de *Mus musculus* interrumpido después de la escisión, mediada por la recombinasa, de un casete de selección se expone en la SEQ ID NO: 25.

5 Una porción ilustrativa de un alelo *Rs1* mutante de roedor (por ejemplo, ratón) que codifica una sustitución de aminoácidos C59S que incluye un casete selección con higromicina autoeliminable se expone en la SEQ ID NO: 26.

Una porción ilustrativa de un alelo *Rs1* mutante de roedor (por ejemplo, ratón) que codifica una sustitución de aminoácidos C59S después de la escisión, mediada por la recombinasa, de un casete de selección se expone en la SEQ ID NO: 27.

10 Una porción ilustrativa de un alelo *Rs1* mutante de roedor (por ejemplo, ratón) que codifica una sustitución de aminoácidos R141C que incluye un casete selección con higromicina autoeliminable se expone en la SEQ ID NO: 28:

Una porción ilustrativa de un alelo *Rs1* mutante de roedor (por ejemplo, ratón) que codifica una sustitución de aminoácidos R141C después de la escisión, mediada por la recombinasa, de un casete de selección se expone en la SEQ ID NO: 29.

15 Tabla 1

SEQ ID NO	Descripción	Características
1	ARNm de <i>Rs1</i> de <i>Mus musculus</i> (sec. ref. NCBI NM_011302)	Longitud: 5855 nt Región codificante: nt. 174-848 Exones 1-6: nt 1-225, 226-251, 252-357, 358-499, 500-695, 696-5840.
2	Aminoácidos de <i>Rs1</i> de <i>Mus musculus</i> (sec. ref. NCBI NP_035432)	Longitud: 224 aa Secuencia señal: aa 1-23
3	ARNm de <i>Rs1</i> de <i>Rattus norvegicus</i> (sec. ref. NCBI NM_001104643)	Longitud: 675 nt Región codificante: nt 1-675
4	Aminoácidos de <i>Rs1</i> de <i>Rattus norvegicus</i> (sec. ref. NCBI NP_001098113)	Longitud: 224 aa Secuencia señal: aa 1-21
5	ARNm de <i>RS1</i> de <i>Macaca mulatta</i> (sec. ref. NCBI NM_001194911)	Longitud: 994 nt Región codificante: nt. 42-716
6	Aminoácidos de <i>RS1</i> de <i>Macaca mulatta</i> (sec. ref. NCBINP_001181840)	Longitud: 224 aa Secuencia señal: aa 1-21
7	ARNm de <i>RS1</i> de <i>Homo sapiens</i> (sec. ref. NCBI NM_000330)	Longitud: 3039 nt Región codificante: 36-710 Exones 1-6: 1-87, 88-113, 114-219, 220-360, 361-557, 558-3025.
8	Aminoácidos de <i>RS1</i> de <i>Homo sapiens</i> (sec. ref. NCBI NP_000321)	Longitud: 224 aa Secuencia señal: aa 1-23
9	ARNm de <i>Rs1</i> de <i>Canis lupus familiaris</i> (sec. ref. NCBI XM_548882)	Longitud: 2061 nt Región codificante: nt 89-763
10	Aminoácidos de <i>Rs1</i> de <i>Canis lupus familiaris</i> (sec. ref. NCBI XP_548882)	Longitud: 224 aa
11	ARNm de <i>Rs1</i> de <i>Sus scrofa</i> (sec. ref. NCBI XM_013985956)	Longitud: 1772 nt Región codificante: nt 295-969
12	Aminoácidos de <i>Rs1</i> de <i>Sus scrofa</i> (sec. ref. NCBI XP_013841410)	Longitud: 224 aa
13	ARNm de <i>Rs1</i> de <i>Bos taurus</i> (sec. ref. NCBI XM_010822174)	Longitud: 899 nt Región codificante: nt. 45-719
14	Aminoácidos de <i>Rs1</i> de <i>Bos taurus</i> (sec. ref. NCBI XP_010820476)	Longitud: 224 aa
15	ARNm de <i>RS1</i> de <i>Ovis aries</i> (sec. ref. NCBI XM_012106316)	Longitud: 1604 nt Región codificante: nt 702-1337
16	Aminoácidos de <i>RS1</i> de <i>Ovis aries</i> (oveja) (sec. ref. NCBI XP_011961706)	Longitud: 211 aa

ES 2 953 875 T3

17	ARNm de RS1 de <i>Felis catus</i> (gato) (sec. ref. NCBI XM_019823621)	Longitud: 4553 nt Región codificante: nt. 59-733
18	Aminoácidos de RS1 de <i>Felis catus</i> (gato) (sec. ref. NCBI XP_019679180)	Longitud: 224 aa
19	ARNm de RS1 de <i>Equus caballus</i> (sec. ref. NCBI XM_001491183)	Longitud: 1193 nt Región codificante: nt. 1-675
20	Aminoácidos de RS1 de <i>Equus caballus</i> (sec. ref. NCBI XP_001491233)	Longitud: 224 aa
21	ARNm de RS1 de <i>Oryctolagus cuniculus</i> (sec. ref. NCBI NM_001109823)	Longitud: 675 nt Región codificante: nt. 1-675
22	Aminoácidos de RS1 de <i>Oryctolagus cuniculus</i> (sec. ref. NCBI NP_001103293)	Longitud: 224 aa Secuencia señal: aa 1-21
23	Un casete autoeliminable ilustrativo empleado para la interrupción de un alelo <i>Rs1</i> no humano (por ejemplo, de ratón) que incluye un gen indicador lacZ, un gen de la recombinasa Cre bajo el control transcripcional de un promotor de la protamina 1 de ratón y un gen de resistencia a neomicina flanqueado por sitios <i>loxP</i> bajo el control transcripcional de un promotor de ubiquitina.	Longitud: 8202 pb sitios <i>loxP</i> : nt. 3431-3464 y 8163-8196
24	Delección ilustrativa de un alelo <i>Rs1</i> de ratón (que comprende una parte del exón 1 y los exones 2-3)	Longitud: 13 716 pb
25	Porción ilustrativa de un alelo <i>Rs1</i> de <i>Mus musculus</i> interrumpido después de la escisión, mediada por la recombinasa, de un casete de selección.	Longitud: 3670 nt Secuencias de ratón: nt 1-100 y 3571-3670 lacZ y sitios de clonación restantes: nt. 101- 3570 secuencia <i>loxP</i> : nt. 3531-3564
26	Porción ilustrativa de un alelo <i>Rs1</i> mutante de ratón que codifica una sustitución de aminoácidos C59S que incluye un casete de selección con higromicina autoeliminable	Longitud: 5987 nt Secuencias de ratón: nt. 1-755 y 5788-5987 Codón mutado: nt. 572-574 Exón 3: nt. 476-581 Secuencia del vector dirigido: nt. 756-5787
27	Porción ilustrativa de un alelo <i>Rs1</i> mutante de ratón que codifica una sustitución de aminoácidos C59S después de la escisión, mediada por la recombinasa, de un casete de selección	Longitud: 1033 nt Secuencias de ratón: nt. 1-755 y 834-1033 Codón mutado: nt. 572-574 Exón 3: nt. 476-581 Secuencia del vector dirigido: nt. 756-833
28	Porción ilustrativa de un alelo <i>Rs1</i> mutante de ratón que codifica una sustitución de aminoácidos R141C que incluye un casete de selección con higromicina autoeliminable	Longitud: 5629 nt Secuencias de ratón: nt. 1-497 y 5530-5629 Codón mutado: nt. 278-280 Exón 5: nt. 184-379 Secuencia del vector dirigido: nt. 498-5529.
29	Porción ilustrativa de un alelo <i>Rs1</i> de ratón que codifica una sustitución de aminoácidos R141C después de la escisión, mediada por la recombinasa, de un casete de selección	Longitud: 675 nt Secuencias de ratón: nt. 1-497 Codón mutado: nt. 278-280 Exón 5: nt. 184-379 Secuencia del vector dirigido: nt. 498-675.
30	Promotor de la protamina 1 (Prm1)	
31	Promotor de Blimp1 1kb	
32	Promotor de Blimp1 2kb	
33-41	Secuencias de unión en los alelos <i>Rs1</i> mutantes descritas en el Ejemplo 1	
42-59	Secuencias del cebador y la sonda descritas en el Ejemplo 1	

Producción de roedores

En la presente descripción se proporcionan construcciones de ADN, vectores dirigidos y métodos para la producción de roedores que tienen una interrupción o mutación(es) en un gen *Rs1*, como se describe en la presente descripción.

Las secuencias de ADN pueden usarse para preparar vectores dirigidos para animales inactivados (por ejemplo, un *Rs1* KO). Típicamente, una molécula de polinucleótido (por ejemplo, un inserto de ácido nucleico) que codifica un gen indicador o un gen *Rs1* mutante (o modificado genéticamente), en su totalidad o en parte, se inserta en un vector, preferentemente un vector de ADN, para replicar la molécula de polinucleótido en una célula huésped adecuada.

5 Una molécula de polinucleótido (o inserto de ácido nucleico) comprende un segmento de ADN que uno desea integrar en un locus o gen diana. En algunas modalidades, un inserto de ácido nucleico comprende uno o más polinucleótidos de interés. En algunas modalidades, un inserto de ácido nucleico comprende uno o más casetes de expresión. En algunas modalidades determinadas, un casete de expresión comprende un polinucleótido de interés, un polinucleótido que codifica un marcador de selección y/o un gen indicador junto con, en algunas modalidades determinadas, diversos componentes reguladores que influyen en la expresión (por ejemplo, promotor, potenciador, etc.). Prácticamente cualquier polinucleótido de interés puede estar contenido dentro de un inserto de ácido nucleico y, de esta manera, integrado en un locus genómico diana. Los métodos descritos en la presente descripción permiten que al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más polinucleótidos de interés se integren en un gen (o locus) *Rs1* diana.

En algunas modalidades, un polinucleótido de interés contenido en un inserto de ácido nucleico codifica un indicador. En algunas modalidades, un polinucleótido de interés contenido en un inserto de ácido nucleico codifica una variante, una variante heteróloga o un polipéptido RS1 heterólogo. En algunas modalidades, un polinucleótido de interés contenido en un inserto de ácido nucleico codifica un marcador de selección y/o una recombinasa.

En algunas modalidades, un polinucleótido de interés está flanqueado por o comprende sitios de recombinación específica de sitio (por ejemplo, *loxP*, *Frt*, etc.). En algunas modalidades determinadas, los sitios de recombinación específica de sitio flanquean un segmento de ADN que codifica un indicador, un segmento de ADN que codifica un marcador de selección, un segmento de ADN que codifica una recombinasa y sus combinaciones. En la presente descripción se describen polinucleótidos ilustrativos de interés, que incluyen marcadores de selección, genes indicadores y genes de recombinasa que pueden incluirse dentro de los insertos de ácidos nucleicos.

En dependencia del tamaño, un gen *Rs1* o secuencia codificante de RS1 pueden clonarse directamente a partir de fuentes de ADNc disponibles de proveedores comerciales o diseñarse *in silico* en base a secuencias publicadas disponibles en el GenBank (véase más arriba). Alternativamente, las bibliotecas de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) pueden proporcionar secuencias de *Rs1* a partir de genes de interés (por ejemplo, genes *Rs1* heterólogos o de roedor). Las bibliotecas de BAC contienen un tamaño de inserto promedio de 100-150 kb y son capaces de albergar insertos tan grandes como 300 kb (Shizuya, H. y otros, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 89:8794-7; Swiatek, P.J. y T. Gridley, 1993, Genes Dev. 7:2071-84; Kim, U.J. y otros, 1996, Genomics 34:213-8). Por ejemplo, se han construido bibliotecas genómicas de BAC humanas y de ratón y están disponibles comercialmente (por ejemplo, Invitrogen, Carlsbad CA). Las bibliotecas genómicas de BAC también pueden servir como fuente de secuencias de *Rs1* de roedor o heterólogas, así como también de regiones de control transcripcional.

Alternativamente, las secuencias de *Rs1* de roedor o heterólogas pueden aislarse, clonarse y/o transferirse desde cromosomas artificiales de levadura (YAC). Un gen *Rs1* de roedor o heterólogo completo puede clonarse y contenerse dentro de uno o algunos YAC. Si se emplean múltiples YAC y contienen regiones de homología de solapamiento, pueden recombinarse dentro de las cepas huésped de levadura para producir una única construcción que representa el locus completo. Los brazos del YAC pueden modificarse adicionalmente con casetes de selección de mamíferos mediante el reajuste para ayudar a introducir las construcciones en células madre embrionarias o embriones mediante métodos conocidos en la técnica y/o descritos en la presente descripción.

Las construcciones de ADN o vectores dirigidos que contienen secuencias *Rs1*, como se describe en la presente descripción, en algunas modalidades, comprenden secuencias genómicas de *Rs1* de roedor que codifican un polipéptido RS1 de roedor que incluye una o más sustituciones de aminoácidos en comparación con un polipéptido

RS1 de roedor de tipo salvaje u original unido operativamente a secuencias reguladoras de roedor para su expresión en un roedor modificado genéticamente. En algunas modalidades, las construcciones de ADN o los vectores dirigidos que contienen secuencias *Rs1*, como se describe en la presente descripción, comprenden secuencias genómicas de *Rs1* de roedor que codifican una variante de polipéptido RS1 de roedor que incluye una sustitución de aminoácidos, C59S o R141C, en comparación con un polipéptido RS1 de roedor de tipo salvaje u original unido operativamente a un promotor de *Rs1* de roedor. Las secuencias de roedor y/o heterólogas incluidas en las construcciones de ADN descritas en la presente descripción pueden ser idénticas o sustancialmente idénticas a las secuencias de roedor y/o heterólogas que se encuentran en la naturaleza (por ejemplo, genómica). Alternativamente, tales secuencias pueden ser artificiales (por ejemplo, sintéticas) o pueden modificarse genéticamente por la mano del hombre. En algunas modalidades, las secuencias de *Rs1* son de origen sintético, e incluyen una secuencia o secuencias que se encuentran en un gen *Rs1* de roedor o heterólogo que se encuentra en la naturaleza. En algunas modalidades, las secuencias de *Rs1* comprenden una secuencia que se asocia naturalmente con un gen *Rs1* de roedor o heterólogo. En algunas modalidades, las secuencias de *Rs1* comprenden una secuencia que no se asocia naturalmente con un gen *Rs1* de roedor o heterólogo. En algunas modalidades, las secuencias de *Rs1* comprenden una secuencia que se optimiza para su expresión en un roedor. Si son útiles secuencias adicionales para optimizar la expresión de un gen *Rs1* mutante (o variante) descrito en la presente descripción, tales secuencias pueden clonarse mediante el uso de secuencias existentes como sondas. Pueden obtenerse secuencias adicionales necesarias para maximizar la expresión de un gen *Rs1* mutante o una secuencia codificante de RS1 a partir de secuencias genómicas u otras fuentes en dependencia del resultado deseado.

Las construcciones de ADN o vectores dirigidos pueden prepararse mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, una construcción de ADN puede prepararse como parte de un plásmido más grande. Tal preparación permite clonar y seleccionar las construcciones correctas de una manera eficiente, como se conoce en la técnica. Los fragmentos de ADN que contienen secuencias, como se describe en la presente descripción, pueden ubicarse entre sitios de restricción convenientes en el plásmido, de modo que puedan aislarse fácilmente de las secuencias de plásmido restantes para su incorporación en el animal deseado. En la técnica se conocen diversos métodos empleados en la preparación de plásmidos, construcciones de ADN y/o vectores dirigidos y la transformación de organismos huésped. Para otros sistemas de expresión adecuados tanto para células procariotas como eucariotas, así como también para procedimientos recombinantes generales, véase *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2da Ed., ed. por Sambrook, J. y otros, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989.

Como se describió anteriormente, se proporcionan anteriormente secuencias ilustrativas de aminoácidos y ácidos nucleicos de *Rs1* no humano para su uso en la construcción de vectores dirigidos para roedores que contienen un gen *Rs1* interrumpido o modificado genéticamente. También pueden encontrarse otras secuencias de *Rs1* no humanas en la base de datos del GenBank. Los vectores dirigidos *Rs1*, en algunas modalidades, comprenden secuencias de ADN que codifican un gen indicador, un marcador de selección, un gen de recombinasa (o sus combinaciones) y secuencias de *Rs1* de roedor (es decir, secuencias que flanquean una región diana) para su inserción en el genoma de un roedor transgénico. En un ejemplo, un punto de inicio de la delección puede establecerse inmediatamente aguas abajo (3') de un codón de inicio para permitir que un inserto de ácido nucleico se una operativamente a una secuencia reguladora endógena (por ejemplo, un promotor). Las Figuras 2-4 ilustran un método ilustrativo y un vector dirigido para producir una delección dirigida de una porción de la secuencia codificante (por ejemplo, los exones 1-3) de un gen *Rs1* murino, la exclusión del codón de inicio, y el reemplazo con un casete que contiene una secuencia de un gen *lacZ* que codifica la β -galactosidasa y un casete de selección con fármaco que codifica la neomicina fosfotransferasa (Neo) para la selección de las colonias de células madre embrionarias (ES) resistentes a G418. El vector dirigido también incluye una secuencia que codifica una recombinasa (por ejemplo, Cre) regulada por un microARN específico de

células ES (miARN) o un promotor específico de células germinales (por ejemplo, promotor de la protamina 1; Prot-Cre-SV40). El casete de selección con neomicina y las secuencias codificantes de la recombinasa Cre están flanqueadas por sitios de reconocimiento de la recombinasa *loxP* que permiten la escisión mediada por Cre del casete de selección con neomicina de una manera dependiente del desarrollo, es decir, la progenie derivada de los roedores, cuyas células germinales contienen el gen *Rs1* interrumpido descrito anteriormente, liberará el marcador de selección durante el desarrollo (véanse las patentes de Estados Unidos núms. 8,697,851, 8,518,392, 8,354,389, 8,946,505 y 8,946,504). Esto permite, entre otras cosas, la escisión automática del casete de selección con neomicina de las células diferenciadas o las células germinales. Por tanto, antes del análisis fenotípico, el casete de selección con neomicina se elimina y queda solo el gen indicador *lacZ* (fusionado al codón de inicio de *Rs1* de ratón) unido operativamente al promotor de *Rs1* murino (Figura 4).

Los métodos para generar roedores, como se describe en la presente descripción, emplean el uso de la tecnología de casetes de selección autoeliminables (véanse las patentes de Estados Unidos núms. 8,697,851, 8,518,392 y 8,354,389). El uso de esta tecnología permite evitar los inconvenientes de la presencia de casetes de selección en el genoma de los roedores, lo que facilita la selección de los clones resistentes a fármacos. Tal tecnología de casetes de selección autoeliminables se caracteriza, en algunas modalidades, por la inclusión de un promotor que se une operativamente a un gen de recombinasa dentro del vector dirigido. El promotor es transcripcionalmente competente, de manera que el promotor regula la expresión del gen de recombinasa de una manera dependiente del desarrollo debido a que la actividad del promotor se restringe a células indiferenciadas (es decir, células ES; para la competencia transcripcional véase, además, por ejemplo, Ram, R. y E. Meshorer, 2009, *Genes Dev.* 23:2793-98; Xu, J. y otros, 2009, *Genes Dev.* 23:2824-38). Como resultado, el polipéptido recombinasa solo se expresa después de que las células ES se diferencien (es decir, se desarrollen). Las células ES que han incorporado un vector dirigido, como se describe en la presente descripción, retienen el casete de selección debido a la inactividad del promotor que controla la expresión (es decir, que está unido operativamente al) del gen de recombinasa, pero promueven la escisión del casete de selección una vez que las células ES comienzan a diferenciarse como resultado del comienzo de la expresión de la recombinasa. Por tanto, por diseño, la progenie que se desarrolla a partir de una célula ES que contiene el vector dirigido dentro de su genoma expresa la recombinasa en una etapa de desarrollo temprana y el marcador de selección se escinde tras la diferenciación (es decir, el desarrollo) mediada por la acción del polipéptido recombinasa en los sitios de reconocimiento de la recombinasa específica de sitio que flanquean el casete de selección.

En la presente descripción se proporcionan promotores adecuados que están inactivos en células ES indiferenciadas. Unir operativamente tales promotores a un gen de recombinasa permite la expresión, específicamente, tras la diferenciación. Como se describe en la presente descripción, los vectores dirigidos se diseñan con sitios de reconocimiento de la recombinasa específica de sitio en una orientación paralela que flanquea un marcador de selección, de modo que el polipéptido recombinasa dirija una escisión (es decir, delección) del marcador de selección tras la expresión. Los sitios de reconocimiento de la recombinasa específica de sitio también pueden colocarse en una orientación invertida que flanquea un marcador de selección, de modo que el polipéptido recombinasa dirija una inversión del marcador de selección tras la expresión. Para algunos marcadores de selección, la inversión puede ser suficiente para la inactivación. Sin embargo, también puede desearse la eliminación completa del marcador de selección. Cuando un casete de selección está flanqueado por sitios de reconocimiento de la recombinasa específica de sitio en una orientación paralela, la expresión del polipéptido recombinasa en una célula diferenciada causará que la célula escinda el marcador de selección del genoma. Si las células diferenciadas se mantienen en la selección, morirán debido a la delección del marcador de selección del genoma. De esta manera, las células ES indiferenciadas se mantienen y enriquecen en cultivo para su uso posterior como células donantes a un embrión huésped.

Como se describe en la presente descripción, la interrupción de un gen *Rs1* puede comprender un reemplazo o una

inserción/adición al gen *Rs1* o una porción del mismo con un inserto de ácido nucleico. En algunas modalidades, un inserto de ácido nucleico comprende un gen indicador. En algunas modalidades determinadas, un gen indicador se posiciona en una unión operativa con un promotor de *Rs1* endógeno. Tal modificación permite la expresión de un gen indicador, dirigida por un promotor de *Rs1* endógeno. Alternativamente, un gen indicador no se coloca en una unión operativa con un promotor de *Rs1* endógeno y se une operativamente a otro promotor.

Pueden usarse una variedad de genes indicadores (o restos detectables) en los vectores dirigidos descritos en la presente descripción. Los genes indicadores ilustrativos incluyen: por ejemplo, la β -galactosidasa (codificada por el gen *lacZ*), la proteína verde fluorescente (GFP), la proteína verde fluorescente potenciada (eGFP), MmGFP, la proteína azul fluorescente (BFP), la proteína azul fluorescente potenciada (eBFP), mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, DsRed, mOrange, mKO, mCitrine, Venus, YPet, la proteína amarilla fluorescente (YFP), la proteína amarilla fluorescente potenciada (eYFP), Emerald, CyPet, la proteína cian fluorescente (CFP), Cerulean, T-Sapphire, la luciferasa, la fosfatasa alcalina, o una de sus combinaciones. Los métodos descritos en la presente descripción demuestran la construcción de vectores dirigidos que emplean un gen indicador *lacZ* que codifica la β -galactosidasa, sin embargo, los expertos, al leer esta descripción, comprenderán que los roedores descritos en la presente descripción pueden generarse en ausencia de un gen indicador o con cualquier gen indicador conocido en la técnica.

Los vectores dirigidos *Rs1*, en algunas modalidades, comprenden secuencias de ADN que codifican un gen *Rs1* mutante (o variante), un marcador de selección y una recombinasa, y secuencias de *Rs1* de roedor (es decir, secuencias que flanquean de una región diana) para su inserción en el genoma de un roedor transgénico. La una o más mutaciones puntuales pueden introducirse (por ejemplo, mediante mutagénesis dirigida al sitio) en la secuencia codificante de un gen *Rs1* o secuencia codificante de RS1 (por ejemplo, un exón) de modo que un polipéptido RS1 deseado (por ejemplo, una variante de polipéptido RS1) se codifica por el gen *Rs1* mutante o la secuencia codificante de RS1. Tal secuencia de *Rs1* mutante puede unirse operativamente a una secuencia reguladora endógena (por ejemplo, un promotor) o un promotor constitutivo según se desee. Las Figuras 5-7 y 8-10 ilustran dos vectores dirigidos ilustrativos para producir mutaciones puntuales seleccionadas en un exón (por ejemplo, los exones tres y cinco, respectivamente) de un gen *Rs1* murino y una pequeña delección en los intrones circundantes con un casete que contiene un marcador de selección con fármaco que codifica la higromicina (Hyg) para la selección de colonias de células madre embrionarias (ES) mutantes. Como se describió en la sección de ejemplos, las pequeñas delecciones introducidas en los intrones de *Rs1* de ratón circundantes para cada mutación puntual se diseñaron para facilitar el cribado de las colonias de células ES mutantes (o variantes). Como se muestra en las Figuras 5 y 8, los vectores dirigidos también incluyeron cada uno una secuencia que codifica una recombinasa (por ejemplo, Cre) regulada por un miARN específico de células ES o un promotor específico de células germinales (por ejemplo, promotor de la protamina 1; Prot-Cre-SV40). El casete de selección con higromicina y las secuencias codificantes de la recombinasa Cre están flanqueadas por sitios de reconocimiento de la recombinasa *loxP* que permiten la escisión mediada por Cre del casete de selección con higromicina de una manera dependiente del desarrollo, por ejemplo, la progenie derivada de los roedores cuyas células germinales que contienen el gen *Rs1* mutante (o variante), descrito anteriormente, liberarán el marcador de selección durante el desarrollo (véanse las patentes de Estados Unidos núms. 8,697,851, 8,518,392, 8,354,389, 8,946,505 y 8,946,504). Esto permite, entre otras cosas, la escisión automática del casete de selección con higromicina de células diferenciadas o células germinales. Por tanto, antes del análisis fenotípico, el casete de selección con higromicina se elimina y quedan los exones de *Rs1* mutantes unidos operativamente al promotor de *Rs1* murino (Figuras 7 y 10).

Los vectores dirigidos *Rs1*, en algunos casos, pueden comprender secuencias de ADN correspondientes a un gen *Rs1* mutante (o variante), como se describió anteriormente, cuyo gen *Rs1* mutante (o variante) comprende un gen *Rs1*

heterólogo o una secuencia codificante de *Rs1* heteróloga. Las secuencias de *Rs1* heterólogas adecuadas se describen en la presente descripción y pueden sustituirse por secuencias ejemplificadas en la sección Ejemplos que aparece más abajo. Tales secuencias heterólogas también pueden modificarse genéticamente para contener mutaciones puntuales que codifican sustituciones de aminoácidos en comparación con una secuencia del polipéptido *Rs1* heterólogo de tipo salvaje u original.

Cuando sea apropiado, la región codificante del material genético o la(s) secuencia(s) de polinucleótido(s) que codifica(n) un polipéptido indicador (y/o un marcador de selección y/o una recombinasa), en su totalidad o en parte, o un polipéptido *Rs1* (por ejemplo, una variante de polipéptido *Rs1*) pueden modificarse para incluir codones optimizados para la expresión en el roedor (por ejemplo, véanse las patentes de Estados Unidos núms. 5,670,356 y 5,874,304). Las secuencias con codones optimizados son secuencias sintéticas, y, preferentemente, codifican el polipéptido idéntico (o un fragmento biológicamente activo de un polipéptido de longitud completa que tiene, sustancialmente, la misma actividad que el polipéptido de longitud completa) al codificado por el polinucleótido original sin codones optimizados. En algunas modalidades, la región codificante del material genético que codifica un polipéptido indicador (por ejemplo, *lacZ*), en su totalidad o en parte, puede incluir una secuencia alterada para optimizar el uso de codones en un tipo de célula particular (por ejemplo, una célula de roedor). En algunas modalidades, la región codificante del material genético que codifica un polipéptido *Rs1*, como se describe en la presente descripción, (por ejemplo, una variante de polipéptido *Rs1*), en su totalidad o en parte, puede incluir una secuencia alterada para optimizar el uso de codones en un tipo de célula particular (por ejemplo, una célula de roedor). Para dar un ejemplo, los codones del gen indicador o *Rs1* mutante que se insertan en el genoma de un roedor (roedor rata o ratón) pueden optimizarse para su expresión en una célula del roedor. Tal secuencia puede describirse como una secuencia con codones optimizados.

Se proporcionan composiciones y métodos para producir roedores que comprenden una interrupción o mutación en un gen *Rs1*, como se describe en la presente descripción, que incluyen composiciones y métodos para producir roedores que expresan un gen indicador bajo el control de secuencias reguladoras de *Rs1* tales como un promotor de *Rs1*, y roedores que expresan una variante de polipéptido *Rs1* bajo el control de secuencias reguladoras de *Rs1* tales como un promotor de *Rs1*. En algunas modalidades, también se proporcionan composiciones y métodos para producir roedores que expresan un indicador o una variante de polipéptido *Rs1* bajo el control de secuencias reguladoras endógenas tales como un promotor endógeno (por ejemplo, un promotor de *Rs1* endógeno). Los métodos incluyen insertar un vector dirigido, como se describe en la presente descripción, que comprende un gen indicador (por ejemplo, *lacZ*; véanse las Figuras 2-4), en el genoma de un roedor de modo que se elimine una porción de la secuencia codificante de un gen *Rs1*, en su totalidad o en parte. En algunas modalidades, los métodos incluyen insertar un vector dirigido en el genoma de un roedor, de modo que se eliminen los exones 1-3 de un gen *Rs1*.

La inserción de un gen indicador unido operativamente a un promotor de *Rs1* (por ejemplo, un promotor de *Rs1* endógeno) emplea una modificación relativamente mínima del genoma y resulta en la expresión del polipéptido indicador de una manera específica de *Rs1* en el roedor (por ejemplo, véase la Figura 11). En algunas modalidades, un roedor o célula, como se describe en la presente descripción, comprende un gen *Rs1* que comprende un vector dirigido, como se describe en la presente descripción; en algunas modalidades determinadas, un vector dirigido que aparece en la Figura 2 o 4.

En diversos casos, un gen *Rs1* interrumpido, como se describe en la presente descripción, incluye una o más (por ejemplo, la primera y la segunda) uniones de inserción resultantes de la inserción de un gen indicador.

En diversos casos, un gen *Rs1* interrumpido, como se describe en la presente descripción, incluye una primera unión de inserción que incluye una secuencia que es al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a la SEQ ID NO:33 y una segunda unión de inserción que incluye una

secuencia que es al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a la SEQ ID NO:34. En diversos casos, un gen *Rs1* interrumpido, como se describe en la presente descripción, incluye una primera unión de inserción que incluye una secuencia que es sustancialmente idéntica o idéntica a la SEQ ID NO: 33 y una segunda unión de inserción que incluye una secuencia que es sustancialmente idéntica o idéntica a la SEQ ID NO: 34.

En diversos casos, un gen *Rs1* interrumpido, como se describe en la presente descripción, incluye una primera unión de inserción que incluye una secuencia que es al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a la SEQ ID NO:33 y una segunda unión de inserción que incluye una secuencia que es al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a la SEQ ID NO:35. En diversos casos, un gen *Rs1* interrumpido, como se describe en la presente descripción, incluye una primera unión de inserción que incluye una secuencia que es sustancialmente idéntica o idéntica a la SEQ ID NO: 33 y una segunda unión de inserción que incluye una secuencia que es sustancialmente idéntica o idéntica a la SEQ ID NO: 35.

En diversos casos, un gen o alelo *Rs1* interrumpido, como se describe en la presente descripción, incluye una secuencia que es al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 25. En diversos casos, un gen o alelo *Rs1* interrumpido, como se describe en la presente descripción, incluye una secuencia que es sustancialmente idéntica o idéntica a la SEQ ID NO: 23 o la SEQ ID NO: 25.

En diversos casos, un gen o alelo *Rs1* interrumpido, como se describe en la presente descripción, comprende una delección de 13 716 pb de un gen o alelo *Rs1* endógeno. En diversos casos, un gen o alelo *Rs1* interrumpido, como se describe en la presente descripción, carece de una secuencia que sea sustancialmente idéntica o idéntica a la SEQ ID NO: 24.

Los métodos también incluyen insertar un vector dirigido, como se describe en la presente descripción, que codifica una variante de polipéptido RS1 (véanse las Figuras 5-7 y 8-10), en su totalidad o en parte, en el genoma de un roedor, de modo que se altere una porción (por ejemplo, un exón) de la secuencia codificante de un gen *Rs1*. En algunas modalidades, los métodos incluyen insertar el vector dirigido en el genoma de un roedor, de modo que un exón de un gen *Rs1* se muta para codificar una variante de polipéptido RS1.

La inserción de un gen *Rs1* mutante unido operativamente a un promotor de *Rs1* (por ejemplo, un promotor de *Rs1* endógeno) emplea una modificación relativamente mínima del genoma y resulta en la expresión de la variante de polipéptido RS1 en el roedor que es funcional y estructuralmente diferente a un polipéptido RS1 que aparece en un roedor de tipo salvaje. En algunas modalidades, un roedor o célula descritos en la presente descripción comprende un gen *Rs1* que comprende un vector dirigido, como se describe en la presente descripción; en algunas modalidades determinadas, un vector dirigido que aparece en la Figura 5 u 8.

En diversas modalidades, un gen *Rs1* mutante, como se describe en la presente descripción, incluye una o más (por ejemplo, la primera y segunda) uniones de inserción resultantes de la inserción de un vector dirigido, como se describe en la presente descripción.

En diversas modalidades, un gen *Rs1* mutante, como se describe en la presente descripción, incluye una primera unión de inserción que incluye una secuencia que es al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a la SEQ ID NO: 36 y una segunda unión de inserción que incluye una secuencia que es al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % o más) idéntica a la SEQ ID NO:37. En diversas modalidades, un gen *Rs1* mutante, como se describe en la presente descripción, incluye una primera unión de inserción que incluye una secuencia que es sustancialmente idéntica o idéntica a la SEQ ID NO: 36 y una segunda unión de inserción que incluye una secuencia que es

sustancialmente idéntica o idéntica a la SEQ ID NO: 37.

En diversas modalidades, un gen *Rs1* mutante, como se describe en la presente descripción, incluye una unión de inserción que incluye una secuencia que es al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a la SEQ ID NO: 38. En diversas modalidades, un gen *Rs1* mutante,
5 como se describe en la presente descripción, incluye una unión de inserción que incluye una secuencia que es sustancialmente idéntica o idéntica a la SEQ ID NO: 38.

En diversas modalidades, un gen *Rs1* mutante, como se describe en la presente descripción, comprende un tercer exón que incluye una mutación puntual, de manera que el gen *Rs1* mutante codifica un polipéptido RS1 que tiene una sustitución de aminoácidos C59S. En diversas modalidades, un gen *Rs1* mutante, como se describe en la presente
10 descripción, comprende un tercer exón que incluye una mutación de codones de TGT a AGT, de manera que el gen *Rs1* mutante codifica un polipéptido RS1 que tiene una sustitución de aminoácidos C59S.

En diversas modalidades, un gen *Rs1* mutante, como se describe en la presente descripción, incluye una primera unión de inserción que incluye una secuencia que es al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a la SEQ ID NO:39 y una segunda unión de inserción que
15 incluye una secuencia que es al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a la SEQ ID NO:40. En diversas modalidades, un gen *Rs1* mutante, como se describe en la presente descripción, incluye una primera unión de inserción que incluye una secuencia que es sustancialmente idéntica o idéntica a la SEQ ID NO: 39 y una segunda unión de inserción que incluye una secuencia que es sustancialmente idéntica o idéntica a la SEQ ID NO: 40.

En diversas modalidades, un gen *Rs1* mutante, como se describe en la presente descripción, incluye una unión de inserción que incluye una secuencia que es al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a la SEQ ID NO: 41. En diversas modalidades, un gen *Rs1* mutante,
20 como se describe en la presente descripción, incluye una unión de inserción que incluye una secuencia que es sustancialmente idéntica o idéntica a la SEQ ID NO: 41.

En diversas modalidades, un gen *Rs1* mutante, como se describe en la presente descripción, comprende un quinto exón que incluye una mutación puntual, de manera que el gen *Rs1* mutante codifica un polipéptido RS1 que tiene una sustitución de aminoácidos R141C. En diversas modalidades, un gen *Rs1* mutante, como se describe en la presente
25 descripción, comprende un quinto exón que incluye una mutación de codones de CGC a TGC, de manera que el gen *Rs1* mutante codifica un polipéptido RS1 que tiene una sustitución de aminoácidos R141C.

En diversas modalidades, un gen o alelo *Rs1* mutante, como se describe en la presente descripción, comprende una secuencia que es al menos 80 % (por ejemplo, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más) idéntica a la SEQ ID NO:27 o la SEQ ID NO:29. En diversas modalidades, un gen o alelo *Rs1* mutante,
30 como se describe en la presente descripción, comprende una secuencia que es sustancialmente idéntica o idéntica a la SEQ ID NO:27 o la SEQ ID NO:29.

Alternativamente, otros genes *Rs1* o secuencias codificantes de RS1 pueden emplearse en los métodos descritos en la presente descripción para generar roedores cuyos genomas contienen un gen *Rs1* mutante, como se describe en la presente descripción. Por ejemplo, un gen *Rs1* heterólogo puede introducirse en un roedor, cuyo gen *Rs1* heterólogo
35 codifica una variante de polipéptido RS1, como se describe en la presente descripción, (es decir, comprende una mutación que establece un fenotipo similar a la retinosquisis en un roedor). En otro ejemplo, un gen *Rs1* transgénico puede insertarse aleatoriamente en el genoma de un roedor y un gen *Rs1* endógeno se vuelve no funcional (por ejemplo, a través de la modificación genética, la disminución de la expresión génica con oligonucleótidos de ADN o ARN, etc.). En la presente descripción se proporcionan genes *Rs1* alternativos ilustrativos o secuencias codificantes de RS1. Los expertos, al leer esta descripción comprenderán que tales genes *Rs1* o secuencias codificantes de RS1
40

pueden emplearse en los métodos descritos en la presente descripción para generar roedores.

Los vectores dirigidos descritos en la presente descripción pueden introducirse en células ES y cribarse para seleccionar los clones ES que albergan un gen *Rs1* interrumpido o mutante, como se describe en la presente descripción, en Friendewey, D., y otros, 2010, *Methods Enzymol.* 476:295-307. Una variedad de embriones huésped puede emplearse en los métodos y composiciones descritos en la presente descripción. Por ejemplo, las células pluripotentes y/o totipotentes que tienen la modificación genética dirigida pueden introducirse en un embrión en etapa previa a la mórula (por ejemplo, un embrión en la etapa de 8 células) a partir de un organismo correspondiente. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos núms. 7,576,259, 7,659,442, 7,294,754, y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2008-0078000 AI. En otros casos, las células ES del donante pueden implantarse en un embrión huésped en la etapa de 2 células, la etapa de 4 células, la etapa de 8 células, la etapa de 16 células, la etapa de 32 células o la etapa de 64 células. Un embrión huésped también puede ser un blastocisto o puede ser un embrión previo al blastocisto, un embrión en etapa previa a la mórula, un embrión en etapa de mórula, un embrión en etapa de mórula no compactado o un embrión en etapa de mórula compactado.

En algunas modalidades, el método VELOCIMOUSE® (Poueymirou, W.T. y otros, 2007, *Nat. Biotechnol.* 25:91-99) puede aplicarse para inyectar células ES positivas en un embrión de 8 células para generar ratones heterocigóticos de generación F0 completamente derivados de células ES, listos para la elaboración de perfiles de expresión de *lacZ* o el cruzamiento hasta la homocigosidad. En la sección Ejemplo se proporcionan métodos ilustrativos para generar roedores que tienen un gen *Rs1* interrumpido o mutante.

Los métodos para generar roedores transgénicos, que incluyen los inactivados y con inserciones, se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Kitamura, D. y otros, 1991, *Nature* 350:423-6; Komori, T. y otros, 1993, *Science* 261:1171-5; Shinkai, Y. y otros, 1993, *Science* 259:822-5; Mansour, S.L. y otros, 1998, *Nature* 336:348-52; *Gene Targeting: A Practical Approach*, Joyner, ed., Oxford University Press, Inc., 2000; Valenzuela, D.M. y otros, 2003, *Nature Biotech.*

21(6):652-9; Adams, N.C. y N.W. Gale, en *Mammalian and Avian Transgenesis-New Approaches*, ed. Lois, S.P.a.C., Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 2006). Por ejemplo, la generación de roedores transgénicos puede implicar la interrupción de los loci genéticos de un gen endógeno de roedor y la introducción de un gen indicador en el genoma del roedor, en algunas modalidades, en la misma ubicación que el gen endógeno de roedor, o puede implicar la alteración de los loci genéticos de un gen endógeno de roedor y la introducción de una o más mutaciones en el genoma del roedor, en algunas modalidades, en la misma ubicación que el gen endógeno de roedor, lo que resulta en la expresión de una variante de polipéptido.

En la Figura 1 se proporciona una ilustración esquemática (que no está a escala) de la organización genómica de un gen *Rs1* de ratón. En la Figura 2 se proporciona un vector dirigido ilustrativo para la delección de una porción de la secuencia codificante del gen *Rs1* de ratón mediante el uso de un gen indicador. Como se ilustra, el ADN genómico que contiene los exones 1-3 (con la excepción del codón de inicio ATG en el exón 1) de un gen *Rs1* de ratón se elimina y reemplaza con un gen indicador y un casete de selección con fármaco autoeliminable flanqueado por sitios de reconocimiento de la recombinasa específica de sitio. El vector dirigido incluye una secuencia codificante de recombinasa que se une operativamente a un promotor que está regulado por el desarrollo, de manera que la recombinasa se expresa en células indiferenciadas. Tras la recombinación homóloga, los exones 1-3 de un gen *Rs1* endógeno de ratón se eliminan (o reemplazan) por la secuencia contenida en el vector dirigido, como se muestra, y los ratones modificados genéticamente que tienen un gen *Rs1* que tiene la estructura representada en la Figura 4 se crean a través de la escisión, mediada por Cre, del casete de neomicina durante el desarrollo y queda el gen indicador *lacZ* (fusionado a un codón de inicio de *Rs1* de ratón) unido operativamente al promotor de *Rs1* de ratón.

Los vectores dirigidos ilustrativos para crear mutaciones (por ejemplo, mutaciones de sustitución) en el gen *Rs1* de

ratón se proporcionan en las Figuras 5-7 y 8-10. Como se ilustra, un gen *Rs1* mutante de ratón (es decir, un gen *Rs1* mutante que tiene mutaciones puntuales en el exón tres o cinco) se crea con un vector dirigido que incluye un casete de selección con fármaco autoeliminable flanqueado por sitios de reconocimiento de la recombinasa específica de sitio colocados aguas abajo de un exón de *Rs1* mutante y dentro de un intrón de *Rs1* (véanse también las Figuras 5 u 8). El vector dirigido incluye una secuencia codificante de recombinasa que se une operativamente a un promotor que está regulado por el desarrollo, de manera que la recombinasa se expresa en células indiferenciadas. Tras la recombinación homóloga, un único exón (y porciones de intrones circundantes) de un gen *Rs1* endógeno de ratón se reemplaza por la secuencia contenida en el vector dirigido, como se muestra, y los ratones modificados genéticamente que tienen un gen *Rs1* mutante que tiene la estructura representada en la Figura 7 o 10 se crean a través de la escisión, mediada por Cre, del casete de selección durante el desarrollo y queda un gen *Rs1* mutante que tiene una mutación puntual en un único exón unido operativamente a un promotor de *Rs1* de ratón, y pequeñas deleciones (con un sitio *loxP* único) dentro de un(os) intrón(es) adyacente(s). Los genes *Rs1* mutantes resultantes codifican, cada uno, un polipéptido RS1 que incluye una sustitución de aminoácidos (por ejemplo, C59S o R141C).

Los promotores ilustrativos que pueden incluirse en los vectores dirigidos descritos en la presente descripción incluyen un promotor de la *protamina 1* (*Prm1*) (tal como el expuesto en la SEQ ID NO: 30), un promotor de *Blimp1* 1 kb (tal como el expuesto en la SEQ ID NO: 31) y un promotor de *Blimp1* 2 kb (tal como el expuesto en la SEQ ID NO: 32). Los promotores adecuados adicionales que pueden usarse en los vectores dirigidos descritos en la presente descripción incluyen los descritos en las patentes de Estados Unidos núms. 8,697,851, 8,518,392 y 8,354,389).

Un roedor fundador transgénico puede identificarse en base a la presencia de un gen indicador (o ausencia de *Rs1*) en su genoma y/o la expresión de un indicador en tejidos o células del roedor (o falta de expresión de RS1), o la presencia de una o más mutaciones puntuales en una secuencia codificante de *Rs1* (por ejemplo, un exón) y/o una deleción de una secuencia de *Rs1* no codificante (por ejemplo, un intrón) en su genoma y/o la expresión de una variante de polipéptido RS1 en tejidos o células del roedor (o falta de expresión del polipéptido RS1 de tipo salvaje). Un roedor fundador transgénico puede usarse luego para criar roedores adicionales que portan el gen indicador o el gen *Rs1* mutante, de esta manera se crean una serie de roedores que portan, cada uno, una o más copias de un gen *Rs1* interrumpido o mutante, como se describe en la presente descripción.

También pueden producirse roedores transgénicos de modo que contengan sistemas seleccionados que permitan la expresión regulada o dirigida de un trasgén o molécula de polinucleótido (por ejemplo, un inserto de ácido nucleico). Los sistemas ilustrativos incluyen el sistema de recombinasa Cre/*loxP* del bacteriófago P1 (véase, por ejemplo, Lakso, M. y otros, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232- 6236) y el sistema de recombinasa FLP/Frt de *S. cerevisiae* (O'Gorman, S. y otros, 1991, Science 251:1351-1355). Tales animales pueden proporcionarse a través de la construcción de animales transgénicos "dobles", por ejemplo, mediante el apareamiento de dos animales transgénicos, uno que contiene un trasgén que codifica un polipéptido seleccionado (por ejemplo, un indicador, una variante o polipéptido RS1 heterólogo) y el otro que contiene un trasgén que codifica una recombinasa (por ejemplo, una recombinasa Cre).

Otros métodos están disponibles para producir un animal no humano que comprende la modificación genética. Tales métodos incluyen, por ejemplo, la modificación de un genoma de células que no son ES (por ejemplo, un fibroblasto o una célula pluripotente inducida) y el empleo de la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) para transferir el genoma modificado genéticamente a una célula adecuada, por ejemplo, un ovocito enucleado, y la gestación de la célula modificada (por ejemplo, el ovocito modificado) en un animal no humano en condiciones adecuadas para formar un embrión.

Brevemente, los métodos para la transferencia nuclear incluyen las etapas de: (1) enucleo un ovocito; (2) aislar una célula o núcleo donante para combinarse con el ovocito enucleado; (3) insertar la célula o núcleo en el ovocito

5 enucleado para formar una célula reconstituida; (4) implantar la célula reconstituida en el útero de un animal para formar un embrión; y (5) permitir que se desarrolle el embrión. En tales métodos, los ovocitos se recuperan generalmente de animales muertos, aunque también pueden aislarse de un oviducto y/o ovario de animales vivos. Los ovocitos pueden madurarse antes de la enucleación en una variedad de medios conocidos por los expertos en la técnica. La enucleación del ovocito puede realizarse en una variedad de maneras conocidas por los expertos en la técnica. La inserción de una célula o núcleo donante en un ovocito enucleado para formar una célula reconstituida se logra, típicamente, mediante microinyección de una célula donante bajo la zona pelúcida antes de la fusión. La fusión puede inducirse mediante la aplicación de un pulso eléctrico de CD a través del plano de contacto/fusión (electrofusión), mediante la exposición de las células a sustancias químicas que promueven la fusión, tales como polietilenglicol, o por medio de un virus inactivado, tal como el virus Sendai. Una célula reconstituida se activa, típicamente, 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 inducido químicamente, penetración por los espermatozoides, aumento de los niveles de cationes divalentes en el ovocito y reducción de la fosforilación de las proteínas celulares (como por medio de inhibidores de cinasas) en el ovocito. Las células reconstituidas activadas, o embriones, se cultivan, típicamente, en un medio conocido por los expertos en la técnica y luego se transfieren al útero de un animal. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 7,612,250; la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núms. 2004-0177390 AI y 2008-0092249 AI; y la publicación de solicitud de patente internacional núms. WO 1999/005266 A2 y WO 2008/017234 AI.

Los métodos para modificar un genoma de roedor incluyen, por ejemplo, emplear una nucleasa con dedos de zinc (ZFN), una nucleasa efectora similar a un activador de la transcripción (TALEN), o una proteína Cas (es decir, un sistema CRISPR/Cas) para modificar un genoma para incluir un gen *Rs1* interrumpido o mutante, como se describe en la presente descripción.

El roedor de la presente invención es una rata o un ratón. En algunas modalidades, el roedor proporcionado es un ratón.

25 En algunas modalidades, un roedor, como se describe en la presente descripción, es un ratón de una cepa C57BL seleccionada de C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/KaLwN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr y C57BL/Ola. En algunas modalidades determinadas, un ratón, como se describe en la presente descripción, es una cepa 129 seleccionada del grupo que consiste en una cepa que es 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1 (por ejemplo, 129S1/SV, 129S1/SvIm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129/SvJae, 129S6 (129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2 (véase, por ejemplo, Festing y otros, 1999, Mammalian Genome 10:836; Auerbach, W. y otros, 2000, Biotechniques 29(5): 1024-1028, 1030, 1032). En algunas modalidades determinadas, un ratón modificado genéticamente, como se describe en la presente descripción, es una mezcla de una cepa 129 mencionada anteriormente y una cepa C57BL/6 mencionada anteriormente. En algunas modalidades determinadas, un ratón, como se describe en la presente descripción, es una mezcla de las cepas 129 mencionadas anteriormente, o una mezcla de las cepas BL/6 mencionadas anteriormente. En algunas modalidades determinadas, un ratón, como se describe en la presente descripción, es una mezcla o se deriva de las cepas BL/6 mencionadas anteriormente que no contienen (o carecen de) una mutación *Crb1^{rdB}* (es decir, comprende un *Crb1* de tipo salvaje). En algunas modalidades determinadas, una cepa 129 de la mezcla, como se describe en la presente descripción, es una cepa 129S6 (129/SvEvTac). En algunas modalidades, un ratón, como se describe en la presente descripción, es una cepa BALB, por ejemplo, la cepa BALB/c. En algunas modalidades, un ratón, como se describe en la presente descripción, es una mezcla de una cepa BALB y otra cepa mencionada anteriormente.

En algunas modalidades, un roedor, como se describe en la presente descripción, es una rata. En algunas modalidades determinadas, una rata, como se describe en la presente descripción, se selecciona de una rata Wistar,

una cepa LEA, una cepa Sprague Dawley, una cepa Fischer, L344, L6 y Dark Agouti. En algunas modalidades determinadas, una cepa de rata, como se describe en la presente descripción, es una mezcla de dos o más cepas que se seleccionan del grupo que consiste en Wistar, LEA, Sprague Dawley, Fischer, F344, F6 y Dark Agouti.

Una célula pluripotente y/o totipotente de rata puede 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 células pluripotentes y/o totipotentes de rata también pueden obtenerse a partir de una cepa derivada de una mezcla de dos o más cepas mencionadas anteriormente. Por ejemplo, una célula pluripotente y/o totipotente de rata puede ser de una cepa DA o una cepa ACI. Una cepa de rata ACI se caracteriza por tener agutí negro, con el vientre y las patas blancas y un haplotipo *RT1^{av1}*. Tales cepas están disponibles en una variedad de fuentes, que incluyen los laboratorios Harlan. Un ejemplo de una línea de células ES de rata, de una rata ACI, es una célula ES de rata ACI.G1. Una cepa de rata Dark Agouti (DA) se caracteriza por tener un pelaje agutí y un haplotipo *RT1^{av1}*. Tales ratas están disponibles en una variedad de fuentes que incluyen los laboratorios Charles River y Harlan. Ejemplos de una línea de células ES de rata, de una rata DA, son la línea de células ES de rata DA.2B y la línea de células ES de rata DA.2C. En algunos casos, las células pluripotentes y/o totipotentes de rata proceden de una cepa de rata endogámica. Véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2014-0235933 A1. También se han descrito en la técnica células ES de rata y métodos para producir ratas modificadas genéticamente. Véase, por ejemplo, el documento US 2014/0235933 A1, el documento US 2014/0310828 A1, Tong y otros. (2010) *Nature* 467:211-215, y Tong y otros (2011) *NatProtoc.* 6(6): doi:10.1038/nprot.2011.338.

Se proporcionan roedores que comprenden una mutación en un gen *Rs1*. En algunas modalidades, una mutación en un gen *Rs1* resulta en una pérdida de función. En particular, las mutaciones de pérdida de función incluyen mutaciones que resultan en una disminución o falta de expresión de RS1 y/o una disminución o falta de actividad/función de RS1. El roedor modificado genéticamente de la presente invención comprende una mutación en el exón 3 o el exón 5 de un gen *Rs1* endógeno de roedor, en donde la mutación en el exón 3 codifica una sustitución de aminoácidos C59S en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor, y la mutación en el exón 5 codifica una sustitución de aminoácidos R141C en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor. Las mutaciones de pérdida de función resultan en uno o más fenotipos en comparación con los roedores de tipo salvaje. En particular, el roedor de la presente invención es uno en donde el roedor muestra uno o más síntomas de retinosquiasis cuando el roedor es un roedor hembra homocigótico para la mutación, o cuando el roedor es un roedor macho hemicigótico para la mutación. La expresión de RS1 puede medirse directamente, por ejemplo, mediante el ensayo del nivel de RS1 en una célula o tejido de un roedor, como se describe en la presente descripción.

Típicamente, el nivel de expresión y/o actividad de RS1 disminuye si el nivel de expresión y/o actividad de RS1 es estadísticamente menor ($p \leq 0,05$) que el nivel de RS1 en una célula o roedor de control apropiado que no comprende la misma interrupción (por ejemplo, delección). En algunas modalidades, la concentración y/o actividad de RS1 disminuye en al menos 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o más en un animal hembra homocigótico o un macho hemicigótico con relación a una célula o roedor de control que carece de la misma interrupción (por ejemplo, delección).

En otras modalidades, las células u organismos que tienen una interrupción o mutación en un gen *Rs1* que reduce el nivel de expresión y/o la actividad de RS1 se seleccionan mediante el uso de métodos que incluyen, pero no se limitan a, análisis de transferencia Southern, secuenciación de ADN, análisis de PCR o análisis fenotípico. Tales células o roedores se emplean luego en diversos métodos y composiciones descritos en la presente descripción.

También se hace referencia a un gen *Rs1* endógeno que no se elimina (es decir, está intacto). En algunos casos, un gen *Rs1* endógeno se altera, interrumpe, elimina o reemplaza con una secuencia heteróloga (por ejemplo, una

secuencia codificante de un gen indicador). En algunos casos, la totalidad o sustancialmente la totalidad de un gen *Rs1* endógeno se reemplaza con un inserto de ácido nucleico; en algunos casos determinados, el reemplazo incluye el reemplazo de una porción de la secuencia codificante de un gen *Rs1* endógeno con un gen indicador (por ejemplo, *lacZ*) de modo que el gen indicador esté en una unión operativa con un promotor de *Rs1* (por ejemplo, un promotor de *Rs1* endógeno). En algunas modalidades, una porción de un gen indicador (por ejemplo, un fragmento funcional del mismo) se inserta en un gen *Rs1* endógeno no humano. En algunas modalidades, un gen indicador es un gen *lacZ*. En algunas modalidades, un gen indicador se inserta en una de las dos copias de un gen *Rs1* endógeno en un roedor hembra, lo que da lugar a un animal hembra no humano que es heterocigótico con respecto al gen indicador. En algunas modalidades, se proporciona un animal hembra no humano que es homocigótico para un gen indicador.

Se proporcionan roedores que comprenden una(s) mutación(es) en un gen *Rs1*. La mutación en un gen *Rs1* resulta en la expresión de una variante de polipéptido RS1 (por ejemplo, un polipéptido RS1 que incluye una o más sustituciones de aminoácidos en comparación con un polipéptido RS1 de tipo salvaje). La expresión de la variante de RS1 puede medirse directamente, por ejemplo, mediante el ensayo del nivel de la variante de RS1 en una célula o tejido de un roedor, como se describe en la presente descripción.

En otras modalidades, las células u organismos que tienen una(s) mutación(es) en un gen *Rs1* se seleccionan mediante el uso de métodos que incluyen, pero no se limitan a, análisis de transferencia Southern, secuenciación de ADN, análisis de PCR o análisis fenotípico. Tales células o roedores se emplean luego en diversos métodos y composiciones descritos en la presente descripción.

En algunas modalidades, un gen *Rs1* endógeno se altera o reemplaza con una secuencia de *Rs1* mutante (por ejemplo, una secuencia codificante de RS1 mutante, en su totalidad o en parte). En algunas modalidades, la totalidad o sustancialmente la totalidad de un gen *Rs1* endógeno se reemplaza con un inserto de ácido nucleico; en algunas modalidades determinadas, el reemplazo incluye el reemplazo de un exón de *Rs1* endógeno (por ejemplo, el exón tres o cinco) con un exón de *Rs1* mutante (por ejemplo, un exón sintético tres o el exón sintético cinco) de modo que el exón de *Rs1* mutante esté en una unión operativa con un promotor de *Rs1* (por ejemplo, un promotor de *Rs1* endógeno) y otros exones de *Rs1* endógenos. En algunas modalidades, un exón de *Rs1* mutante se inserta en un gen *Rs1* endógeno, cuyo exón de *Rs1* mutante contiene una o más mutaciones puntuales; en algunas modalidades determinadas, una mutación puntual. En algunas modalidades, un exón de *Rs1* mutante se inserta en una de las dos copias de un gen *Rs1* endógeno en un roedor hembra, lo que da lugar a un roedor hembra que es heterocigótico con respecto al exón de *Rs1* mutante. En algunas modalidades, se proporciona un roedor hembra que es homocigótico para un exón de *Rs1* mutante. En algunas modalidades, los roedores que comprenden un gen *Rs1* endógeno mutante comprenden además uno o más intrones de *Rs1* que incluyen una delección y/o un sitio de reconocimiento de la recombinasa específica de sitio (por ejemplo, *loxP*).

Modelo de retinosquiasis en roedor y métodos de uso

Los roedores descritos en la presente descripción proporcionan modelos animales mejorados para la retinosquiasis. En particular, los roedores, como se describe en la presente descripción, proporcionan modelos animales mejorados que se traducen en una patología de la enfermedad de la retinosquiasis ligada al cromosoma X, caracterizada, por ejemplo, por pérdida progresiva de la visión central y periférica debido a la degeneración de la retina.

Por ejemplo, una interrupción o mutación en un gen *Rs1*, como se describe en la presente descripción, puede resultar en diversos síntomas (o fenotipos) en los roedores proporcionados en la presente descripción. En algunas modalidades, la interrupción o mutación en un gen *Rs1* resulta en roedores que son muy normales en el nacimiento, pero que desarrollan uno o más síntomas al envejecer, por ejemplo, después de aproximadamente 8 semanas, 9 semanas, 10 semanas, 11 semanas, 12 semanas, 13 semanas, 14 semanas, 15 semanas, 16 semanas, 17 semanas, 18 semanas, 19 semanas, 20 semanas, 21 semanas, 22 semanas, 23 semanas, 24 semanas, 25 semanas, 26

semanas, 27 semanas, 28 semanas, 29 semanas, 30 semanas, 31 semanas, 32 semanas, 33 semanas, 34 semanas, 35 semanas, 36 semanas, 37 semanas, 38 semanas, 39 semanas, 40 semanas, 41 semanas, 42 semanas, 43 semanas, 44 semanas, 45 semanas, 46 semanas, 47 semanas, 48 semanas, 49 semanas, 50 semanas, 51 semanas, 52 semanas, 53 semanas, 54 semanas, 55 semanas, 56 semanas, 57 semanas, 58 semanas, 59 semanas, 60 semanas, etc. En algunas modalidades, la interrupción o mutación en un gen *Rs1* resulta en roedores que tienen una estructura y/o función anómalas de una o ambas retinas. En algunas modalidades, la interrupción o mutación en un gen *Rs1* resulta en roedores que demuestran uno o más síntomas (o fenotipos) asociados con la retinosquiasis. Tales síntomas (o fenotipos) pueden incluir: por ejemplo, división de una o ambas retinas en dos capas, estructura o arquitectura retiniana y/o macular anómala, estrías radiales en la fóvea (centro de la mácula), presencia de ampollas y/o rotura de vasos sanguíneos en los espacios creados por la división de una o ambas retinas en dos capas, fuga de sangre al cuerpo vítreo de una o ambas retinas, pérdida y/o deterioro de la visión, ceguera, pigmentación y/o degeneración retiniana, degeneración y separación del cuerpo vítreo de la retina, y desprendimiento de retina. En determinadas modalidades, los síntomas o fenotipos incluyen el desarrollo de estructuras quísticas dentro de la retina interna, y reducción de las respuestas de las ondas b y a del ERG en comparación con los roedores de tipo salvaje, seguido de una pérdida de células fotorreceptoras. En algunas modalidades, una interrupción o mutación en un locus *Rs1* de un roedor, como se describe en la presente descripción, resulta en fenotipos funcionales y morfológicos de inicio temprano (por ejemplo, en o para el día 15, 18, 21, 24 o 27 posnatal) de la retina en el roedor. En algunas modalidades, los defectos funcionales de inicio temprano de la retina pueden reflejarse por (i) reducción de la onda b con relación a la onda a (lo que resulta en un ERG negativo) en análisis de ERG adaptados a la luz y adaptados a la oscuridad; (ii) disminución de los valores de respuesta máxima y sensibilidad de las ondas b del ERG; (iii) disminución de los valores de respuesta máxima de las ondas a del ERG; o (iv) una combinación de (i)-(iii), en comparación con los roedores de tipo salvaje. En algunas modalidades, los defectos morfológicos de inicio temprano de la retina pueden reflejarse por esquisis, una zona elipsoide (EZ) más amplia, una retina externa más delgada o una de sus combinaciones, en comparación con los roedores de tipo salvaje. En algunas modalidades, los roedores descritos en la presente descripción proporcionan sistemas *in vivo* mejorados para identificar y desarrollar agentes terapéuticos candidatos para el tratamiento de la retinosquiasis (por ejemplo, retinosquiasis ligada al cromosoma X). Por tanto, en al menos algunas modalidades, los roedores descritos en la presente descripción proporcionan modelos animales mejorados para la retinosquiasis ligada al cromosoma X y/o enfermedades oculares y pueden usarse para el desarrollo y/o identificación de agentes terapéuticos para el tratamiento y/o prevención de enfermedades, trastornos o afecciones relacionados con los ojos.

Los roedores, como se describe en la presente descripción, proporcionan un sistema *in vivo* mejorado y una fuente de materiales biológicos (por ejemplo, células) que carecen de la expresión de RS1 o que expresan variantes de polipéptidos RS1 que son útiles para una variedad de ensayos. En diversas modalidades, los roedores descritos en la presente descripción se usan para desarrollar agentes terapéuticos que tratan, previenen y/o inhiben uno o más síntomas asociados con la falta de expresión y/o actividad de RS1 (por ejemplo, terapia/reemplazo génico). En diversas modalidades, los roedores descritos en la presente descripción se usan para desarrollar agentes terapéuticos que tratan, previenen y/o inhiben uno o más síntomas asociados con la expresión de variantes de polipéptidos RS1. Debido a la expresión de variantes de polipéptidos RS1, los roedores descritos en la presente descripción son útiles para su uso en diversos ensayos para determinar las consecuencias funcionales en la estructura y el desarrollo retinianos. En algunas modalidades, los roedores descritos en la presente descripción proporcionan un modelo animal para el cribado de moléculas implicadas en la estructura y/o función de RS1.

Los roedores descritos en la presente descripción también proporcionan un sistema *in vivo* para identificar un agente terapéutico para tratar, prevenir y/o inhibir la pérdida de visión progresiva resultante de la degeneración de la

estructura y/o función de una o ambas retinas. En algunas modalidades, un efecto de un agente terapéutico se determina *in vivo*, mediante la administración de dicho agente terapéutico a un roedor cuyo genoma comprende un gen *Rs1*, como se describe en la presente descripción.

5 Los roedores descritos en la presente descripción también proporcionan modelos animales mejorados para enfermedades, trastornos o afecciones relacionados con los ojos. En particular, los roedores, como se describe en la presente descripción, proporcionan modelos animales mejorados que se traducen en afecciones caracterizadas por una ruptura de la adhesión célula a célula en las capas neurosensoriales de una o ambas retinas.

10 Los roedores pueden recibir un agente terapéutico de prueba por cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante inyección intravenosa, intraperitoneal o intravítrea. Tales animales pueden incluirse en un estudio inmunológico, para determinar el efecto del agente terapéutico sobre la visión (por ejemplo, el efecto sobre la función neurosensorial de la retina) de los roedores en comparación con los roedores de control apropiados que no recibieron el agente terapéutico. También puede realizarse una biopsia o evaluación anatómica del tejido animal (por ejemplo, tejido ocular) y/o puede recolectarse una muestra de sangre.

15 En diversas modalidades, los roedores descritos en la presente descripción se usan para identificar, cribar y/o desarrollar agentes terapéuticos candidatos (por ejemplo, anticuerpos) que rescatan la función del fotorreceptor en una o ambas retinas. En diversas modalidades, los roedores descritos en la presente descripción se usan para determinar la eficacia del suministro del gen *Rs1* a los fotorreceptores. En algunas modalidades, los roedores descritos en la presente descripción se usan para determinar y/u optimizar el diseño de vectores de una o más terapias génicas retinianas candidatas que codifican un polipéptido RS1.

20 En diversas modalidades, los roedores descritos en la presente descripción se usan para determinar los perfiles farmacocinéticos de un fármaco candidato, por ejemplo, un fármaco para la terapia génica de *Rs1*. En diversas modalidades, uno o más roedores, descritos en la presente descripción y uno o más roedores de control o de referencia se exponen, cada uno, a uno o más fármacos candidatos, por ejemplo, fármacos para la terapia génica de *Rs1*, en diversas dosis (por ejemplo, 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/mg, 7,5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, o 50 mg/kg o más). Los fármacos candidatos, por ejemplo, fármacos para la terapia génica de *Rs1*, pueden administrarse a través de cualquier vía de administración deseada que incluye vías de administración parenterales y no parenterales para su evaluación en los roedores descritos en la presente descripción. Las vías parenterales incluyen, por ejemplo, intravenosa, intraarterial, intraportal, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intraespinal, intratecal, intracerebroventricular, intracraneal, intrapleural u otras vías de inyección. Las vías no parenterales incluyen, por ejemplo, oral, nasal, transdérmica, pulmonar, rectal, bucal, vaginal, ocular. La administración también puede ser mediante infusión continua, administración local, liberación sostenida a partir de implantes (geles, membranas o similares), y/o inyección intravenosa. La sangre se aísla de los roedores en diversos puntos de tiempo (por ejemplo, 0 hora, 6 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, o hasta 30 o más días).
35 Pueden realizarse diversos ensayos para determinar los perfiles farmacocinéticos de los fármacos administrados mediante el uso de muestras obtenidas a partir de los roedores descritos en la presente descripción, que incluyen, pero no se limitan a, IgG total, respuesta contra el fármaco, aglutinación, etc.

40 En diversas modalidades, los roedores descritos en la presente descripción se usan para determinar la eficacia terapéutica de uno o más fármacos candidatos, por ejemplo, fármacos para la terapia génica de *Rs1*. En diversas modalidades, uno o más roedores descritos en la presente descripción y uno o más roedores de control o referencia se exponen, cada uno, a uno o más fármacos candidatos, por ejemplo, fármacos para la terapia génica de *Rs1*, a diversas dosis (por ejemplo, 0,1 mg/ μ l, 0,2 mg/ μ l, 0,3 mg/ μ l, 0,4 mg/ μ l, 0,5 mg/ μ l, 0,6 mg/ μ l, 0,7 mg/ μ l, 0,8 mg/ μ l, 0,9 mg/ μ l, 1,0 mg/ μ l, 1,1 mg/ μ l, 1,2 mg/ μ l, 1,3 mg/ μ l, 1,4 mg/ μ l, 1,5 mg/ μ l, 1,6 mg/ μ l, 1,7 mg/ μ l, 1,8 mg/ μ l, 1,9 mg/ μ l, 2,0 mg/ μ l, 2,1

mg/μl, 2,2 mg/μl, 2,3 mg/μl, 2,4 mg/μl, 2,5 mg/μl, 2,6 mg/μl, 2,7 mg/μl, 2,8 mg/μl, 2,9 mg/μl, 3,0 mg/μl, 3,1 mg/μl, 3,2 mg/μl, 3,3 mg/μl, 3,4 mg/μl, 3,5 mg/μl, 3,6 mg/μl, 3,7 mg/μl, 3,8 mg/μl, 3,9 mg/μl, 4,0 mg/μl, 4,1 mg/μl, 4,2 mg/μl, 4,3 mg/μl, 4,4 mg/μl, 4,5 mg/μl, 4,6 mg/μl, 4,7 mg/μl, 4,8 mg/μl, 4,9 mg/μl o 5,0 mg/μl o más). En algunas modalidades, los fármacos candidatos, por ejemplo, fármacos para la terapia génica de *Rs1*, se dan a un roedor descrito en la presente descripción en el momento del nacimiento o poco después del nacimiento, por ejemplo, dentro de 18, 15, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 día después del nacimiento. Los fármacos candidatos, por ejemplo, los fármacos para la terapia génica de *Rs1*, se administran preferentemente a través de una vía intravítrea, sin embargo, cualquier vía de administración deseada, que incluye vías de administración parenterales y no parenterales (véase más arriba), puede evaluarse en los roedores descritos en la presente descripción. En diversas modalidades, uno o más fármacos candidatos, por ejemplo, fármacos para la terapia génica de *Rs1*, se inyectan a través de una vía intravítrea a diversos volúmenes (por ejemplo, 1 μl, 2 μl, 3 μl, 4 μl, 5 μl, 6 μl, 7 μl, 8 μl, 9 μl, 10 μl, 11 μl, 12 μl, 13 μl, 14 μl, 15 μl, 16 μl, 17 μl, 18 μl, 19 μl, 20 μl, 21 μl, 22 μl, 23 μl, 24 μl, 25 μl, 26 μl, 27 μl, 28 μl, 29 μl, 30 μl, 31 μl, 32 μl, 33 μl, 34 μl, 35 μl, 36 μl, 37 μl, 38 μl, 39 μl, 40 μl, 41 μl, 42 μl, 43 μl, 44 μl, 45 μl, 46 μl, 47 μl, 48 μl, 49 μl o 50 μl o más). Las inyecciones pueden ser continuas o seguir un curso de tiempo específico (por ejemplo, semanal, quincenal, mensual, etc.). La función retiniana y/o la agudeza visual se determinan mediante el uso de ensayos conocidos en la técnica y/o descritos en la presente descripción en diversos puntos de tiempo (por ejemplo, 0 horas, 6 horas, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días, 7 días, 8 días, 9 días, 10 días, 11 días, 15, 18, 21, 24 o hasta 30 o más días). Pueden realizarse diversos análisis funcionales y/o morfológicos en las retinas y/o copas oculares recolectadas de los roedores descritos en la presente descripción y uno o más roedores de control o referencia, después de la administración de uno o más fármacos candidatos, por ejemplo, fármacos para la terapia génica de *Rs1*, para determinar el efecto sobre la función de RS1 y/o los procesos dependientes de RS1.

En diversas modalidades, los roedores, como se describe en la presente descripción, se usan para medir el efecto terapéutico de restaurar la actividad de *Rs1* y el efecto sobre la estructura y/o función retiniana como resultado de cambios celulares en el ojo. En diversas modalidades, un roedor, como se describe en la presente descripción, o las células aisladas a partir de este se exponen a un fármaco candidato, por ejemplo, un fármaco para la terapia génica de *Rs1*, y, después de un período de tiempo subsecuente, se analizan para determinar los efectos sobre los procesos dependientes de *Rs1* (o interacciones).

Las células (por ejemplo, las células retinianas) de los roedores, como se describe en la presente descripción, pueden aislarse y usarse sobre una base ad hoc, o pueden mantenerse en cultivo por muchas generaciones. En diversas modalidades, las células de un roedor descrito en la presente descripción se inmortalizan (por ejemplo, a través del uso de un virus, por fusión de células, etc.) y se mantienen en cultivo indefinidamente (por ejemplo, en cultivos en serie).

Los roedores descritos en la presente descripción proporcionan un sistema *in vivo* para el análisis y prueba de un fármaco o vacuna. En diversas modalidades, un fármaco o vacuna candidata puede suministrarse a uno o más roedores descritos en la presente descripción, seguido de la monitorización de los roedores para determinar una o más de las respuestas inmunitarias al fármaco o vacuna, el perfil de seguridad del fármaco o vacuna, o el efecto sobre una enfermedad o afección y/o uno o más síntomas de la enfermedad o afección. Los métodos ilustrativos usados para determinar el perfil de seguridad incluyen mediciones de toxicidad, concentración de dosis óptima, eficacia del fármaco o vacuna, y posibles factores de riesgo. Tales fármacos o vacunas pueden mejorarse y/o desarrollarse en tales roedores.

La eficacia de la vacuna puede determinarse de varias maneras. Brevemente, los roedores descritos en la presente descripción se vacunan mediante el uso de los métodos conocidos en la técnica y luego se exponen a una vacuna, o se administra una vacuna a roedores ya infectados. La respuesta de un(os) roedor(es) a una vacuna puede medirse

mediante la monitorización y/o realización de uno o más ensayos en el(los) roedor(es) (o células aisladas a partir de estos) para determinar la eficacia de la vacuna. Luego, se compara la respuesta de un(os) roedor(es) a la vacuna con los animales de control, mediante el uso de una o más medidas conocidas en la técnica y/o descritas en la presente descripción.

- 5 La eficacia de la vacuna puede determinarse además mediante ensayos de neutralización viral. Brevemente, los roedores descritos en la presente descripción se inmunizan y el suero se recolecta en diversos días después de la inmunización. Las diluciones en serie de suero se incuban previamente con un virus, durante este tiempo los anticuerpos en el suero que son específicos para el virus se unirán a este. Luego, la mezcla de virus/suero se añade a las células permisivas para determinar la infectividad mediante un ensayo de placas o un ensayo de
10 microneutralización. Si los anticuerpos en el suero neutralizan el virus, hay menos placas o menos unidades relativas de luciferasa en comparación con un grupo de control.

- Los roedores descritos en la presente descripción proporcionan un sistema *in vivo* para evaluar las propiedades farmacocinéticas y/o la eficacia de un fármaco (por ejemplo, un fármaco de suministro del gen *Rs1*). En diversas modalidades, un fármaco puede suministrarse o administrarse a uno o más roedores descritos en la presente descripción, seguido de la monitorización o la realización de uno o más ensayos en los roedores (o células aisladas a partir de estos), para determinar el efecto del fármaco sobre el roedor. Las propiedades farmacocinéticas incluyen, pero no se limitan a, la manera en que un roedor procesa el fármaco en diversos metabolitos (o la detección de la presencia o ausencia de uno o más metabolitos del fármaco, que incluyen, pero no se limitan a, metabolitos tóxicos), la semivida del fármaco, los niveles circulantes del fármaco después de su administración (por ejemplo, concentración
15 sérica del fármaco), respuesta contra el fármaco (por ejemplo, anticuerpos contra el fármaco), absorción y distribución del fármaco, vía de administración, vías de excreción y/o eliminación del fármaco. En algunas modalidades, las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los fármacos se monitorean en o a través del uso de los roedores descritos en la presente descripción.

- En algunas modalidades, la realización de un ensayo incluye determinar el efecto sobre el fenotipo y/o el genotipo del roedor al que se administra el fármaco. En algunas modalidades, la realización de un ensayo incluye determinar la variabilidad lote a lote para un fármaco. En algunas modalidades, la realización de un ensayo incluye determinar las diferencias entre los efectos de un fármaco administrado a un roedor descrito en la presente descripción y un roedor de referencia. En diversas modalidades, los roedores de referencia pueden tener una modificación descrita en la presente descripción, una modificación que es diferente a la descrita en la presente descripción o ninguna modificación (es
20 decir, un roedor de tipo salvaje).

- Los parámetros ilustrativos que pueden medirse en roedores (o en y/o mediante el uso de las células aisladas a partir de estos) para evaluar las propiedades farmacocinéticas de un fármaco incluyen, pero no se limitan a, aglutinación, autofagia, división celular, muerte celular, hemólisis mediada por complemento, integridad del ADN, título de anticuerpos específicos al fármaco, metabolismo del fármaco, matrices de expresión génica, actividad metabólica, actividad mitocondrial, estrés oxidativo, fagocitosis, biosíntesis de proteínas, degradación de proteínas, secreción de
35 proteínas, respuesta al estrés, concentración del fármaco en el tejido diana, concentración del fármaco en el tejido que no es diana, actividad transcripcional y similares. En diversas modalidades, los roedores descritos en la presente descripción se usan para determinar una dosis farmacéuticamente efectiva de un fármaco.

Kits

- 40 También se describe un paquete o kit que comprende uno o más contenedores rellenos con al menos un roedor, una célula no humana, un fragmento de ADN y/o el vector dirigido, como se describe en la presente descripción. Los kits pueden usarse en cualquier método aplicable (por ejemplo, un método de investigación). Opcionalmente, asociado con tal(es) contenedor(es) puede haber un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la

fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, el aviso refleja (a) la aprobación por parte de la agencia de la fabricación, el uso o la venta para la administración humana, (b) instrucciones de uso, o ambos, o un contrato que rige la transferencia de materiales y/o productos biológicos (por ejemplo, un roedor o una célula no humana, como se describe en la presente descripción) entre dos o más entidades.

- 5 Otras características de la descripción se harán evidentes en el curso de las siguientes descripciones de las modalidades ilustrativas que se dan para la ilustración y no pretenden ser limitantes.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir a los expertos en la técnica cómo producir y usar los métodos y composiciones de la presente descripción, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. A menos que se indique de cualquier otra manera, la temperatura se indica en Celsius, y la presión es la atmosférica o cercana a ella.

Ejemplo 1. Generación de líneas de restinoschisin-1 en roedor modificadas genéticamente

Este ejemplo ilustra la construcción de una serie de vectores dirigidos para crear modificaciones en un locus Restinoschisin-1 (*Rs1*) de un roedor. En particular, este ejemplo describe específicamente la construcción de vectores dirigidos para crear una interrupción en un locus *Rs1* (es decir, un alelo deficiente) e introducir una o más mutaciones puntuales en uno o más exones de la secuencia codificante en un locus *Rs1*, lo que resulta en la producción de un gen *Rs1* mutante que codifica una variante de polipéptido RS1 que tiene una o más sustituciones de aminoácidos en comparación con un polipéptido RS1 original. Los alelos mutantes, se construyeron mediante el uso de fragmentos de ADN sintético que incluían exones únicos que contenían mutaciones puntuales (véase más abajo). Como se describe más abajo, los oligonucleótidos de secuenciación se diseñaron para regiones de homología de ratón y control de calidad de la ligadura. Se clonó un casete autoeliminable (SDC) que contiene un gen de resistencia a higromicina para crear un donante para dirigirlo a clones de cromosomas artificiales bacterianos (BAC). Se confirmaron dos donantes separados específicos para cada mutación puntual mediante PCR y secuenciación de Sanger. Los donantes se linealizaron para eliminar la cadena principal y se usaron para dirigirlos al ADN del clon BAC que contiene un gen *Rs1* de roedor, para crear genes *Rs1* mutantes. Los BAC modificados se confirmaron mediante selección con fármaco, PCR y secuenciación de Sanger a través de las uniones de homología, electroforesis PFG y análisis Illumina.

Brevemente, para el alelo deficiente, se produjo una delección de los exones 1-3 de la secuencia codificante (es decir, que comienza 3' del codón ATG en el exón uno hasta el extremo 3' del exón tres, lo que resulta en una delección de 13 716 pb) de un gen *Rs1* de ratón mediante el uso de una construcción indicadora *lacZ* colocada en una unión operativa con un promotor de *Rs1* de ratón (es decir, en marco con el codón ATG del exón uno). El vector dirigido *Rs1-lacZ-SDC* se construyó para crear una interrupción en un locus *Rs1* endógeno de ratón como se describió previamente (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 6,586,251; Valenzuela y otros, 2003, Nature Biotech. 21(6):652-659; y Adams, N.C. y N.W. Gale, en Mammalian and Avian Transgenesis-New Approaches, ed. Lois, S.P.a.C., Springer Verlag, Berlín Heidelberg, 2006). Un vector dirigido ilustrativo (o construcción de ADN) para la creación de un alelo deficiente de *Rs1* se expone en la Figura 2.

Brevemente, el vector dirigido *Rs1-lacZ-SDC* se generó mediante el uso del clon RP23-21308 (Invitrogen) del cromosoma artificial bacteriano (BAC) de ratón y un casete de selección con neomicina autoeliminable (*lacZ-pA-ICeul-loxP-mPrr1-Crei-SV40pA-hUbl-em7-Neo-PGKpA-loxP*), como se describió previamente (véanse, las patentes de Estados Unidos núms. 8,697,851, 8,518,392 y 8,354,389). El vector dirigido *Rs1-lacZ-SDC* incluyó una secuencia codificante de la recombinasa Cre que se une operativamente a un promotor de la protamina 1 de ratón que está regulado por el desarrollo, de manera que la recombinasa se expresa en células indiferenciadas. Tras la recombinación homóloga, una delección que incluye los nucleótidos 3' del codón ATG en el exón uno hasta los últimos

seis nucleótidos antes del extremo 3' del exón tres (13 716 pb) de un gen *Rs1* endógeno murino se reemplaza por la secuencia contenida en el vector dirigido (~8202 pb). El casete de selección con fármaco se elimina de una manera dependiente del desarrollo, es decir, la progenie derivada de los ratones cuyas células de la línea germinal contienen un gen *Rs1* interrumpido descrito anteriormente, liberarán el marcador de selección de las células diferenciadas durante el desarrollo (véase las patentes de Estados Unidos núms. 8,697,851, 8,518,392 y 8,354,389).

5 Para un primer alelo mutante, el clon RP23-213O8 del cromosoma artificial bacteriano (BAC) de ratón se modificó para introducir una mutación puntual en el exón tres (TGT a AGT) de un gen *Rs1* endógeno, de modo que el gen *Rs1* mutante resultante codificaría el polipéptido RS1 que tiene una sustitución de aminoácidos C59S (Figura 5). Se realizaron deleciones adicionales en los intrones dos (25 pb) y tres (28 pb) para facilitar el cribado de los clones positivos (Figura 6). La mutación puntual y las deleciones se introdujeron mediante el uso de un fragmento sintético producido mediante la síntesis de ADN de *novo* (GeneScript, Piscataway, NJ). El fragmento sintetizado, que incluyó el exón mutante tres y la secuencia intrónica circundante (5' y 3'), se contuvo en una cadena principal de plásmido y se propagó en bacterias bajo selección con ampicilina. Un gen de resistencia a higromicina se ligó al fragmento sintético y se le añadieron brazos de homología mediante el uso de enzimas de restricción para crear el vector dirigido para la recombinação homóloga con el BAC RP23-213O8 (Figura 5). El clon BAC RP23-213O8 modificado resultante se electroporó luego en células ES (véase más abajo). El vector dirigido Rs1C59S-SDC incluyó una secuencia codificante de recombinasa Cre que se une operativamente al promotor de la protamina 1 de ratón que está regulado por el desarrollo, de manera que la recombinasa se expresa en células indiferenciadas (Figura 5; véanse también, las patentes de Estados Unidos núms. 8,697,851, 8,518,392 y 8,354,389). Tras la recombinação homóloga, el exón tres de *Rs1* sintético mutado se inserta en el lugar del exón tres de un locus *Rs1* endógeno murino y las pequeñas deleciones en los intrones circundantes (es decir, los intrones dos y tres) se producen por la secuencia contenida en el vector dirigido. El casete de selección con fármaco se elimina de una manera dependiente del desarrollo, es decir, la progenie derivada de los ratones cuyas células de la línea germinal contienen un gen *Rs1* mutado descrito anteriormente, liberarán el marcador de selección de las células diferenciadas durante el desarrollo (Figura 7; véanse también las patentes de Estados Unidos núms. 8,697,851, 8,518,392 y 8,354,389). El ADN endógeno que contiene exones, intrones y regiones no traducidas (UTR) circundantes no se modificó por la mutagénesis y el casete de selección. El análisis de la secuencia del vector dirigido confirmó todos los exones, intrones, señales de corte y empalme y el marco abierto de lectura del gen *Rs1* mutante.

15 Para un segundo alelo mutante, el clon RP23-213O8 del cromosoma artificial bacteriano (BAC) de ratón se modificó para introducir una mutación puntual en el exón cinco (CGC a TGC) de un gen *Rs1* endógeno, de modo que el gen *Rs1* mutante resultante produciría un polipéptido RS1 que tiene una sustitución de aminoácidos R141C (Figura 8). En particular, se insertó un exón sintético cinco que contenía la mutación puntual R141C descrita anteriormente en lugar del exón cinco de tipo salvaje, junto con deleciones adicionales en el intrón cuatro (10 pb) y cinco (29 pb), que se incluyeron para facilitar el cribado de los clones positivos (Figura 9). El fragmento sintético producido mediante la síntesis de ADN de *novo* (GeneScript, Piscataway, NJ). El fragmento sintetizado, que incluyó el exón mutante cinco y la secuencia intrónica circundante (5' y 3'), se contuvo en una cadena principal de plásmido y se propagó en bacterias bajo selección con ampicilina. Un casete que incluía un gen de resistencia a higromicina (mediante el uso de un *loxP*-mP_{rm1}-Crei-pA-hUbl-em7-Hygro-pA-*loxP*, 5032 pb) se ligó al fragmento sintético y se añadió con brazos de homología mediante el uso de enzimas de restricción para crear el vector dirigido para la recombinação homóloga con el BAC RP23-213O8 (Figura 8). El clon BAC RP23-213O8 modificado resultante se electroporó luego en células ES (véase más abajo). El vector dirigido Rs1R141C-SDC incluyó una secuencia codificante de recombinasa Cre que se une operativamente al promotor de la protamina 1 de ratón que está regulado por el desarrollo, de manera que la recombinasa se expresa en células indiferenciadas (Figura 8; véanse también, las patentes de Estados Unidos núms.

40

8,697,851, 8,518,392 y 8,354,389). Tras la recombinación homóloga, el exón cinco de *Rs1* sintético mutado se inserta en el lugar del exón cinco de un locus *Rs1* endógeno murino y las pequeñas deleciones en los intrones circundantes (es decir, los intrones cuatro y cinco) se producen por la secuencia contenida en el vector dirigido. El casete de selección con fármaco se elimina de una manera dependiente del desarrollo, es decir, la progenie derivada de los ratones cuyas células de la línea germinal contienen un gen *Rs1* mutado descrito anteriormente, liberarán el marcador de selección de las células diferenciadas durante el desarrollo (Figura 10; véanse también las patentes de Estados Unidos núms. 8,697,851, 8,518,392 y 8,354,389). El ADN endógeno que contiene exones, intrones y regiones no traducidas (UTR) circundantes no se modificó por la mutagénesis y el casete de selección. El análisis de la secuencia del vector dirigido confirmó todos los exones, intrones, señales de corte y empalme y el marco abierto de lectura del gen *Rs1* mutante.

La construcción de cada uno de los vectores dirigidos se confirmó mediante reacción en cadena de la polimerasa y análisis de las secuencias, y luego se usaron para electroporar células madre embrionarias (ES) de ratón para crear células ES modificadas que comprenden los genes deficientes y mutantes de *Rs1*. Las células ES de ratón usadas para la electroporación fueron de un fondo híbrido (50 % 129/S6/SvEv/Tac, 50 % C57BL/6NTac; Auerbach, W. y otros (2000) *Biotechniques* 29(5): 1024-8, 1030, 1032). Los clones resistentes al fármaco se recolectaron 10 días después de la electroporación y se cribaron mediante TAQMAN® y cariotipado para determinar el direccionamiento correcto como se describió previamente (Valenzuela y otros, *supra*; Frenthewey, D. y otros, 2010, *Methods Enzymol.* 476:295-307) mediante el uso de conjuntos de cebadores/sondas que detectaron la introducción apropiada del gen indicador *lacZ* o las mutaciones puntuales en un gen *Rs1* endógeno (Tabla 1 y Figuras 3, 6 y 9). Los clones positivos de células ES se confirmaron mediante secuenciación.

Los clones positivos de células ES se usaron luego para implantar ratones hembra mediante el uso del método VELOCIMOUSE® (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 7,294,754; DeChiara, T.M. y otros, 2010, *Methods Enzymol.* 476:285-94; DeChiara, T.M., 2009, *Methods Mol. Biol.* 530:311-24; Poueymirou y otros, 2007, *Nat. Biotechnol.* 25:91-9), en el que se inyectaron células ES transfectadas en embriones Swiss Webster no compactados en etapa de 8 células, para producir ratones sanos de generación F0 completamente derivados de células ES heterocigóticas para los genes deficientes o mutantes de *Rs1*. Se ha informado que las líneas de ratón C57BL/6N contienen una mutación (*Crb1^{rdB}*) que complica su uso en los modelos animales de formación de degeneración retiniana (véase, por ejemplo, Mattapallil, M.J. y otros, 2012, *Immunol. Microbiol.* 53(6):2921-7; Mehalow, A.K. y otros, 2003, *Hum. Mol. Genet.* 12:2179-89). Esta mutación se corrigió mediante el cruzamiento de machos heterocigóticos de generación F0 con hembras C57B16/NTac *Crbs1* para evitar cualquier posible complicación de esta mutación. Los heterocigóticos de F1 resultantes de estos cruzamientos se cruzaron para producir homocigóticos de generación F2 y ratones de tipo salvaje para análisis fenotípicos.

La generación de las líneas de ratón *Rs1* modificadas genéticamente descritas anteriormente resultó en la creación de uniones de nucleótidos únicas en cada locus *Rs1* modificado genéticamente. Para el alelo deficiente, la secuencia de nucleótidos a través del punto de unión aguas arriba incluyó lo siguiente, que indica la secuencia 5' de *Rs1* endógeno de ratón y un codón ATG de *Rs1* de ratón (en letra mayúscula contenida entre paréntesis con el codón ATG indicado entre corchetes) contiguo con la secuencia codificante de *lacZ* (letra minúscula): (GCTCTCCACT TCACTTAGAT CTTGCTGTGA CCAAGGACAA GGAGAAA[ATG]) ggtaccgatt taaatgatcc agtggctcctg cagaggagag attgggagaa (SEQ ID NO:33). La secuencia de nucleótidos a través del punto de unión aguas abajo incluyó lo siguiente, que indica la secuencia del casete (letra minúscula con un sitio NheI indicado entre corchetes) contigua con los últimos seis nucleótidos del exón tres y el comienzo del intrón cuatro de un gen *Rs1* de ratón (contenida entre paréntesis en letra mayúscula): cagcccctag ataactctgt ataatgtatg ctatacgaag ttat[gctagc] (TTCCAGGTGA GTGGCTCAAC GCCCTAGCAT TCCTCCTTCC AACTCTTAAT) (SEQ ID NO:34). La secuencia de nucleótidos a través del punto de

unión aguas abajo después de la escisión, mediada por la recombinasa, del casete de selección incluyó lo siguiente, que indica la secuencia de *lacZ* restante (letra minúscula con sitios I-Ceu-I, *loxP* y *NheI* indicados entre corchetes) contigua con la secuencia de *Rs1* de ratón (contenida entre paréntesis en letra mayúscula): atccccggc tagagttaa
 aactagaac tagtggatcc ccgggctcga [taactataac ggtcctaagg tagcga]ctcgac [ataactcg tataatgtat gctatacga gttat **gctagc**]
 5 (TTCCAGGTGA GTGGCTCAAC GCCCTAGCAT TCCTCCTTCC AACTCTTAAT) (SEQ ID NO:35).

Para el alelo C59S, la secuencia de nucleótidos a través del punto de unión aguas arriba incluyó lo siguiente, que indica el exón tres de *Rs1* endógeno de ratón y la secuencia intrónica circundante (letra mayúscula contenida entre paréntesis más abajo con el exón tres indicado entre corchetes y el codón mutado en letra en negrita) contigua a la secuencia del casete (letra minúscula con un sitio *XhoI* entre corchetes y un sitio *loxP* en letra en negrita) en el punto
 10 de inserción: (CTGGAGTGT ACCTTTGTTG ATAGAACACT TGTTTAGGAT TCGTGAAGGT AAAGTGGGCA
 CCCATCTAGA AGCCCAGCAC TCAGAGGTGG AGACAGGAGG TCAGGAGTTC AACAAGGTCA TTCTCTGCTA
 CACAGTGAGT TAAAATCGG CCTGGGATAC ACGAGAGAGA CCCTGTGTAA GAGCAGTAGC AGCAGCAAGA
 ACTCAAGCTG AAAAGGAACA TGCAGTGTA GACAAAGGGC CACTGTGTGC ATAGAGCCAG CAACCTCACA
 CTGTAATGAA CGGGTCTGAC CTTTGCAAGT AAGCTTCTTG TGATGCTCTG GTTGAGCCTT TGACTACGAC
 15 TTTTGTGACT TGTGCTCCTC TGGATGCTTG CAG[GATGAGG GTGAGGACCC CTGGTACCAG AAAGCATGCA
 AGTGTGATTG CCAGGTAGGA GCCAATGCTC TGTGGTCTGC TGGAGCTACC TCCTTAGACA **GTATTCCAG**]G
 TGAGTGGCTC AACGCCCTAG CATTCTCCT TCCAACCTT AATCCCTCTG CTTTCTCTCA AGTTGGCTTG
 TGAGCTTCAC ATCTCACCGT GGCCACTGCT CCAACATTCT GTTCATTATC AAGTGCCAGG CTCTCTCCCT
 CCCTGGCTTG CCTGAGATGG TCAGGTAAGA CCC) [ctcgag] **ataactcg tataatgtat gctatacga gttatgca**
 20 tgccagtagc agcacc (SEQ ID NO:36). La secuencia de nucleótidos a través del punto de unión aguas abajo incluyó lo siguiente, que indica la secuencia del casete (letra minúscula con los sitios I-Ceu-I y *NheI* entre corchetes, y un sitio
loxP en letra en negrita) contigua con la secuencia del intrón tres de *Rs1* de ratón (letra mayúscula contenida entre paréntesis más abajo) aguas abajo del punto de inserción: ttccatcaga cctcgacctg cagcccctag **ataactcgt ataatgtatg**
ctatacgaag ttatgctagg [taactataac ggtcctaagg tagcga gctagc] (AGCGTGAGGG AAGTCCCTTC CTCTTAGGTA) (SEQ
 25 ID NO:37). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción después de la escisión, mediada por la recombinasa, del casete de selección incluyó lo siguiente, que indica la secuencia del exón 3 de *Rs1* de ratón y la
 secuencia restante del intrón tres (letra mayúscula con el exón 3 indicado entre corchetes) yuxtapuesta con la
 secuencia restante del casete (letra minúscula contenida entre paréntesis más abajo con sitios *XhoI*, I-Ceu-I y *NheI*
 entre corchetes y un sitio *loxP* en letra en negrita): CTGGAGTGT ACCTTTGTTG ATAGAACACT TGTTTAGGAT
 30 TCGTGAAGGT AAAGTGGGCA CCCATCTAGA AGCCCAGCAC TCAGAGGTGG AGACAGGAGG TCAGGAGTTC
 AACAAGGTCA TTCTCTGCTA CACAGTGAGT TAAAATCGG CCTGGGATAC ACGAGAGAGA CCCTGTGTAA
 GAGCAGTAGC AGCAGCAAGA ACTCAAGCTG AAAAGGAACA TGCAGTGTA GACAAAGGGC CACTGTGTGC
 ATAGAGCCAG CAACCTCACA CTGTAATGAA CGGGTCTGAC CTTTGCAAGT AAGCTTCTTG TGATGCTCTG
 GTTGAGCCTT TGACTACGAC TTTTGTGACT TGTGCTCCTC TGGATGCTTG CAG[GATGAGG GTGAGGACCC
 35 CTGGTACCAG AAAGCATGCA AGTGTGATTG CCAGGTAGGA GCCAATGCTC TGTGGTCTGC TGGAGCTACC
 TCCTTAGACA **GTATTCCAG**]G TGAGTGGCTC AACGCCCTAG CATTCTCCT TCCAACCTT AATCCCTCTG
 CTTTCTCTCA AGTTGGCTTG TGAGCTTCAC ATCTCACCGT GGCCACTGCT CCAACATTCT GTTCATTATC
 AAGTGCCAGG CTCTCTCCCT CCCTGGCTTG CCTGAGATGG TCAGGTAAGA CCC ([ctcgag] **ataactcg tataatgtat**
gctatacga gttat gctagg/[taactataac ggtcctaagg tagcga gctagc] agcgtgagg aagtccttc ctcttaggta) (SEQ ID NO:38).

Para el alelo R141C, la secuencia de nucleótidos a través del punto de unión aguas arriba incluyó lo siguiente, que indica el exón cinco de *Rs1* endógeno de ratón y la secuencia intrónica circundante (letra mayúscula contenida entre paréntesis más abajo con el exón cinco entre corchetes y el codón mutado en letra en negrita) contigua a la secuencia del casete (letra minúscula con un sitio *XhoI* entre corchetes y un sitio *loxP* en letra en negrita) en el punto de inserción:

(TCTTTCCTAA GGAAAAGAAT TAAGAGTCGG GCTATGTCTG AAGGCCCAGA TACCTCTTGA TGCTAGGTAA
 CCCTTCAAAA CTCAGCACCT GTTGGCTTTT TACAGACATA GATAAGAGGA_TGGCTCCTGG TAATTTGGTG
 TGTTCTGGC AG[GTGTGCTT GGCTTTCCAA GTATCAGGAC AGCAGCCAGT GGTTACAGAT AGATTTGAAG
 GAGATCAAGG TGATTTCCGGG GATCCTGACC CAAGGAT**GTCT** GTGACATAGA CGAGTGGGTG ACCAAGTACA
 5 GTGTGCAGTA TAGGACTGAT GAGCGCCTGA ACTGGATCTA CTATAAGGAT CAGACCGGAA ACAATCGG]GT
 AAGTGGGGGT CACTCCGAGT CAGCTTCAGC TCACACTGCG GAGACACACT CCATCCCTAT GTTCCTGCTG
 TCCGCGTCTG TCTGAGCATT GACCCCTCTA CATGCTGGGT CATCTG) [ctcgag] **ataacttcg tataatgtat gctatacga**
 gttatatgca tgccagtagc agcaccc (SEQ ID NO:39). La secuencia de nucleótidos a través del punto de unión aguas abajo
 incluyó lo siguiente, que indica la secuencia del casete (letra minúscula con sitios I-Ceul y NheI entre corchetes, y un
 10 sitio *loxP* en letra en negrita) contigua con la secuencia del intrón cinco de *Rs1* de ratón (letra mayúscula contenida
 entre paréntesis más abajo) aguas abajo del punto de inserción: ttccatcaga cctcgacctg cagcccctag **ataacttcgt**
ataatgtatg ctatacgaag ttatgctagg [taactataac ggtcctaagg tagcga gctagc] (TTTTCCAGAT GTGATCTGGG
 AGACTAGCAG) (SEQ ID NO:40). La secuencia de nucleótidos a través del punto de inserción después de la escisión,
 mediada por la recombinasa, del casete de selección (78 pb que se mantienen en el intrón cinco) incluyó lo siguiente,
 15 que indica la secuencia de *Rs1* de ratón (intrón cuatro, exón cinco e intrón cinco en letra mayúscula) con la secuencia
 restante del casete (sitios *loxP* y de clonación [78 pb] que se mantienen en el intrón cinco, en letra minúscula contenida
 entre paréntesis; sitios XhoI, I-Ceul y NheI entre corchetes, un sitio *loxP* en letra en negrita): TCTTTCCTAA
 GGAAAAGAAT TAAGAGTCGG GCTATGTCTG AAGGCCCAGA TACCTCTTGA TGCTAGGTAA CCCTTCAAAA
 CTCAGCACCT GTTGGCTTTT TACAGACATA GATAAGAGGA TGGCTCCTGG TAATTTGGTG TGTTCTGGC
 20 AGGTGTGCTT GGCTTTCCAA GTATCAGGAC AGCAGCCAGT GGTTACAGAT AGATTTGAAG GAGATCAAGG
 TGATTTCCGGG GATCCTGACC CAAGGATGCT GTGACATAGA CGAGTGGGTG ACCAAGTACA GTGTGCAGTA
 TAGGACTGAT GAGCGCCTGA ACTGGATCTA CTATAAGGAT CAGACCGGAA ACAATCGGGT AAGTGGGGGT
 CACTCCGAGT CAGCTTCAGC TCACACTGCG GAGACACACT CCATCCCTAT GTTCCTGCTG TCCGCGTCTG
 TCTGAGCATT GACCCCTCTA CATGCTGGGT CATCTG ([ctcgag] **ataacttcg tataatgtat gctatacga** gttatgctagg
 25 [taactataac ggtcctaagg tagcga **gctagc**])TTTTCCAGAT GTGATCTGGG AGACTAGCAG (SEQ ID NO:41).

Tomado en conjunto, este ejemplo ilustra la generación de tres líneas de roedores (por ejemplo, un ratón) cuyos
 genomas comprenden loci *Rs1* modificados genéticamente. Tales líneas de roedor *Rs1* modificadas genéticamente
 proporcionan sistemas *in vivo* para la dilucidación de la biología y los mecanismos moleculares de la retinosquiasis
 para el desarrollo de agentes terapéuticos para tratar y/o mejorar de manera efectiva tales enfermedades.

30 Tabla 2. Conjuntos de cebador/sonda para los ensayos TAQMAN®

Nombre	Cebador	Secuencia (5'-3')
Rs1-KOmTU	Directo	TGGGACAAGTGTAATGAGGAC (SEQ ID NO:42)
	Inverso	AGTGGTGCTTGGCCTTATGC (SEQ ID NO:43)
	Sonda	TCCCAGGCAAATCAGGACAAAGGGTC (SEQ ID NO:44)
Rs1-KOmTD	Directo	GAGCCAGCAACCTCACAC (SEQ ID NO:45)
	Inverso	GCATCCAGAGGAGCACAAAGTC (SEQ ID NO:46)
	Sonda	TGTAATGAACGGGTCTGACCTTTGCAA (SEQ ID NO:47)
Rs1-C59SmTU	Directo	TCGTGAAGGTCTTGATTTGATCCT (SEQ ID NO:48)
	Inverso	ACCTCCTGTCTCCACCTCTG (SEQ ID NO:49)
	Sonda	AAGCACCATGTAAACTGGGCACCC (SEQ ID NO:50)
Rs1-C59SmTD	Directo	CCCTGGCTTGCCTGAGATG (SEQ ID NO:51)
	Inverso	GGAATCCCTCACGCTGAGTT (SEQ ID NO:52)
	Sonda	TCAGGTAAGACCCAATTGTCAATGCA (SEQ ID NO:53)
Rs1- R141CmTU	Directo	GAGTCGGGCTATGTCTGAAGG (SEQ ID NO:54)
	Inverso	GCCAACAGGTGCTGAGTTT (SEQ ID NO:55)
	Sonda	CCAGATTTGGGATGATACCTCTTGATGC (SEQ ID NO:56)
Rs1- R141CmTD	Directo	CCTCTACATGCTGGGTGATCTG (SEQ ID NO:57)
	Inverso	GGAATCCCTCACGCTGAGTT (SEQ ID NO:58)
	Sonda	GACCCACATTCATTTACAAACTGC (SEQ ID NO:59)

Ejemplo 2. Caracterización de líneas de roedor *Rs1* modificadas genéticamente

Este ejemplo describe la caracterización de líneas de roedor *Rs1* modificadas genéticamente producidas de acuerdo con el Ejemplo 1. En particular, este ejemplo demuestra la localización y distribución de la proteína RS1 en la retina de estos ratones modificados genéticamente. También se describe la arquitectura retiniana para todas las líneas *Rs1* modificadas genéticamente.

Perfil de expresión de LacZ. Los ratones se sacrificaron mediante inhalación de CO₂. Los ojos se enuclearon y fijaron con paraformaldehído al 4 % en PBS (Electron Microscopy Sciences) durante 3 horas a 4 °C. Después de tres lavados con PBS 1X (ThermoFisher Sci.), los ojos se diseccionaron en un microscopio de disección. Se retiraron la porción anterior y el cristalino; el resto del ojo (copa ocular) se tiñó con el conjunto de sustratos X-Gal HistoMark (KPL) durante 2 días a 37 °C con una rotación suave. Después de la tinción, las copas oculares se enjuagaron bien con PBS 1X y luego se transfirieron a sacarosa al 30 % durante toda la noche. Las copas oculares se incluyeron en el compuesto O.C.T. Tissue-Tek® (VWR) y se congelaron en hielo seco. Se prepararon secciones de criostato de veinte micras en los portaobjetos Superfrost® Plus Micro. Las secciones se secaron durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego se lavaron tres veces con PBS 1X para eliminar el compuesto O.C.T., y se colocó un cubreobjetos con medio de montaje antidecoloración ProLong Gold con DAPI (ThermoFisher Sci.) Los resultados representativos de los ratones machos se exponen en la Figura 11A.

Expresión de ARNm de *Rs1*. El patrón de expresión del ARNm de *Rs1* en las líneas de ratón *Rs1* modificadas genéticamente descritas en el Ejemplo 1 se determinó mediante hibridación *in situ* mediante el uso de RNASCOPE® de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Advanced Cell Diagnostics). Brevemente, las copas oculares de ratón fijadas en formol o paraformaldehído (PFA) al 4 % e incluidas en parafina u O.C.T. se cortaron en secciones de 5 a 10 µm y se montaron en portaobjetos de vidrio SUPERFROST® Plus. El procedimiento comenzó con 10 minutos de tratamiento previo 1 (ACD, 320037) a temperatura ambiente, seguido de 20 minutos de ebullición en el tratamiento previo 2 (ACD, 320043) con Oster Steamer (IHC World, LLC, Modelo 5709) y tratamiento previo 3 (ACD, 320037) durante 30 minutos a 40 °C en un horno HybEZ (ACD, 310010). Se incluyó una etapa de tratamiento adicional con DNasa para reducir el posible fondo de la hibridación de la sonda con ADN cromosómico. Después del tratamiento previo 3, los portaobjetos se lavaron tres veces con agua y se añadió una solución de DNasa I (50 u/ml en tampón de DNasa I 1x, AM2224, Ambion) al tejido ocular para una incubación de 30 minutos a 40 °C. Luego, los portaobjetos se lavaron cinco veces con agua, se hibridaron con sondas RNASCOPE® durante dos horas a 40 °C y se implementó el resto del protocolo de ensayo del fabricante (ACD, 322360) de Amplified 1 a Amplified 6. Los portaobjetos se lavaron dos veces (dos minutos cada uno a temperatura ambiente), cada etapa mediante tampón de lavado RNASCOPE® (ACD, 310091). Después de las etapas Amplified, la señal se detectó mediante incubación con solución de trabajo Red (relación 1:60 de Red B a Red A) a temperatura ambiente durante 10 minutos en ausencia de luz, seguido del lavado de los portaobjetos en agua varias veces y la visualización al microscopio. En algunos experimentos, se siguió la técnica de IHC, se visualizaron las señales fluorescentes y se capturaron mediante el uso de un microscopio de campo abierto Nikon Eclipse Ti-E. Los resultados representativos de los ratones machos se exponen en la Figura 11B.

Expresión de la proteína RS1. El nivel de expresión de proteínas en diversas capas de la retina de roedores *Rs1* de tipo salvaje y modificados genéticamente se determinó mediante inmunohistoquímica (IHC), transferencia Western y un ensayo ELISA. Los resultados representativos de los ratones machos se exponen en la Figura 11C y las Figuras 12A-12D; y los resultados representativos de las líneas de hembras homocigóticas KO (*Rs1*^{-/-}) y heterocigóticas para *Rs1* KO (*Rs1*^{+/-}) se exponen en la Figura 12E.

Inmunohistoquímica (IHC). Brevemente, los animales se sacrificaron mediante inhalación de CO₂. Los ojos se enuclearon y fijaron con PFA al 4 % (Electron Microscopy Sciences) en PBS 1X (ThermoFisher Sci.) durante tres horas a 4 °C. Después de tres lavados con PBS 1X, los ojos se diseccionaron en un microscopio de disección. Se retiraron el

segmento anterior y el cristalino, y el resto del ojo (copa ocular) se incubó en sacarosa al 30 % a 4 °C durante toda la noche. Luego se incluyeron las copas oculares en el compuesto O.C.T. TISSUE-TEK® (VWR) y se congelaron instantáneamente en hielo seco. Se prepararon secciones de criostato de diez micras en el portaobjetos SUPERFROST® Plus Micro usado para la tinción inmunofluorescente. Las secciones de los portaobjetos se rodearon con bloqueador líquido Super Pap Pen (Electron Microscopy Sciences) y se secaron al aire durante 30 minutos a temperatura ambiente. La solución de bloqueo se preparó como suero de cabra normal al 5 % (VectorLabs), albúmina de suero bovino al 1 % (Sigma-Aldrich) y Triton-X 100 al 0,3 % (Sigma-Aldrich) en PBS 1X. La solución de lavado se preparó como Tween 20 al 0,1 % (Amresco) en PBS 1X. Los portaobjetos se colocaron en un contenedor de tinción con tapa negra, se lavaron tres veces con PBS 1X para eliminar el compuesto O.C.T. Se añadió solución de bloqueo a los portaobjetos y se mantuvieron durante una hora a temperatura ambiente. Después de eliminar la solución de bloqueo, los anticuerpos primarios se diluyeron en solución de bloqueo y se aplicaron a las secciones durante toda la noche a 4 °C. El segundo día, los portaobjetos se lavaron tres veces con solución de lavado. Los anticuerpos secundarios conjugados con el fluoróforo se diluyeron a 1:1000 en PBS 1X y se aplicaron a las secciones durante una hora a temperatura ambiente (en la oscuridad para evitar el fotoblanqueo). Los portaobjetos se lavaron tres veces con PBS 1X y se colocó un cubreobjetos con medio de montaje antidecoloración ProLong Gold con DAPI (ThermoFisher Sci.).

ELISA. Brevemente, la retina de ratón se aisló bajo el microscopio de disección y se homogeneizó en 100 µl de tampón RIPA por retina con inhibidores de la proteasa combinados en un tubo con esferas metálicas con homogeneizador Omini. La concentración de proteínas se determinó con el kit BCA y luego se almacenó a -80 °C hasta su uso (ELISA, transferencia Western). Las placas de ELISA (NUNC) se recubrieron con proteína estándar RS1 (Novus Biologicals, 0-40 ng/ml) y la muestra de proteína retiniana total (dilución 1:2000 en PBS) por triplicado a 4 °C durante toda la noche. Después de tres lavados con solución T-TBS (tampón T-TBS, Tween20 al 0,05 % en solución TBS), las placas se bloquearon con tampón de bloqueo (BSA al 1 %, suero de cabra al 5 % en TBS) durante una hora a temperatura ambiente. Después de 3 lavados, se añadió anticuerpo policlonal anti-RS1 (Novus Biologicals USA, 1:4000 en tampón de bloqueo) a las placas y se incubó durante dos horas a temperatura ambiente, seguido de la adición de anticuerpo anti-ratón de cabra conjugado con biotina (Jackson Lab, 1:5000) y Estreptavidina-HRP (Thermo, 1:200) y, finalmente, la solución de trabajo del sustrato (sistemas R&D) en ausencia de luz. La reacción se detuvo con HCl 2 N. La densidad óptica (DO) se registró con el sistema SpectraMax Plus (Molecular Devices).

Transferencia Western. Se cargaron 10-20 µg de proteína retiniana total en geles Bis-Tris al 4-12 % en tampón de muestra (tampón de muestra LDS Nupage, Thermo) que contenía SDS al 4 % para la separación de proteínas y luego se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa (tamaño de los poros de 0,45 µm, Invitrogen) seguido de bloqueo con SuperBlock T20 (TBS, Thermo) durante una hora a temperatura ambiente. Las transferencias se incubaron con anticuerpo anti-RS1 (Novus Biologicals USA, 1:4000) durante dos horas a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4 °C. Después de la incubación con anticuerpo anti-RS1, se añadió anticuerpo policlonal anti-ratón conjugado con HRP (Cell Signaling) a 1:5000 durante una hora a temperatura ambiente. Las bandas de proteínas se visualizaron y se obtuvieron imágenes mediante el uso de la quimioluminiscencia SuperSignal West Pico (Thermo) mediante el escáner de transferencia C-Dogit (Li- Cor).

Histología. Brevemente, los animales se sacrificaron mediante inhalación de CO₂. Los ojos se enuclearon y fijaron con el fijador de Davidson (Electron Microscopy Sciences) durante una hora a temperatura ambiente, se transfirieron a casetes de inclusión de procesamiento de tejidos (Electron Microscopy Sciences) y se lavaron con agua del grifo durante cinco minutos a temperatura ambiente. Los casetes se fijaron con formol tamponado neutro al 10 % en tampón de fosfato (Electron Microscopy Sciences). Los ojos se procesaron a través de diluciones en serie de etanol, tres cambios de xileno y dos cambios de parafina para su inclusión. Se prepararon secciones de parafina de cinco micras

en portaobjetos SUPERFROST® Plus Micro (VWR) y se tiñeron con hematoxilina y eosina de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Hematoxylin and Eosin (H&E) Staining (Regressive) Ricca Chemical Company). Los resultados representativos de los ratones machos se exponen en las Figuras 13A-13B.

Tomado en conjunto, este ejemplo demuestra que las características patológicas típicas del fenotipo de la enfermedad asociado con la retinosquiasis ligada al cromosoma X se recapitulaban en las líneas de roedor *Rs1* modificadas genéticamente producidas de acuerdo con el Ejemplo 1. Por tanto, tales líneas de roedor modificadas genéticamente son útiles para la evaluación y el desarrollo de agentes terapéuticos (por ejemplo, terapia génica experimental).

Ejemplo 3. Análisis funcional y morfológico de líneas de roedor *Rs1* modificadas genéticamente

Este ejemplo describe la caracterización del fenotipo de retina de las líneas de roedor *Rs1* modificadas genéticamente producidas de acuerdo con el Ejemplo 1. En particular, la función retiniana externa en las líneas de roedor deficientes y mutantes de *Rs1* producidas en el Ejemplo 1 se evaluó mediante electroretinogramas de campo completo (ERG) adaptados a la oscuridad (DA-) y adaptados a la luz (LA-). La arquitectura retiniana también se evaluó mediante tomografía de coherencia óptica (OCT). Los resultados representativos de los ratones machos se exponen en las Figuras 13C y 14A-14C; y los resultados representativos de las líneas de hembras homocigóticas KO (*Rs1^{-/-}*) y heterocigóticas KO (*Rs1^{+/-}*) se exponen en las Figuras 13D y 14D.

Tomografía de coherencia óptica (OCT). Brevemente, se realizaron exámenes oftalmológicos en vivo en puntos de tiempo designados con el sistema HRA + OCT Heidelberg Spectralis (Heidelberg Engineering, Franklin, MA, Estados Unidos). Los animales se anestesiaron con ketamina (120 mg/kg) y xilazina (5 mg/kg) por vía intraperitoneal. Las pupilas se dilataron mediante el uso de una solución oftálmica de tropicamida al 0,5 % (Bausch & Lomb, Rochester, NY). Se tomaron imágenes infrarrojas del fondo, a partir del centro y del cuadrante seleccionado (normalmente nasal superior y temporal superior), seguido de la obtención de una serie de 61 escaneos ópticos laterales para la evaluación morfológica de la retina.

Electroretinografía (ERG). Brevemente, los animales se adaptaron a la oscuridad durante toda la noche y se anestesiaron (ketamina: 80 mg/kg; xilazina: 16 mg/kg), después de lo cual se usaron gotas oculares para la dilatación de la pupila (tropicamida al 1 %; fenilefrina HCl al 2,5 %) y para anestesiar la superficie de la córnea (proparacaína HCl al 1 %). Los electrodos de aguja sirvieron como referencia (mejilla) y tierra (cola), y los ERG se registraron mediante el uso de un electrodo de acero inoxidable humedecido con carboximetilcelulosa al 1 %. Los estímulos del destello estroboscópico se presentaron al ojo adaptado a la oscuridad y se superpusieron en un campo de adaptación estable (20 cd/m²) después de al menos cinco minutos de adaptación a la luz. Los estímulos oscilaron entre -3,6 y 2,1 log cd s/m². Las respuestas se amplificaron (0,03-1000 Hz) y se almacenaron mediante el uso de un sistema de promedio de señal UTAS E-3000 LKC (Gaithersburg, MD). La amplitud de la onda a se midió a los 8 ms después del inicio del destello a partir del valor inicial previo al estímulo, mientras que la amplitud de la onda b se midió desde la onda a hasta el pico de la onda b.

Tomado en conjunto, este ejemplo demuestra que el fenotipo mostrado en las líneas de roedor *Rs1* modificadas genéticamente descritas en la presente descripción replica lo observado en pacientes con retinosquiasis ligada al cromosoma X. Además, la variabilidad de este fenotipo se correlaciona con la naturaleza de la mutación genética. La presente descripción demuestra específicamente la creación de modelos de retinosquiasis en roedor. Las características patológicas y funcionales típicamente asociadas con la retinosquiasis ligada al cromosoma X que incluyen el desarrollo de estructuras quísticas dentro de la retina interna y la característica reducción de las respuestas de las ondas b y a del ERG, seguido de una pérdida de células fotorreceptoras, se recapitulaban en las tres líneas de roedor *Rs1* modificadas genéticamente descritas en la presente descripción. Tales líneas modificadas genéticamente son útiles para la comprensión adicional de los mecanismos moleculares subyacentes a la desorganización celular de la estructura retiniana, y proporcionan sistemas *in vivo* adecuados para el desarrollo de

terapias génicas para el tratamiento de la retinosquiasis juvenil ligada al cromosoma X.

Ejemplo 4. Fenotipos de inicio temprano de la retina en ratones *Rs1* KO.

Este Ejemplo describe experimentos realizados para investigar el fenotipo funcional y morfológico de inicio temprano de la retina en ratones *Rs1* inactivados (KO) descritos en el Ejemplo 1.

- 5 Las retinas de ratones *Rs1* KO y camadas de tipo salvaje (WT) se examinaron cada tres días entre el día 15 al 24 posnatal (P15, P18, P21 y P24) (Figura 15). La función retiniana externa se evaluó mediante ERG de campo completo adaptado a la oscuridad (DA-) y adaptado a la luz (LA-). Las amplitudes de onda a y onda b del ERG se analizaron con la ecuación de Naka-Rushton, lo que produjo parámetros de respuesta máxima ($R_{máx}$) y sensibilidad (K). La arquitectura de la retina se evaluó mediante tomografía de coherencia óptica (OCT).
- 10 Los resultados de los ratones machos se muestran en las Figuras 16A-19C. La función retiniana externa, evaluada mediante ERG adaptados a la oscuridad y adaptados a la luz, indicó una reducción de la onda b con relación a la onda a en todos los puntos de tiempo y el fenotipo de retinosquiasis estuvo presente durante todo el curso del tiempo de observación (P15-P24). Las retinas *Rs1* KO también exhibieron defectos tempranos del fotorreceptor, específicamente, disminución de la amplitud de la onda a, EZ más amplia y retina externa más delgada (ONL+PRL).
- 15 En las retinas *Rs1* KO, la afectación de la onda b fue mayor que la onda a, tanto para la amplitud como para la sensibilidad, lo que indica un impacto temprano de la deleción de *Rs1* en la sinapsis.
- Estas observaciones indican que la retinosquiasina desempeña funciones importantes durante el desarrollo retiniano temprano.

REIVINDICACIONES

1. Un roedor modificado genéticamente cuyo genoma comprende una mutación en el exón 3 o el exón 5 de un gen *Rs1* endógeno de roedor, en donde:
- la mutación en el exón 3 codifica una sustitución de aminoácidos C59S en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor, y la mutación en el exón 5 codifica una sustitución de aminoácidos R141C en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor;
 - el roedor es un ratón o una rata; y
 - el roedor muestra uno o más síntomas de retinosquiasis cuando el roedor es un roedor hembra homocigótico para la mutación, o cuando el roedor es un roedor macho hemocigótico para la mutación.
2. El roedor de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:
- (a) el roedor es un roedor macho;
 - (b) el roedor es un roedor hembra;
 - (c) el roedor es un roedor hembra y es homocigótico para el gen *Rs1* que comprende la mutación; o
 - (d) el roedor es un roedor hembra y es heterocigótico para el gen *Rs1* que comprende la mutación.
3. El roedor de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el roedor desarrolla uno o más síntomas de retinosquiasis a los 15 días del nacimiento.
4. Una célula o tejido aislado de roedor cuyo genoma comprende una mutación en el exón 3 o el exón 5 de un gen *Rs1* endógeno de roedor, en donde:
- la mutación en el exón 3 codifica una sustitución de aminoácidos C59S en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor, y la mutación en el exón 5 codifica una sustitución de aminoácidos R141C en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor;
 - la célula o tejido de roedor es una célula o tejido de ratón, o una célula o tejido de rata; y
 - un roedor cuyo genoma comprende dicha mutación muestra uno o más síntomas de retinosquiasis cuando el roedor es un roedor hembra homocigótico para la mutación, o cuando el roedor es un roedor macho hemocigótico para la mutación.
5. Una célula madre embrionaria (ES) de roedor cuyo genoma comprende una mutación en el exón 3 o el exón 5 de un gen *Rs1* endógeno de roedor, en donde:
- la mutación en el exón 3 codifica una sustitución de aminoácidos C59S en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor, y la mutación en el exón 5 codifica una sustitución de aminoácidos R141C en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor;
 - la célula ES de roedor es una célula ES de ratón o una célula ES de rata; y
 - un roedor cuyo genoma comprende dicha mutación muestra uno o más síntomas de retinosquiasis cuando el roedor es un roedor hembra homocigótico para la mutación, o cuando el roedor es un roedor macho hemocigótico para la mutación.
6. Un embrión de roedor generado a partir de la célula madre embrionaria de acuerdo con la reivindicación 5.
7. Un método para producir un roedor modificado genéticamente, que comprende modificar un genoma de roedor de modo que el genoma modificado comprenda una mutación en el exón 3 o el

exón 5 de un gen *Rs1* endógeno de roedor; y

producir un roedor modificado genéticamente que comprende el genoma modificado,
en donde:

- la mutación en el exón 3 codifica una sustitución de aminoácidos C59S en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor, y la mutación en el exón 5 codifica una sustitución de aminoácidos R141C en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor;
- el roedor es un ratón o una rata; y
- el roedor muestra uno o más síntomas de retinosquiasis cuando el roedor es un roedor hembra homocigótico para la mutación, o cuando el roedor es un roedor macho hemicigótico para la mutación.

8. El método de la reivindicación 7, en donde el genoma del roedor se modifica mediante un proceso que comprende

- (a) introducir una secuencia de ácido nucleico en el genoma de una célula ES de roedor para obtener una célula ES de roedor modificada genéticamente cuyo genoma comprende la mutación en el gen *Rs1* endógeno de roedor; y
- (b) producir un roedor mediante el uso de la célula ES de roedor modificada genéticamente de (a).

9. El método de la reivindicación 7 u 8, en donde:

- (a) el roedor es un roedor macho;
- (b) el roedor es un roedor hembra;
- (c) el roedor es un roedor hembra y es homocigótico para el gen *Rs1* que comprende la mutación; o
- (d) el roedor es un roedor hembra y es heterocigótico para el gen *Rs1* que comprende la mutación.

10. Un método para identificar un agente terapéutico para el tratamiento de la retinosquiasis en un roedor, el método comprende

(a) administrar un agente a un roedor cuyo genoma comprende una mutación en el exón 3 o el exón 5 de un gen *Rs1* endógeno de roedor, en donde:

- la mutación en el exón 3 codifica una sustitución de aminoácidos C59S en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor, y la mutación en el exón 5 codifica una sustitución de aminoácidos R141C en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor;

- el roedor es un ratón o una rata; y
- el roedor es un roedor hembra homocigótico para la mutación o un roedor macho hemicigótico para la mutación, y el roedor muestra uno o más síntomas de Retinosquiasis,

(b) realizar uno o más ensayos para determinar si el agente tiene un efecto sobre el uno o más síntomas de Retinosquiasis; y

(c) identificar el agente como un agente terapéutico cuando el agente tiene un efecto terapéutico sobre el uno o más síntomas de Retinosquiasis.

11. El método de la reivindicación 10, en donde:

- (a) el agente se administra al roedor en el momento del nacimiento o poco después; o
- (b) el agente se administra al roedor en el momento del nacimiento o poco después y el uno o más ensayos se realizan entre 15-24 días después del nacimiento.

12. Una construcción de ácido nucleico, que comprende

una secuencia de ácido nucleico a integrar en un gen *Rs1* de roedor en un locus *Rs1* de roedor, flanqueada por una secuencia de nucleótidos 5' y una secuencia de nucleótidos 3' que son homólogas a las secuencias de nucleótidos en el locus *Rs1* de roedor, en donde la integración de la secuencia de ácido nucleico en el gen *Rs1* de roedor resulta en un gen *Rs1* modificado genéticamente en un locus *Rs1* endógeno de roedor, cuyo gen *Rs1* modificado genéticamente comprende una mutación en el exón 3 o el exón 5 de un gen *Rs1* endógeno de roedor, en donde:

- 5 - la mutación en el exón 3 codifica una sustitución de aminoácidos C59S o R141C en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor, y la mutación en el exón 5 codifica una sustitución de aminoácidos R141C en el polipéptido *Rs1* endógeno de roedor;
- el roedor es un ratón o una rata; y
- 10 - un roedor que comprende el gen *Rs1* modificado genéticamente en su genoma muestra uno o más síntomas de retinosquiasis cuando el roedor es un roedor hembra homocigótico para el gen *Rs1* modificado genéticamente, o cuando el roedor es un roedor macho hemocigótico para el gen *Rs1* modificado genéticamente.

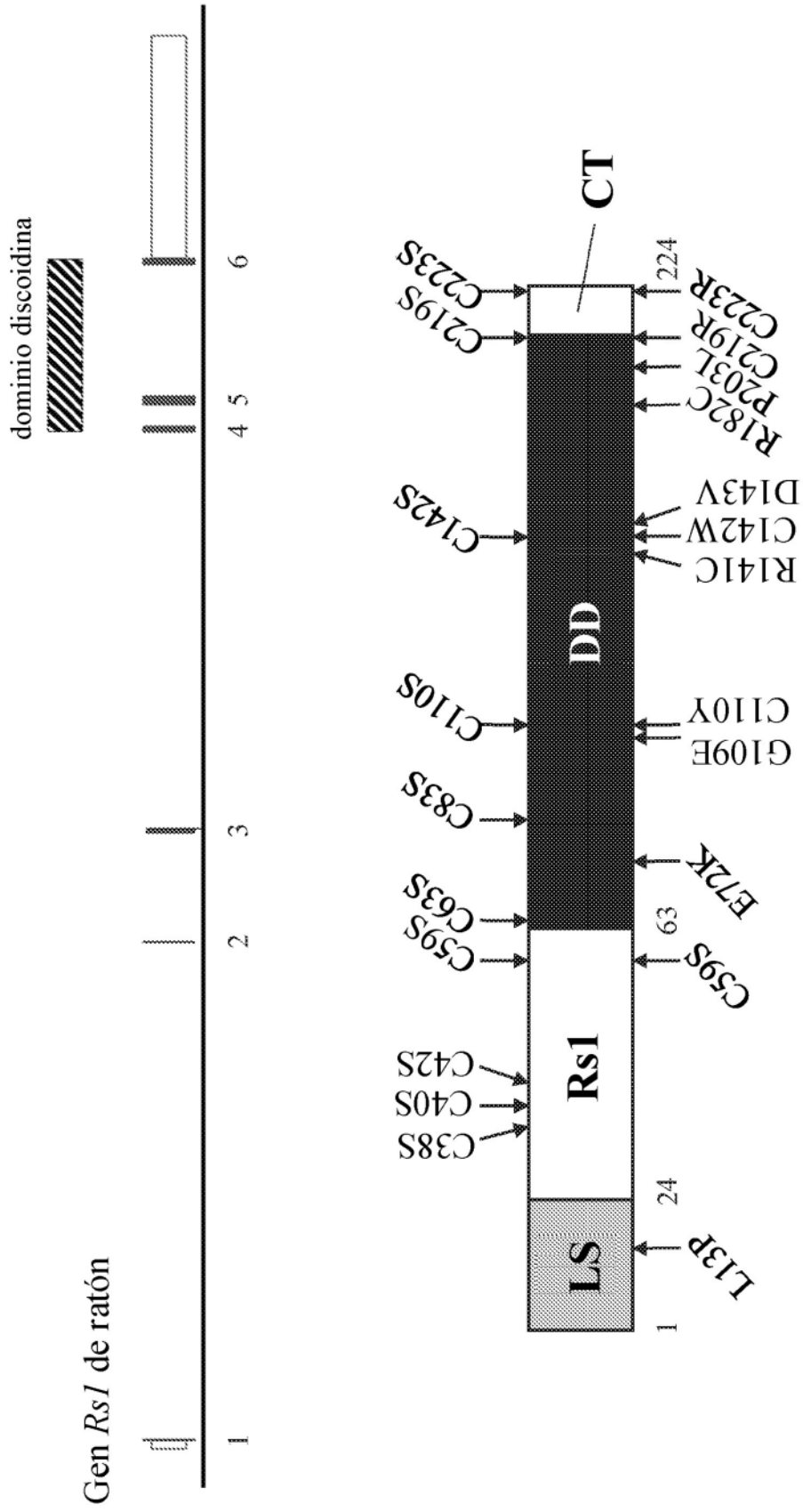


Figura 1

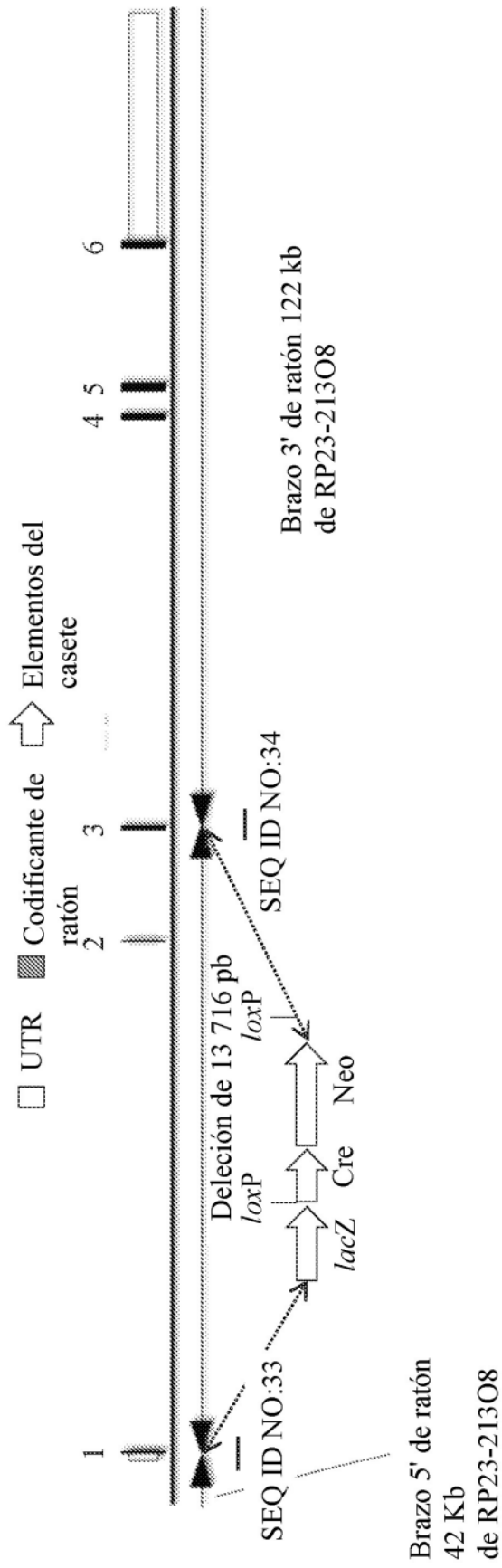


Figura 2

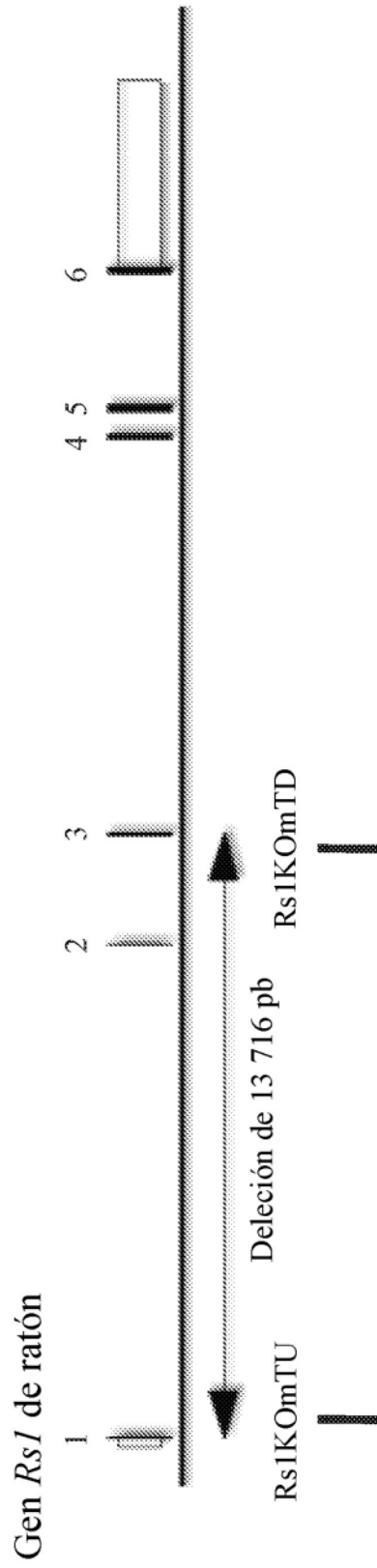


Figura 3

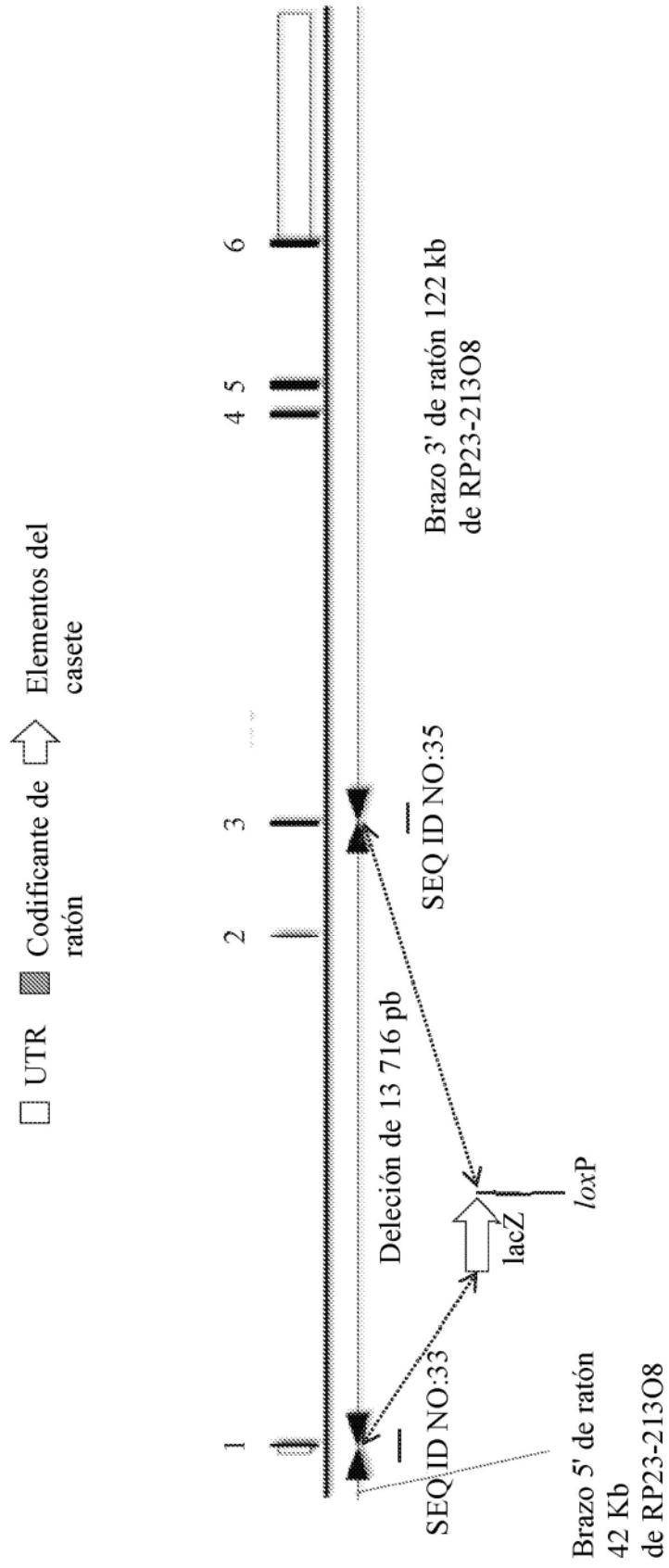


Figura 4

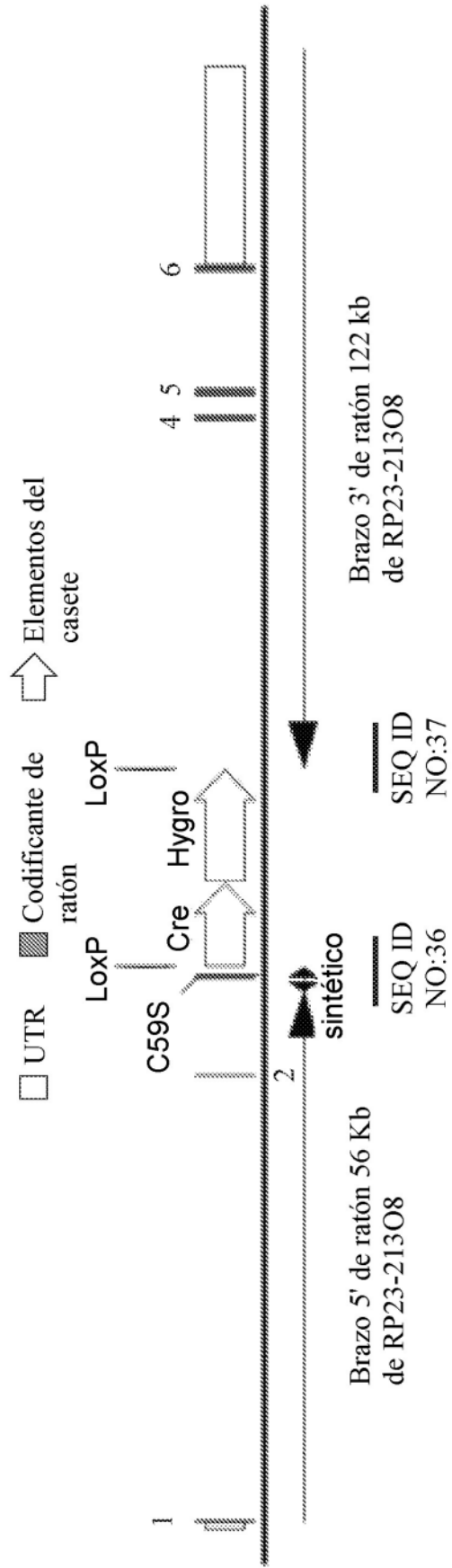


Figura 5

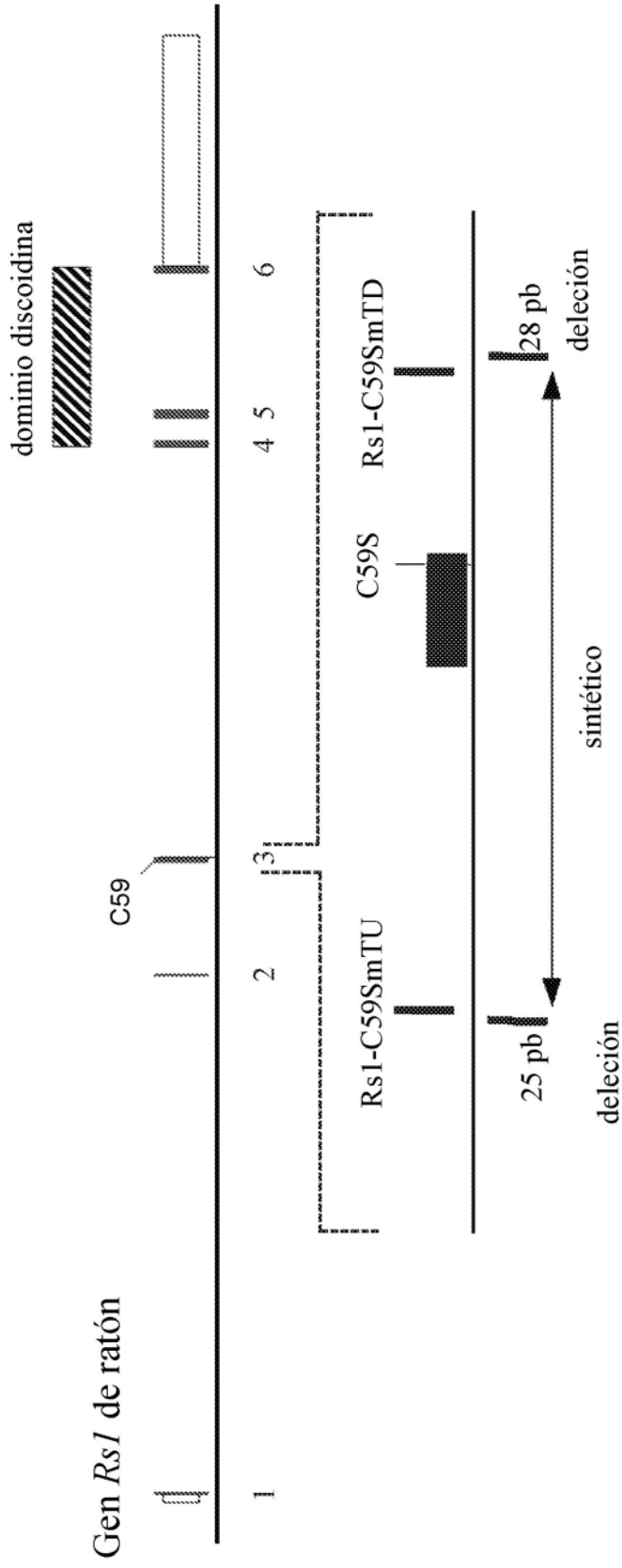


Figura 6

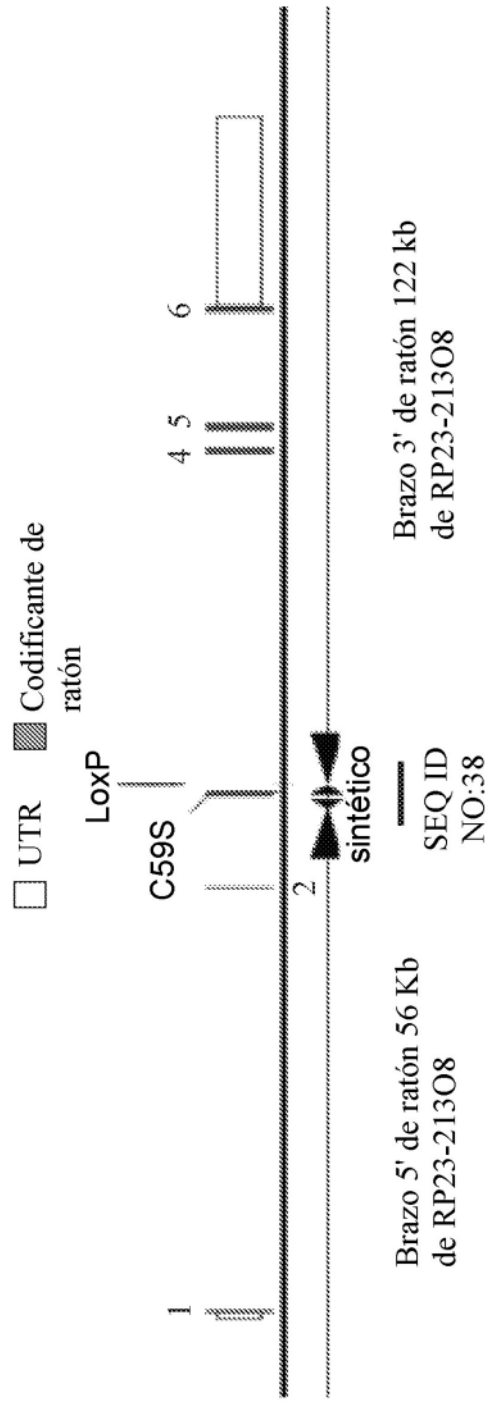


Figura 7

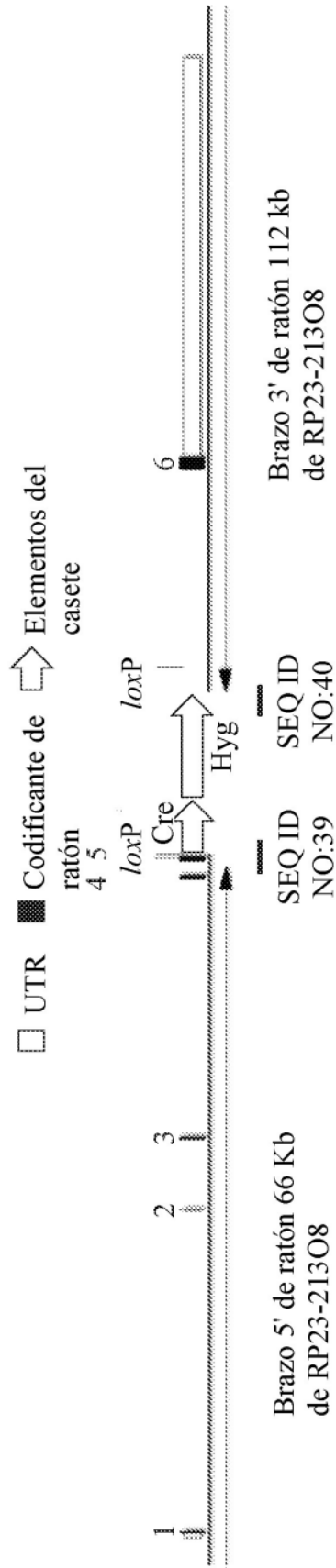


Figura 8

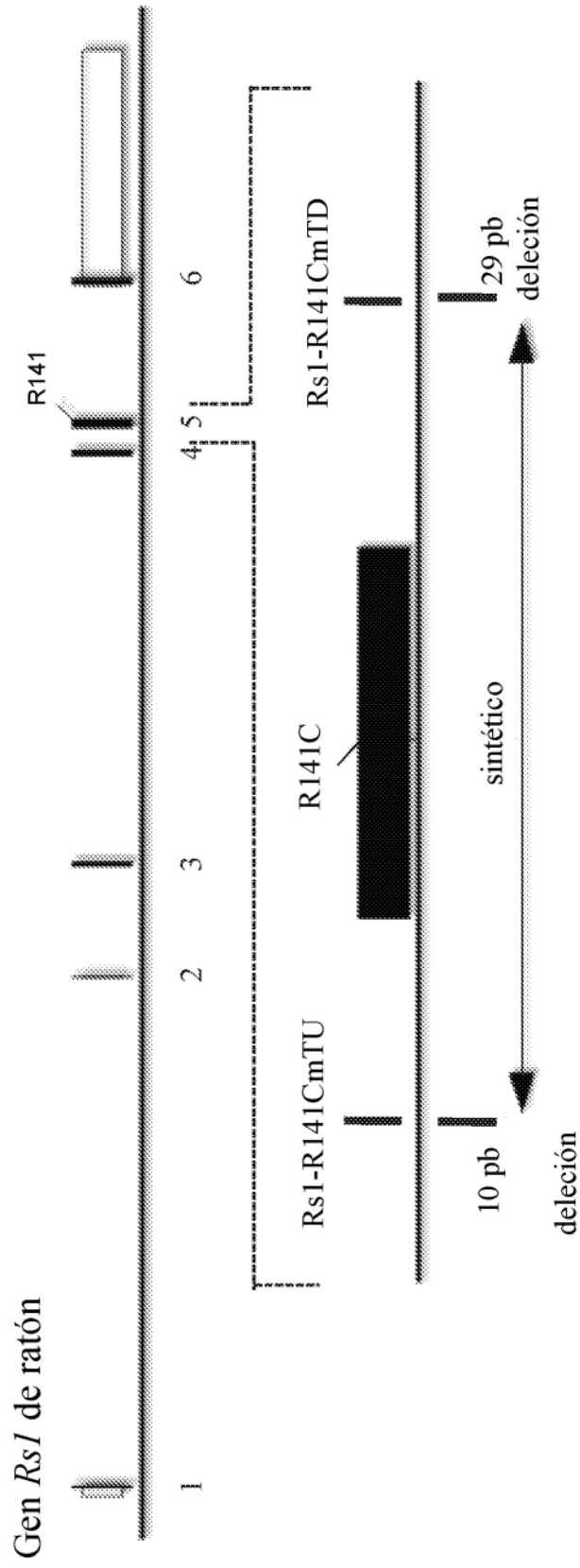


Figura 9

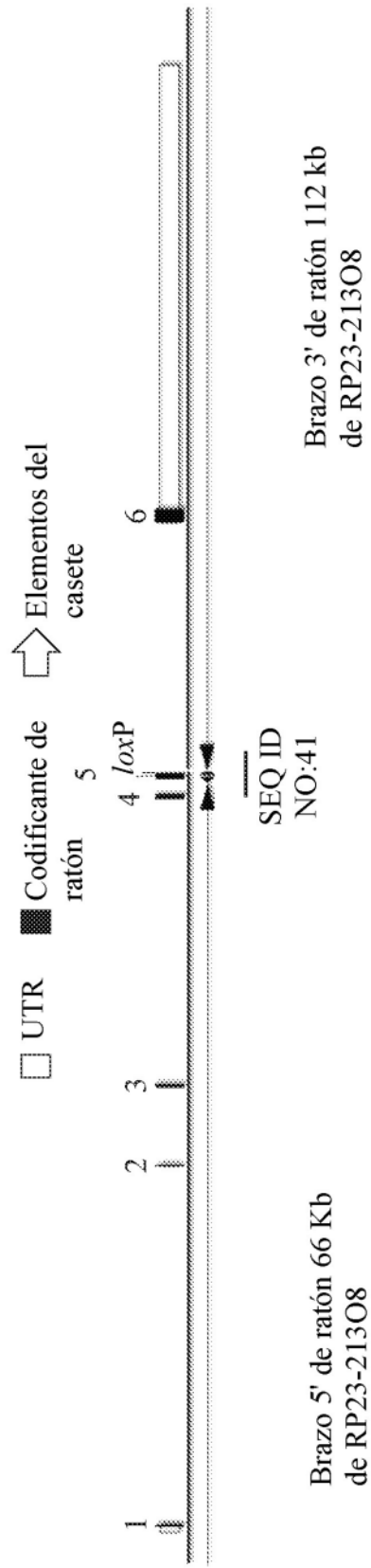
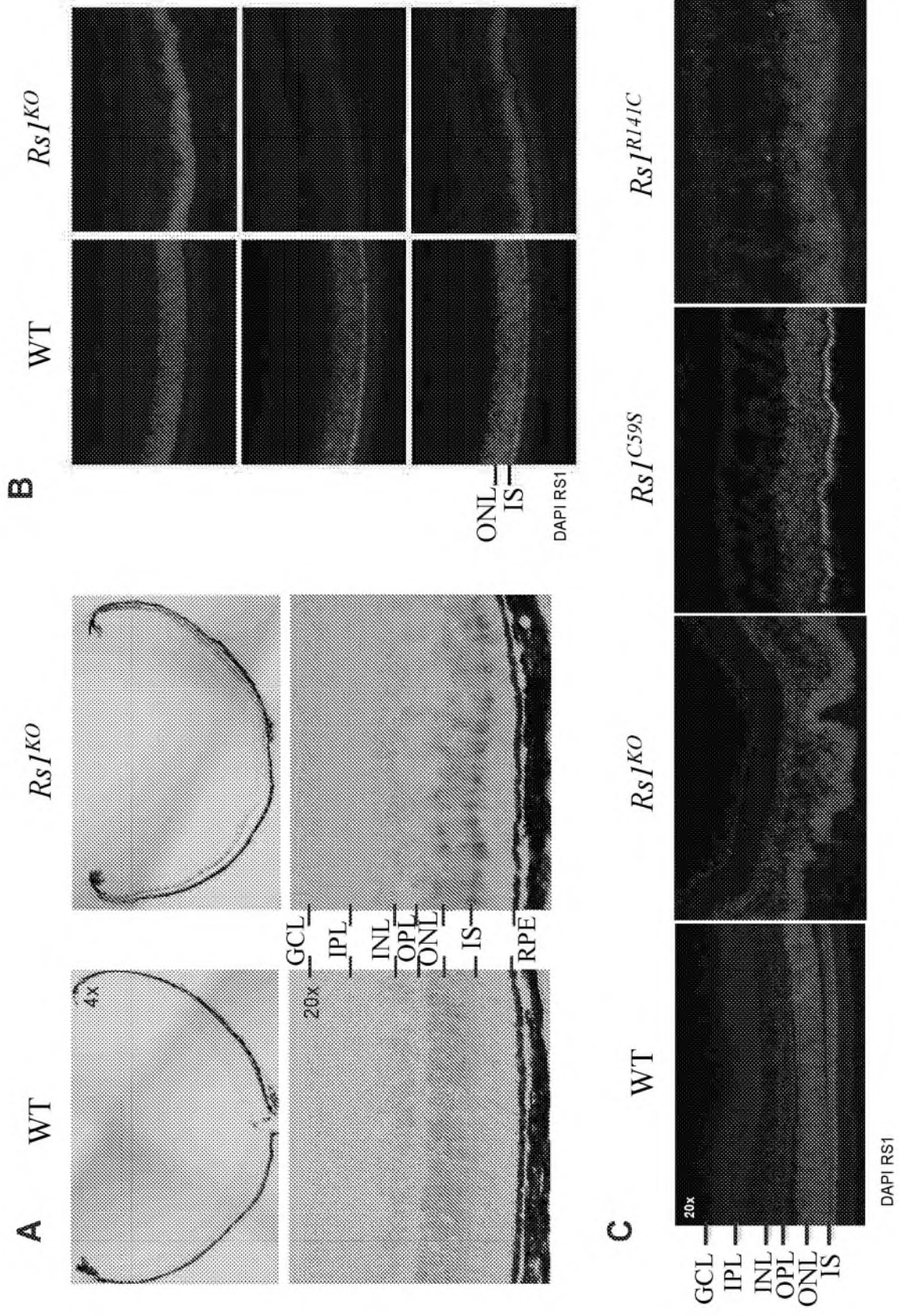
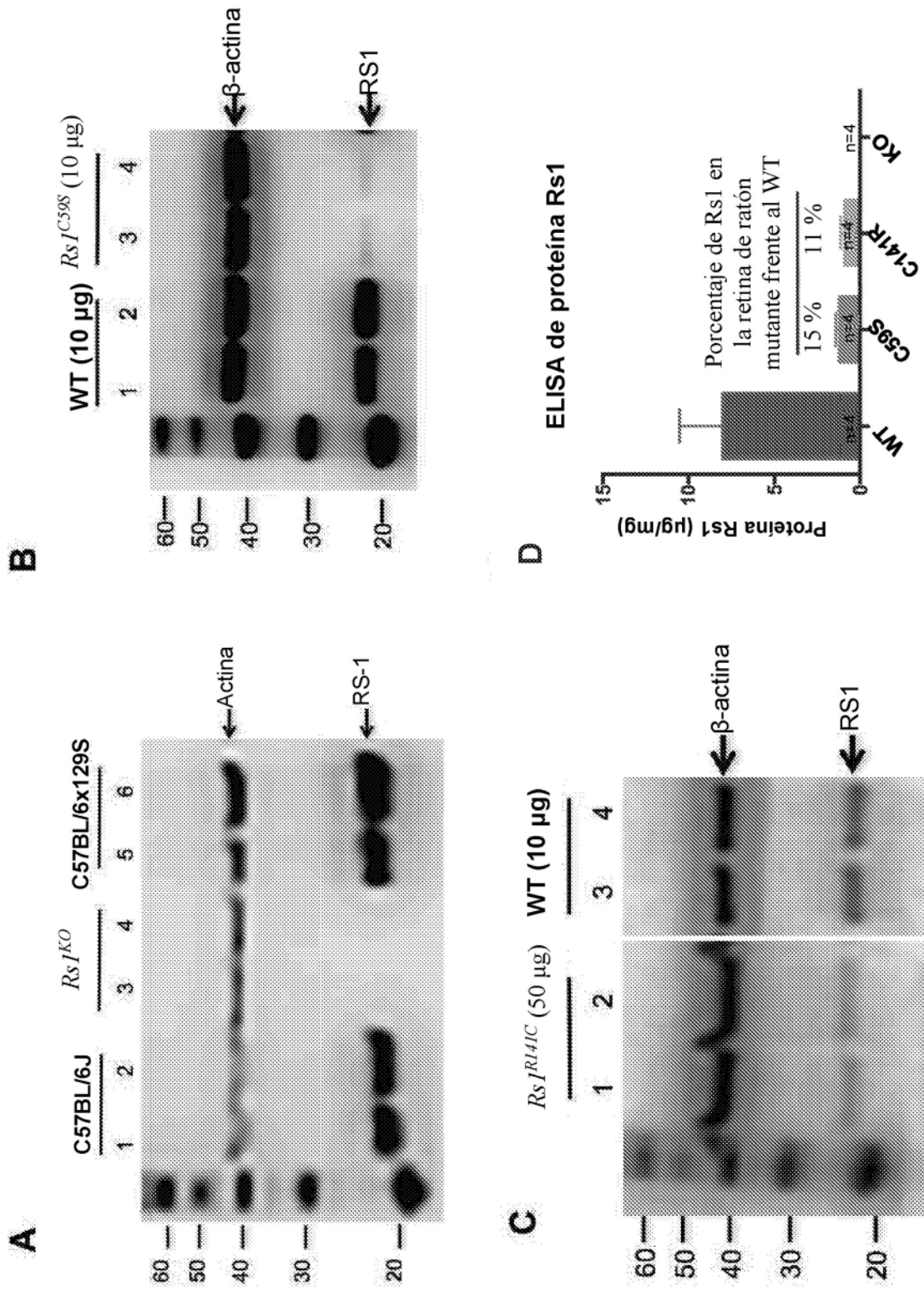


Figura 10

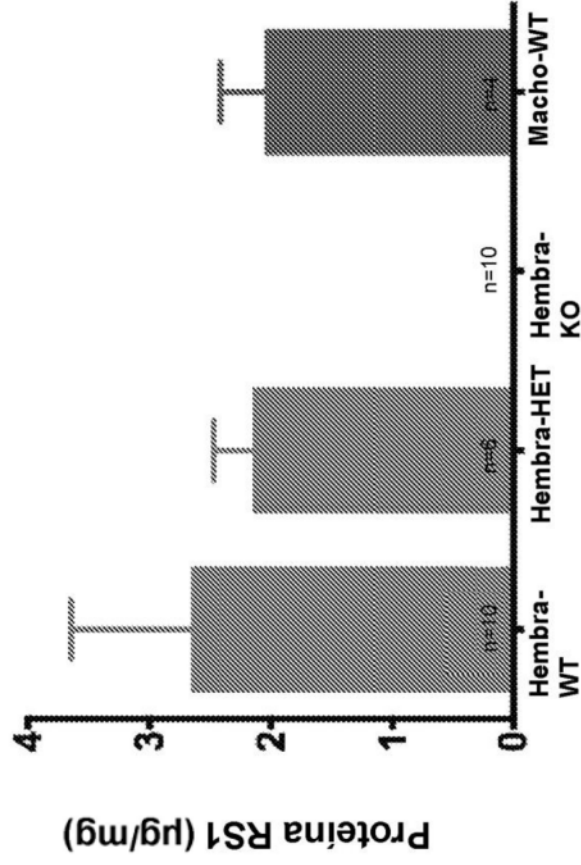


Figuras 11A-11C



Figuras 12A-12D

ELISA



Transferencia Western

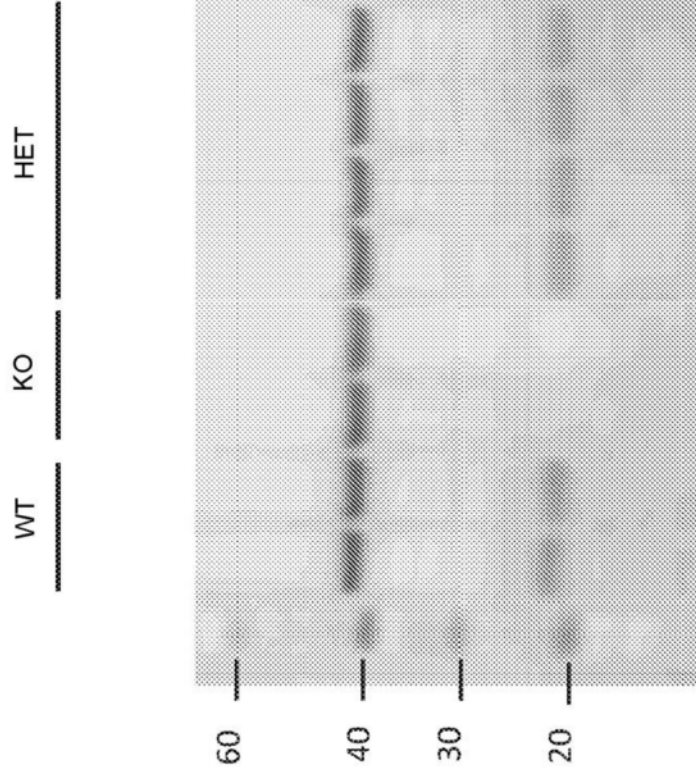
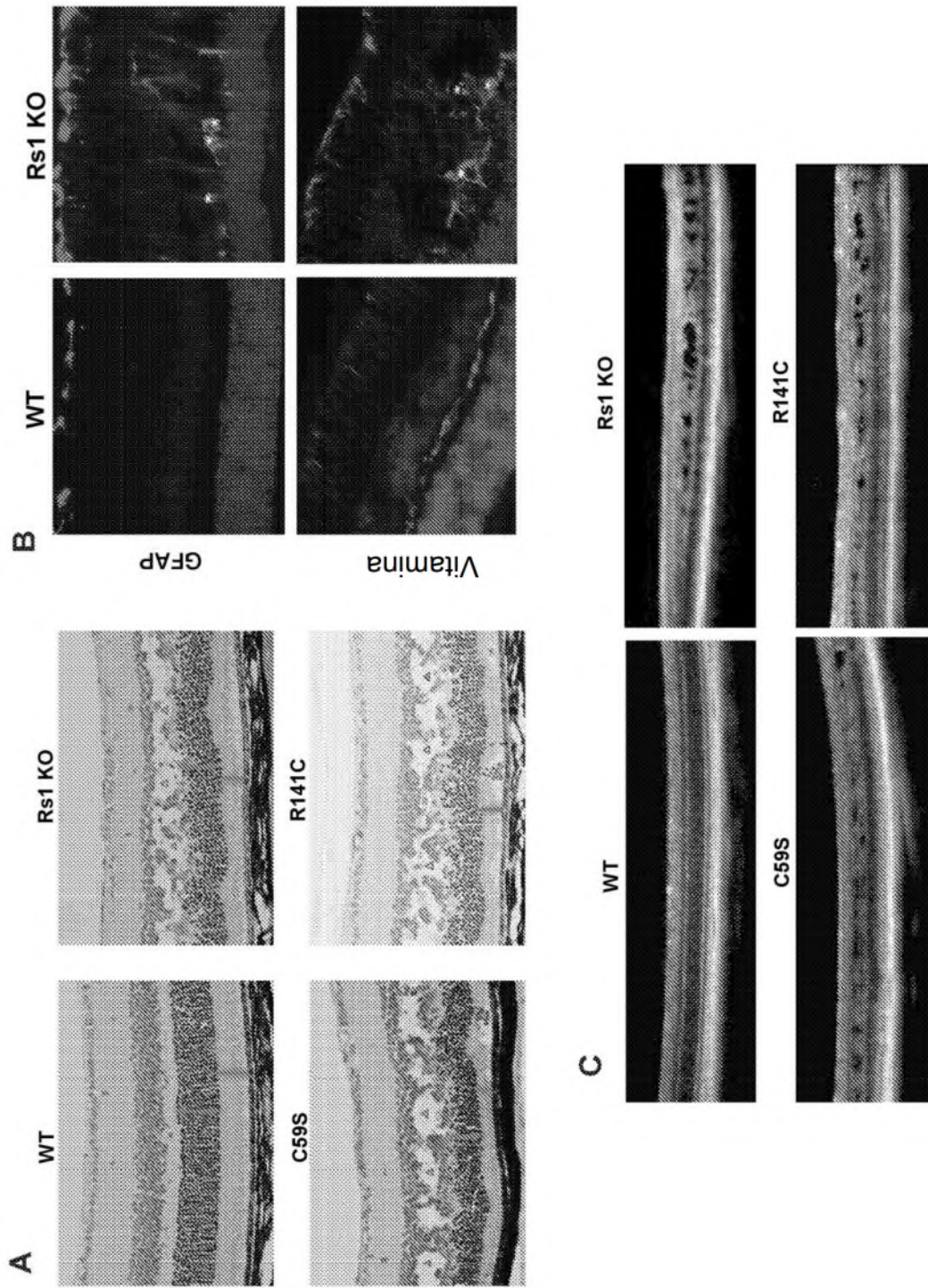


Figura 12E



Figuras 13A-13C

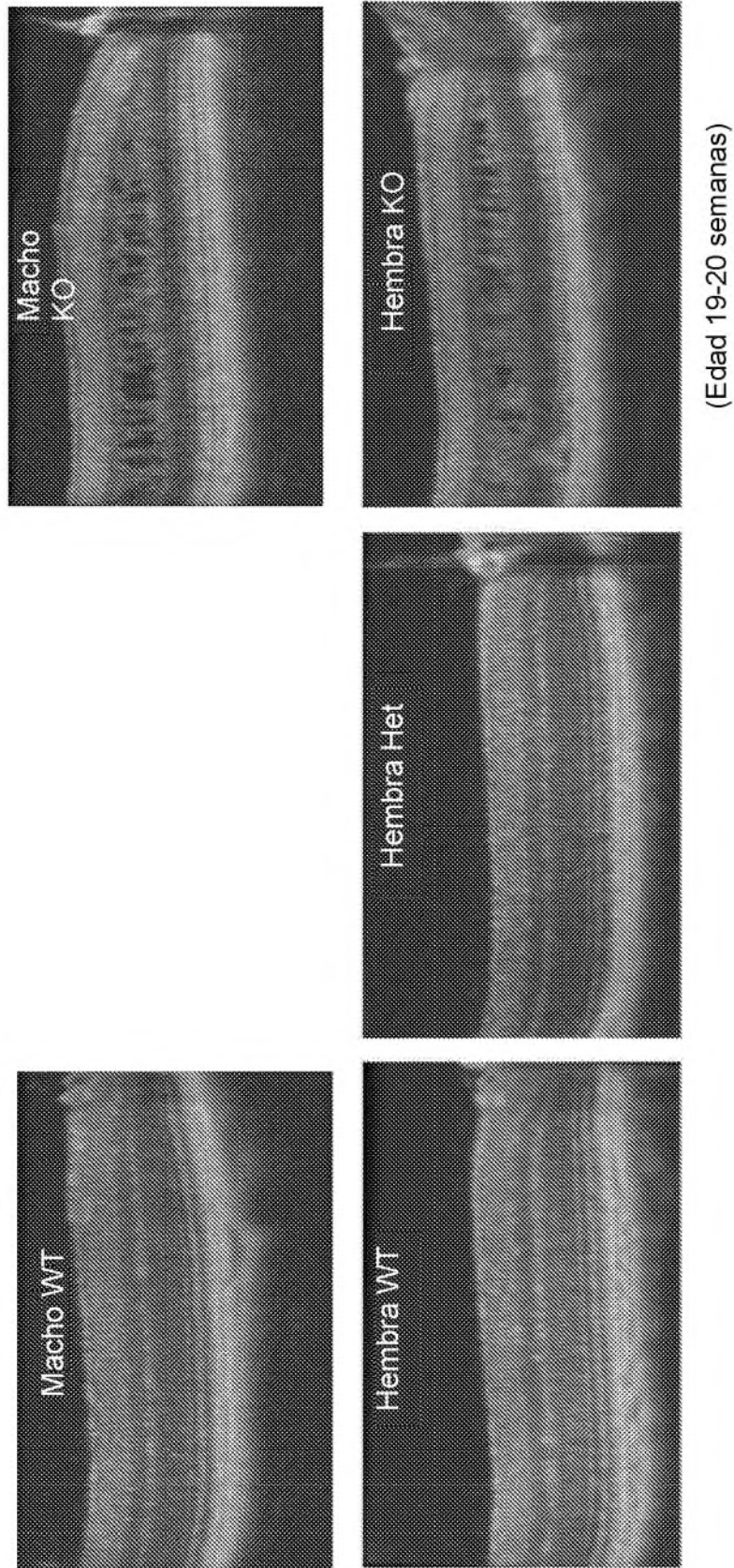
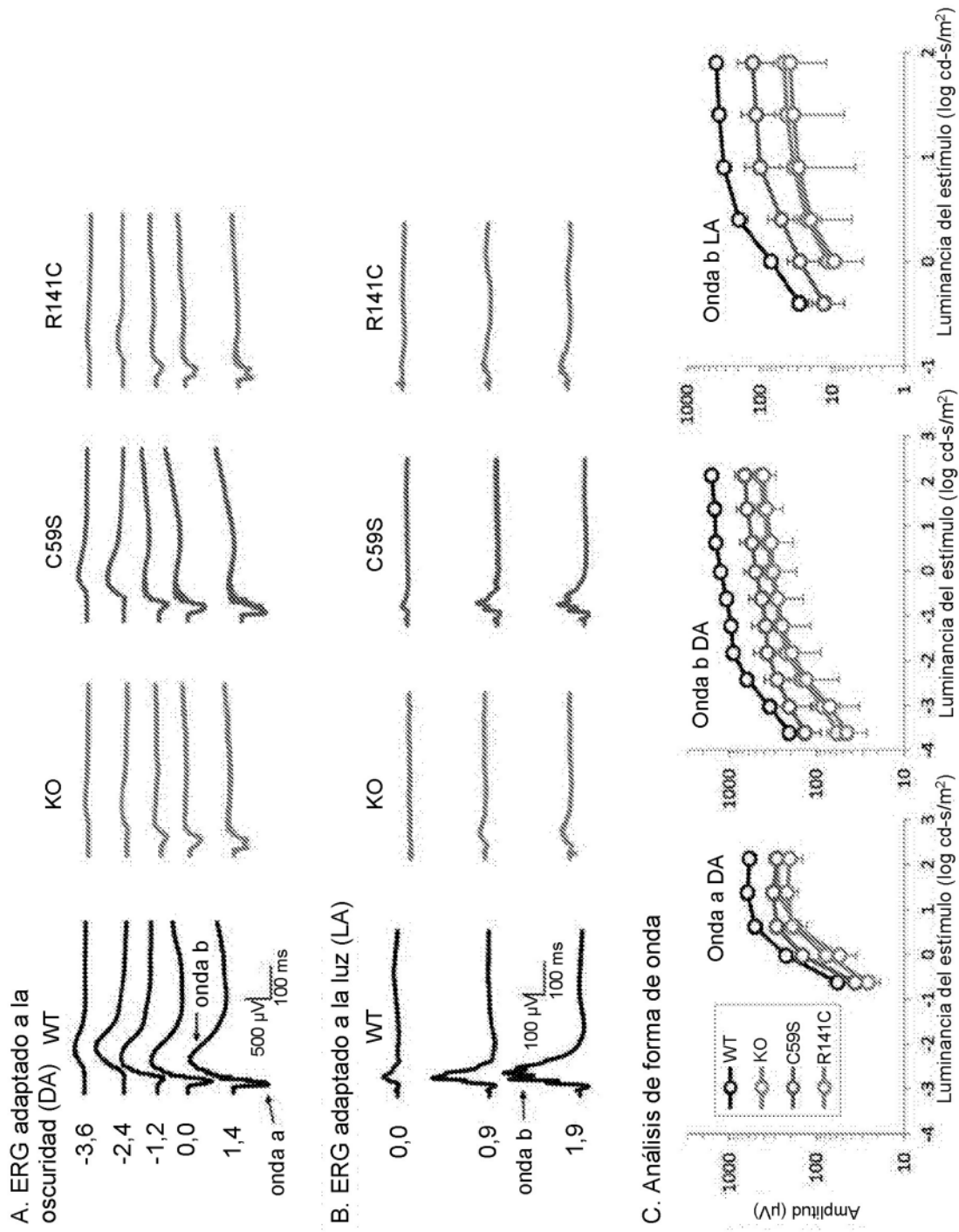


Figura 13D



Figuras 14A-14C

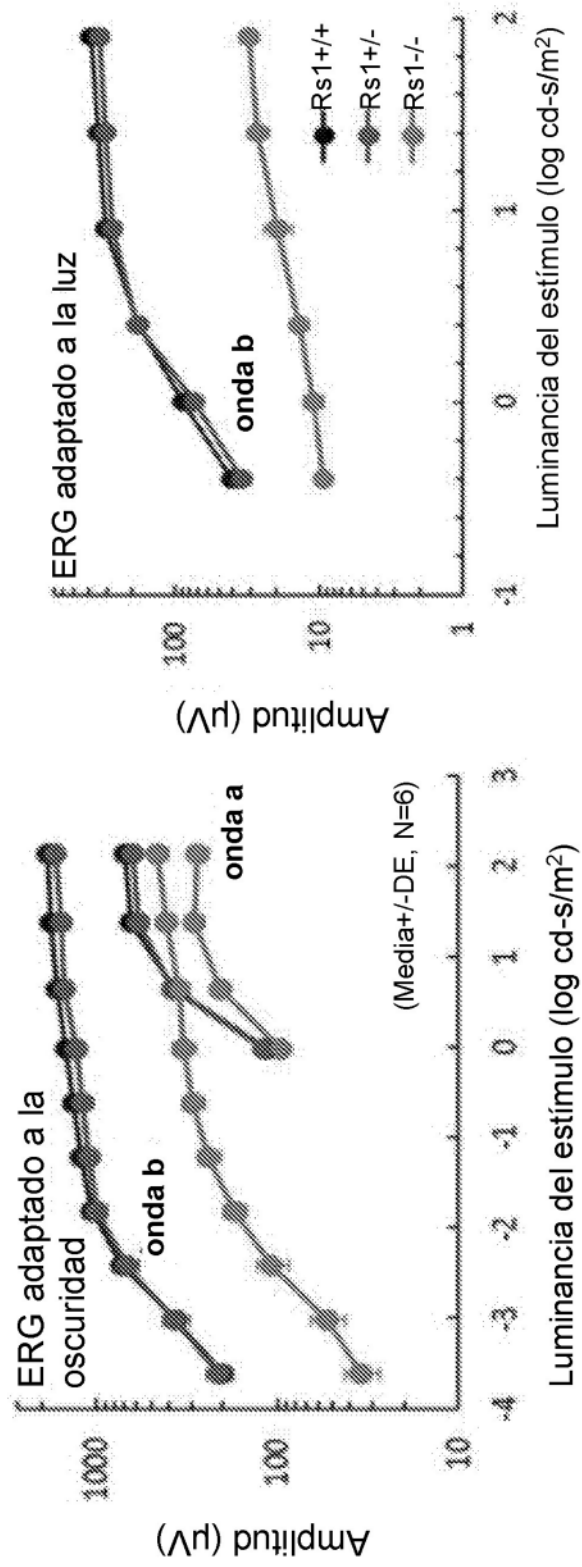


Figura 14D

Diseño experimental

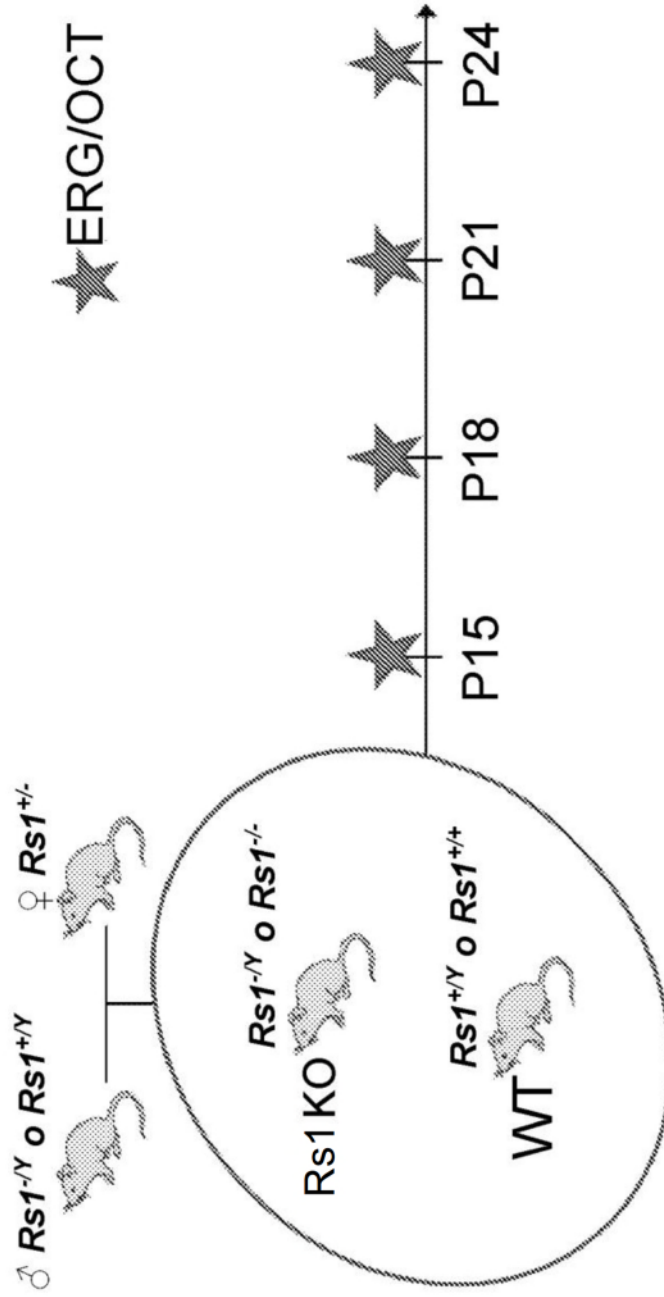
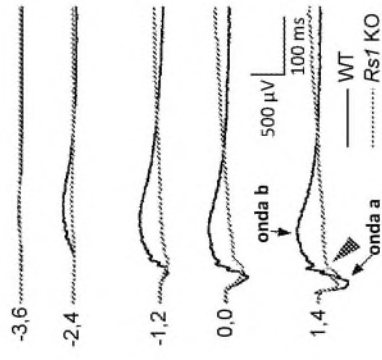
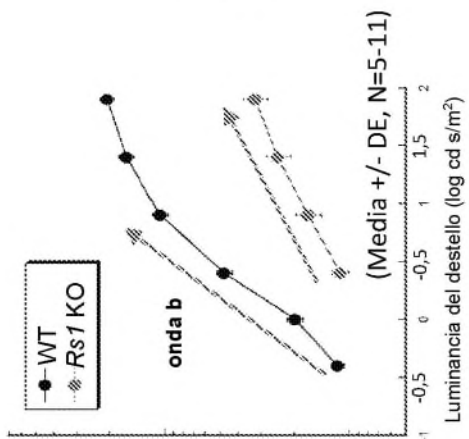
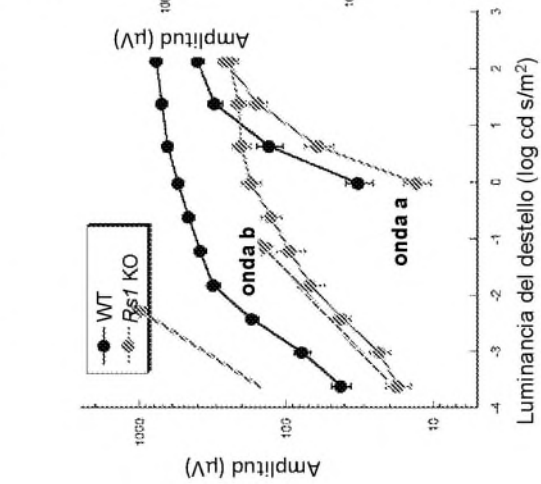
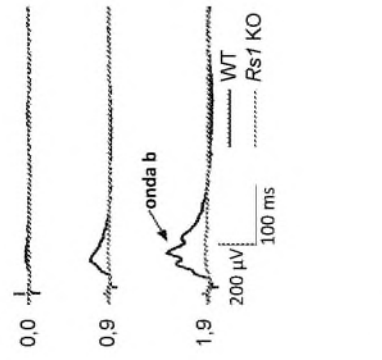


Figura 15

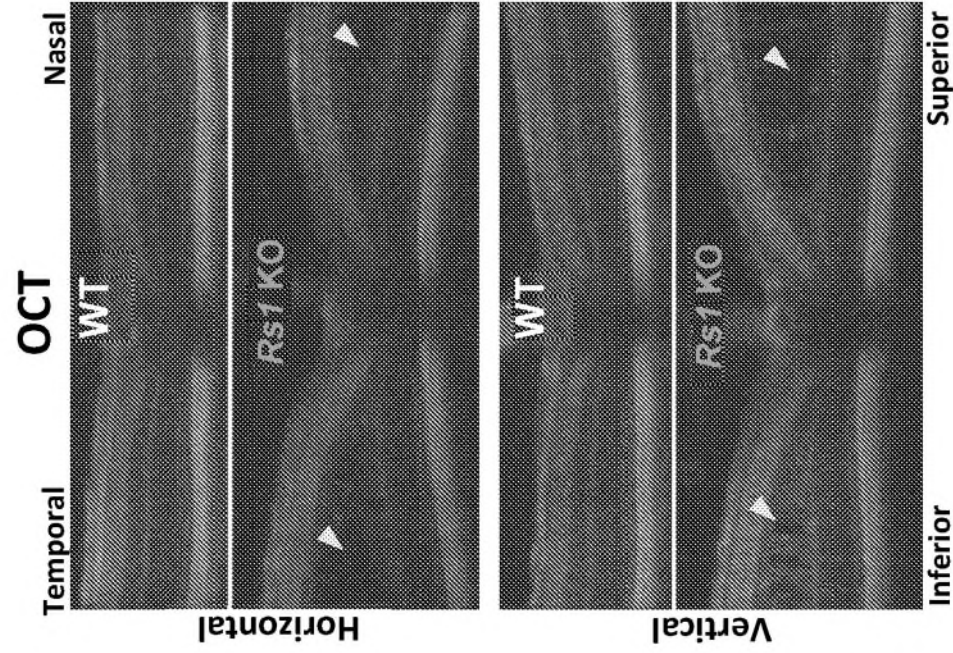
A. ERG DA en P15



B. ERG LA en P15

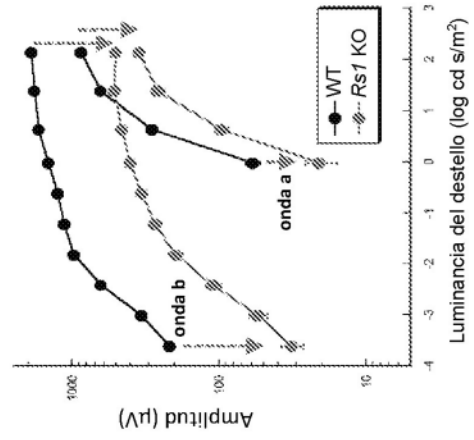
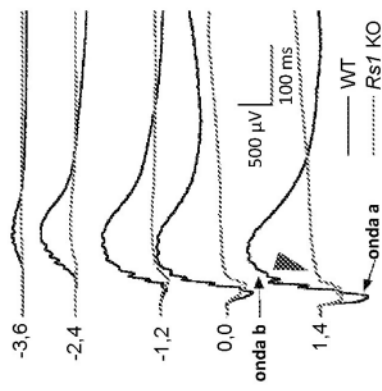


C. OCT en P15

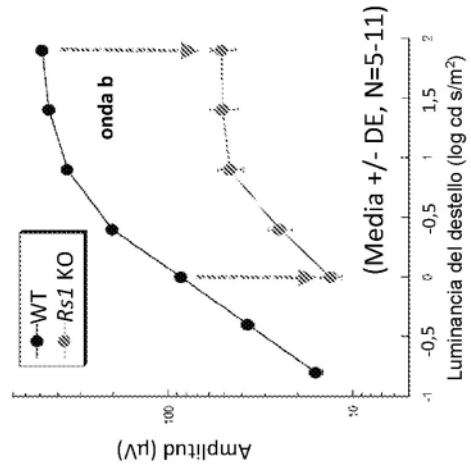
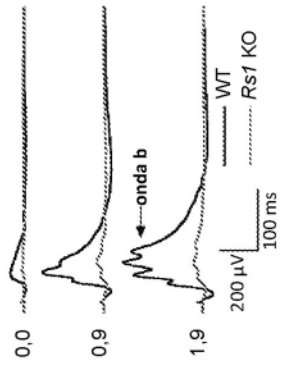


Figuras 16A-16C

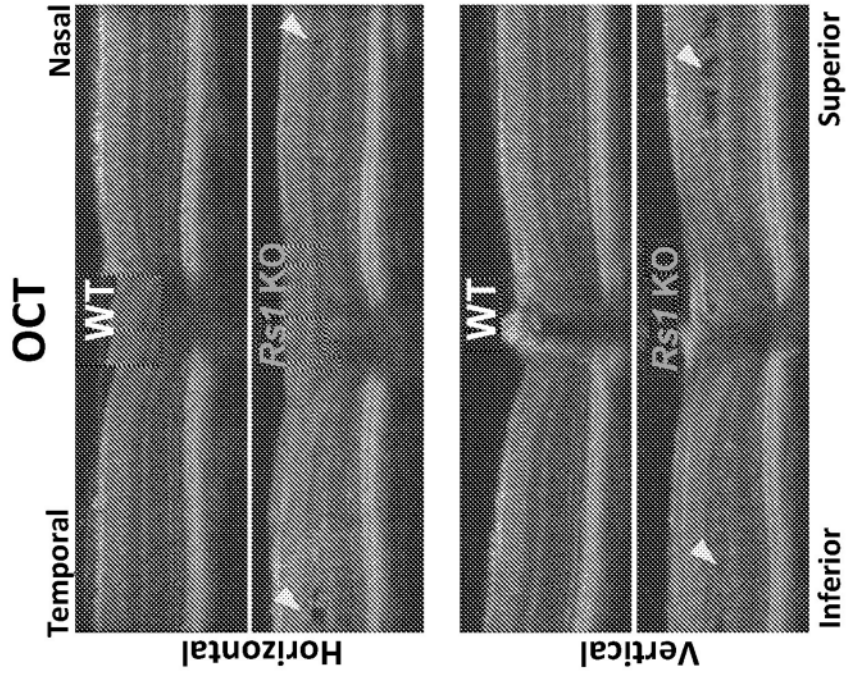
D. ERG DA en P24



E. ERG LA en P24



F. OCT en P24



Figuras 16D-16F

A. ERG DA

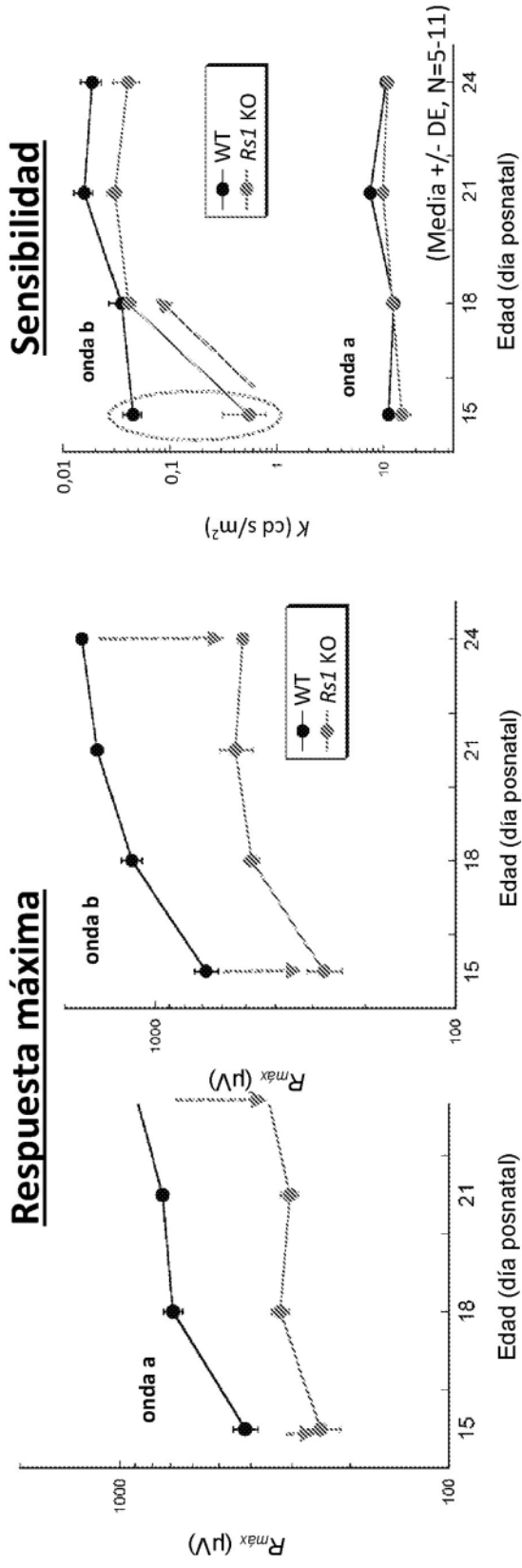


Figura 17A

B. ERG LA

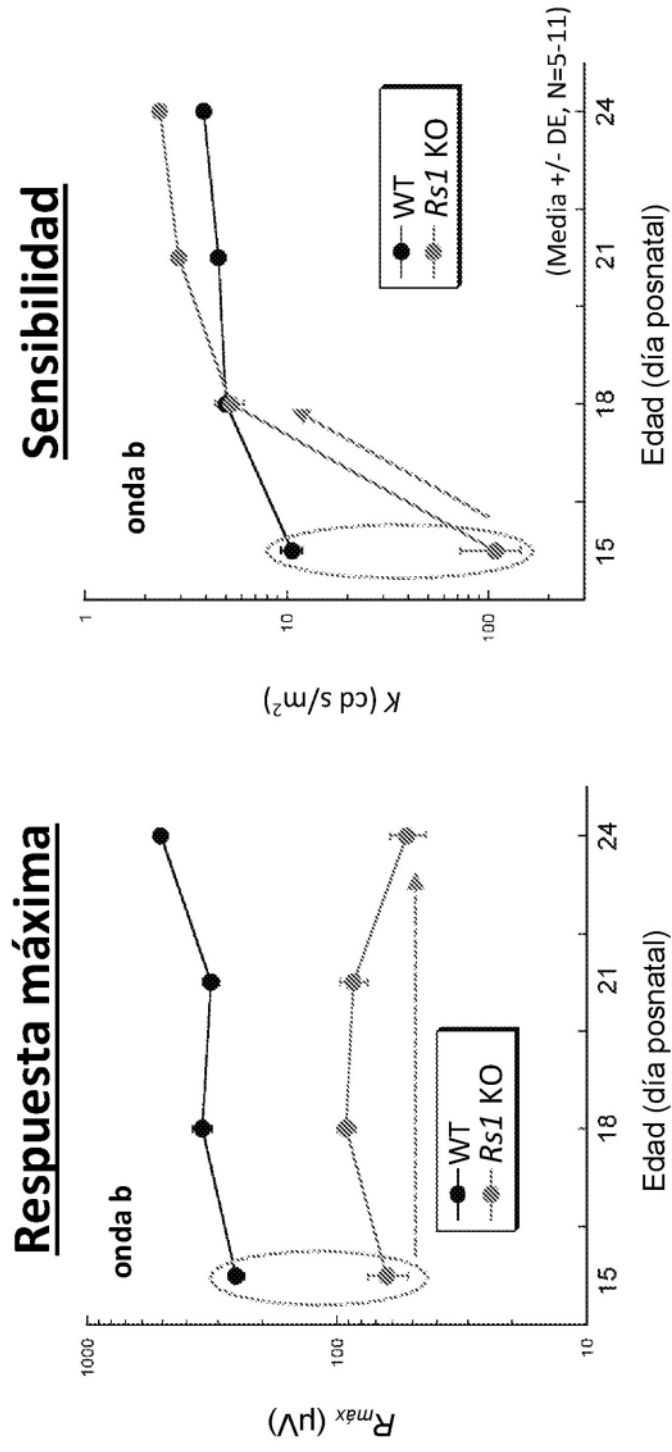


Figura 17B

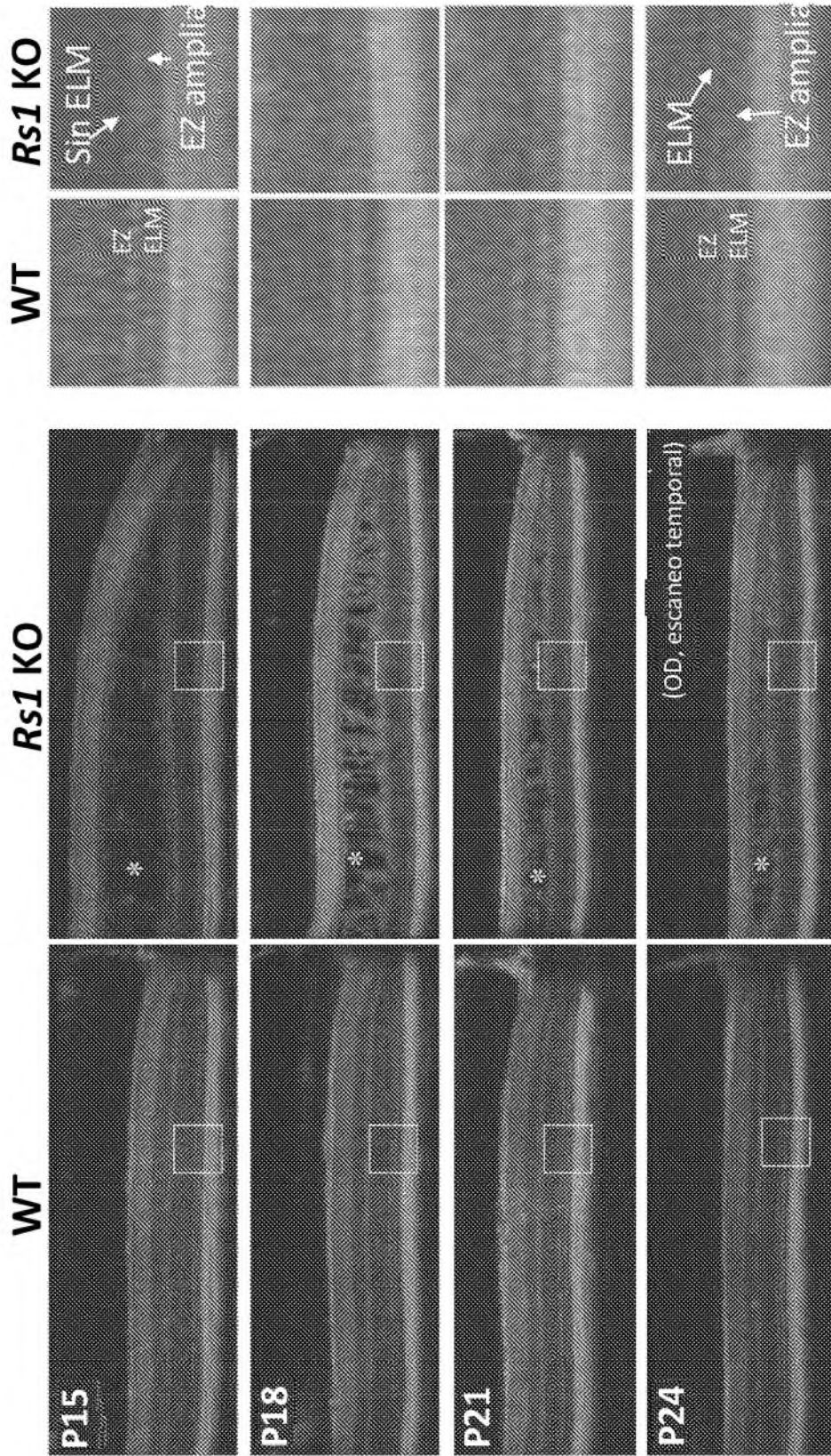
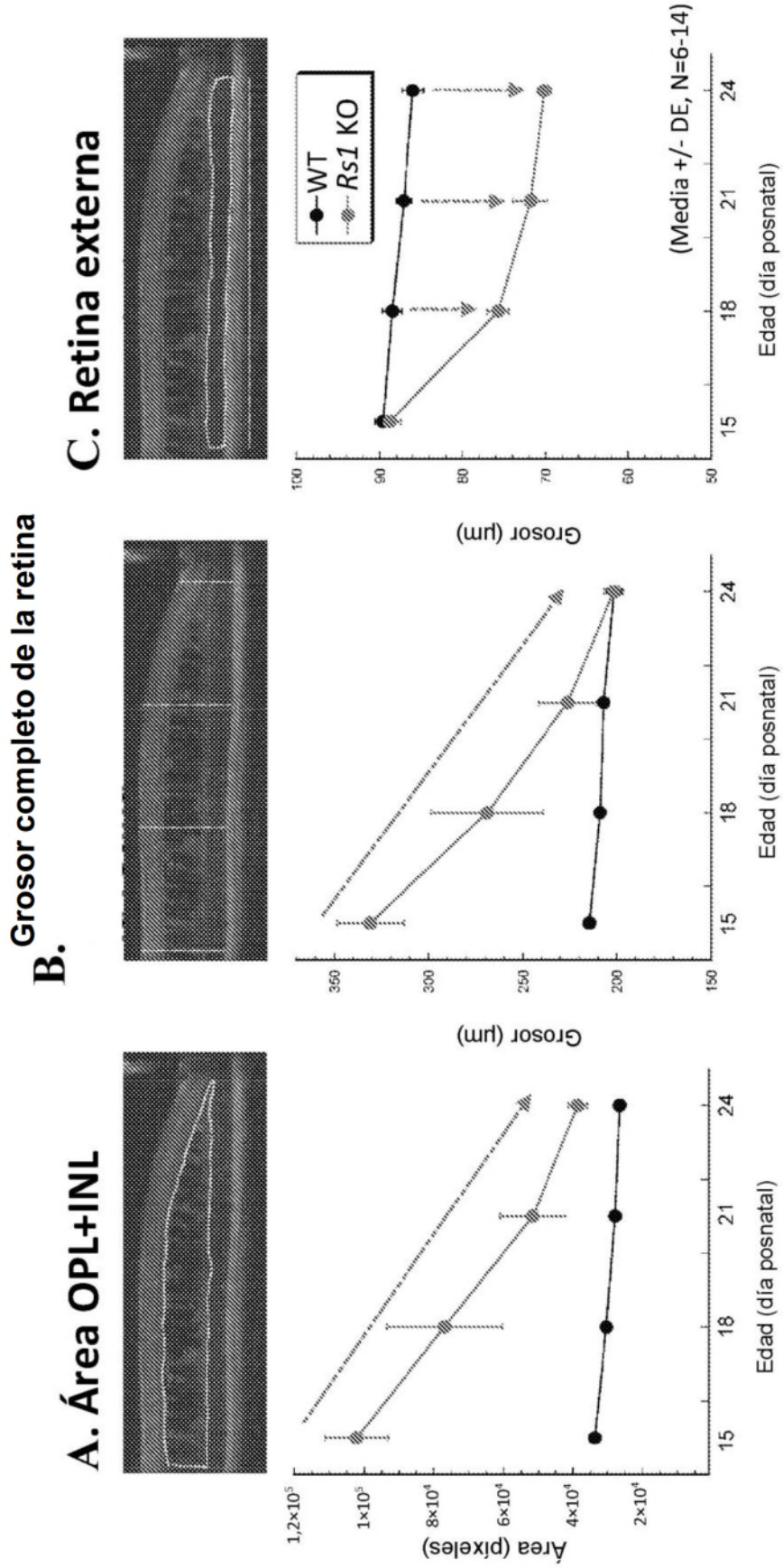


Figura 18



Figuras 19A-19C

ratón	MPHKIEGFFLLLLFGYEATLGLSSTEDGEDPWYQKACKDCQGANALWSAGATSLDCI	60
rata	MPHKIEGFFLLLLFGYEATLGLSSTEDGEDPWYQKACKDCQGANALWSAGAASLDCI	60
humano	MSRKIEGFFLLLLFGYEATLGLSSTEDGEDPWYQKACKDCQGGPNALWSAGATSLDCI	60
	* * * * *	
ratón	PECPYHKPLGFESGEVTPDQITCSNPEQYVGYSSWTANKARLNSQFGCAWLSKYQDSS	120
rata	PECPYHKPLGFESGEVTPDQITCSNPEQYVGYSSWTANKARLNSQFGCAWLSKYQDSS	120
humano	PECPYHKPLGFESGEVTPDQITCSNPEQYVGYSSWTANKARLNSQFGCAWLSKFFQDSS	120
	* * * * *	
ratón	QWLQIDLKEIKVISGILTQGRCDIDEWVTKYSVQYRTDERLNWIYYKDQGTGNNRVFYGNS	180
rata	QWLQIDLKEIKVISGILTQGRCDIDEWMTKYSVQYRTDERLNWIYYKDQGTGNNRVFYGNS	180
humano	QWLQIDLKEIKVISGILTQGRCDIDEWMTKYSVQYRTDERLNWIYYKDQGTGNNRVFYGNS	180
	* * * * *	
ratón	DRSSTVQNLRRPPIISRFIRLIPLGWHVRIAIRMELLECAKCA	224
rata	DRSSTVQNLRRPPIISRFIRLIPLGWHVRIAIRMELLECAKCA	224
humano	DRTSTVQNLRRPPIISRFIRLIPLGWHVRIAIRMELLECVSKCA	224
	* * * * *	

Figura 20