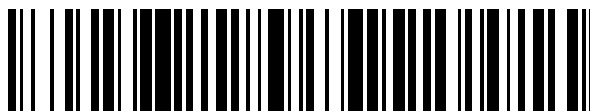


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 360**

51 Int. Cl.:

A01K 67/02 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.05.2016** **PCT/US2016/034304**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016** **WO16196185**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2016** **E 16731693 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020** **EP 3302048**

54 Título: **Animales no humanos que tienen una interrupción en un locus C9ORF72**

30 Prioridad:

29.05.2015 US 201562168171 P

25.09.2015 US 201562232658 P

23.10.2015 US 201562245382 P

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

24.09.2020

73 Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)

777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591-6707, US

72 Inventor/es:

ATANASIO, AMANDA;
IKIZ, BURCIN;
GONG, GUOCHUN;
LACROIX-FRALISH, MICHAEL L.;
LAI, KA-MAN VENUS y
VALENZUELA, DAVID M.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 784 360 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

Animales no humanos que tienen una interrupción en un locus C9ORF72

5 Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad a la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 62/168,171 presentada el 29 de mayo de 2015, la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 62/232,658 presentada el 25 de septiembre de 2015, y la solicitud provisional de los Estados Unidos núm. 62/245,382 presentada el 23 de octubre de 2015.

Incorporación del listado de secuencias como referencia

15 El listado de secuencias en un archivo de texto ASCII, denominado como 32698_10152US01_SequenceListing de 56 KB, creado el 19 de mayo de 2016, y enviado a la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos a través de EFS-Web.

Antecedentes

20 Las enfermedades neurodegenerativas son las principales contribuyentes a la discapacidad y la enfermedad. En particular, la esclerosis lateral amiotrófica (ALS, también denominada como enfermedad de Lou Gehrig) y la demencia frontotemporal (FTD) son trastornos raros del sistema nervioso caracterizados por la pérdida y/o muerte neuronal progresiva. Aunque el envejecimiento se considera como el mayor factor de riesgo para la enfermedad neurodegenerativa, se han descubierto varios componentes genéticos. Por ejemplo, las mutaciones en el gen de la superóxido dismutasa de cobre-zinc (SOD1) se han asociado durante mucho tiempo con la ALS. Además, las repeticiones de hexanucleótidos expandidas de GGGGCC dentro de una región no codificante del gen C9ORF72 se han relacionado tanto con la ALS como con la FTD. Actualmente, no existe cura para ninguna de ambas enfermedades, pero sí existen tratamientos que ayudan a controlar y/o aliviar los síntomas.

30 Las enfermedades inflamatorias incluyen una gran variedad de enfermedades que se caracterizan a menudo por una mutación(es) genética(s) que resulta(n) en un sistema inmunitario deteriorado o disfuncional. Aunque los mecanismos de, por ejemplo, la artritis reumatoide, la enfermedad inflamatoria intestinal y la glomerulonefritis no se comprenden completamente, varios componentes genéticos se han relacionado con los diversos signos y síntomas presentados por los pacientes. Dichas enfermedades se caracterizan por inflamación sistémica y muestran diversas anomalías en todo el cuerpo del paciente. Al igual que con la ALS y la FTD, los tratamientos para las enfermedades inflamatorias solo tienen como objetivo mejorar los síntomas y retrasar el progreso de la enfermedad.

40 Si bien diversos modelos de animales de laboratorio se usan ampliamente en el desarrollo de la mayoría de los agentes terapéuticos, existen pocos que aborden las enfermedades neurodegenerativas e inflamatorias de manera que proporcionen la elucidación del mecanismo molecular exacto por el cual los componentes genéticos identificados provocan la enfermedad. Por lo tanto, la forma en que las mutaciones genéticas provocan enfermedades neurodegenerativas y/o inflamatorias aún es en gran medida desconocida. Los modelos animales ideales contendrían los mismos componentes genéticos y representarían características similares de la enfermedad humana. Dadas las diferencias genéticas entre especies, existe una gran necesidad insatisfecha del desarrollo de modelos animales mejorados que resuman fielmente la enfermedad neurodegenerativa y/o inflamatoria humana. Por supuesto, dichos modelos animales mejorados proporcionan un valor significativo en el desarrollo de agentes terapéuticos y/o profilácticos eficaces.

50 Naoki Suzuki y otros, Neuroscience, vol. 16, núm. 12, 3 de noviembre de 2013, páginas 1725-1727 describen un ratón transgénico que presenta una inserción LacZ dirigida que reemplaza a los exones 2-6 de C9orf72. S.K. Panda y otros, Genetics, vol 195, núm. 3, 26 de agosto de 2013, páginas 703-713 describen la generación de un ratón con anulación del gen C9orf72 en donde la interrupción del homólogo de ratón del gen C9orf72 se generó mediante la creación de mutaciones con desplazamiento de marco inducidas por TALEN. Alan Stepto y otros, Acta Neuropathologica, vol 127, núm. 3, 1 de marzo de 2014, páginas 377-389 proporcionan un análisis sobre si la reducción o la pérdida de la función de C9orf72 contribuye a la enfermedad y resume los resultados mediante el análisis de diversos modelos animales. Los documentos WO2013/030588 y WO2013/041577 describen métodos para diagnosticar una enfermedad neurodegenerativa tal como la ALS y la FTLD.

Breve descripción de la Invención

60 La invención es como se define en las reivindicaciones.

En un primer aspecto de la invención, se proporciona un roedor que comprende en su genoma una delección de la porción codificante del exón 2 hasta la porción codificante del exón 11 de un locus C9orf72 endógeno, en donde el roedor desarrolla uno o más síntomas de (i) desregulación o disfunción del sistema inmunitario y/o (ii) anomalías motoras y neurológicas similares a las encontradas en enfermedades de las neuronas motoras humanas.

En otro aspecto, se proporciona una célula o tejido de roedor aislado cuyo genoma comprende una delección de la porción codificante del exón 2 hasta la porción codificante del exón 11 de un locus C9orf72 endógeno.

5 En otro aspecto, se proporciona una célula madre embrionaria de roedor cuyo genoma comprende una delección de la porción codificante del exón 2 hasta la porción codificante del exón 11 de un locus C9orf72 endógeno.

10 En otro aspecto, se proporciona un método para crear un roedor cuyo genoma comprende una delección de la porción codificante del exón 2 hasta la porción codificante del exón 11 de un locus C9orf72 endógeno, el método comprende: modificar el genoma de un roedor para que comprenda la delección de la porción codificante del exón 2 hasta la porción codificante del exón 11 del locus C9orf72 endógeno, lo que crea de esta manera dicho roedor, en donde el roedor desarrolla uno o más síntomas de (i) desregulación o disfunción del sistema inmunitario y (ii) anomalías motoras y neurológicas similares a las encontradas en enfermedades de las neuronas motoras humanas.

15 En otro aspecto, se proporciona un método para identificar un candidato terapéutico para el tratamiento de uno o más síntomas de (i) desregulación o disfunción del sistema inmunitario y (ii) anomalías motoras y neurológicas similares a las encontradas en enfermedades de las neuronas motoras humanas en un roedor, el método comprende: (a) administrar un agente candidato a un roedor de la invención; (b) realizar uno o más ensayos para determinar si el agente candidato tiene un efecto sobre uno o más síntomas de (i) 20 desregulación o disfunción del sistema inmunitario y (ii) anomalías motoras y neurológicas similares a las encontradas en enfermedades de las neuronas motoras humanas; e (c) identificar el agente candidato que tiene un efecto sobre uno o más síntomas de (i) desregulación o disfunción del sistema inmunitario y (ii) anomalías motoras y neurológicas similares a las encontradas en enfermedades de las neuronas motoras humanas como el candidato terapéutico.

25 La presente invención abarca el reconocimiento de que es conveniente modificar genéticamente animales no humanos para permitir sistemas *in vivo* mejorados para identificar y desarrollar nuevos agentes terapéuticos y, en algunas modalidades, regímenes terapéuticos, que puedan usarse para el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones neurodegenerativas. En algunas modalidades, los sistemas *in vivo* como se describen en la presente descripción pueden usarse para identificar y desarrollar nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones inflamatorias. En algunas modalidades, los sistemas *in vivo* como se describen en la presente descripción pueden usarse, además, para identificar y desarrollar nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones autoinmunitarias. Además, los animales no humanos descritos en la presente descripción que comprenden una interrupción en un locus C9ORF72 y/o de cualquier otra manera un locus C9ORF72 funcionalmente 35 silenciado, de manera que un polipéptido C9ORF72 no se expresa o produce, son convenientes, por ejemplo, para su uso en la identificación y el desarrollo de agentes terapéuticos que se dirigen a una repetición de hexanucleótidos GGGGCC, transcripción y regulación de C9ORF72, y/o aumentar o disminuir los niveles de C9ORF72, que se han asociado con enfermedades en humanos. En algunas modalidades, los animales no humanos de la invención proporcionan sistemas (o modelos) *in vivo* mejorados para enfermedades, trastornos y afecciones neurodegenerativas (por ejemplo, ALS y/o FTD). En algunas modalidades, los animales no humanos de la invención proporcionan sistemas (o modelos) *in vivo* mejorados para enfermedades, trastornos y afecciones inflamatorias.

40 La presente invención proporciona modelos animales no humanos para la esclerosis lateral amiotrófica (ALS), demencia frontotemporal (FTD) y/o glomerulonefritis. En diversos ejemplos, se proporcionan modelos animales no humanos para la ALS y/o la FTD, que se caracterizan por una interrupción (por ejemplo, una delección de toda la región codificante) en un locus C9ORF72. En algunos ejemplos, una interrupción en un locus C9ORF72 afecta a una o más neuronas de un animal no humano que comprende dicha interrupción. En algunos ejemplos, una interrupción en un locus C9ORF72 afecta a uno o más de bazo, ganglios linfáticos cervicales, médula ósea, riñones y sangre de un animal no humano que comprende dicha interrupción.

50 En algunos ejemplos, una interrupción en un locus C9ORF72 de un animal no humano como se describe en la presente descripción resulta en uno o más de los siguientes fenotipos: un fenotipo similar a la ALS; esplenomegalia; linfadenopatía; glomerulonefritis; una infiltración de uno o más de macrófagos, monocitos y granulocitos en el bazo, los ganglios linfáticos cervicales, la médula ósea y/o la sangre; una infiltración de macrófagos F4/80⁺ en el riñón y/o el hígado; un agotamiento de las células B y/o T en la médula ósea; una disminución de linfocitos en la sangre; y un aumento en la expresión de una o más citocinas (por ejemplo, IL-17, IL-10, TNF- α e IL-12) en el suero.

55 En algunos ejemplos, una interrupción (por ejemplo, una delección) en un locus C9ORF72 no humano resulta de una inserción de una secuencia de ácido nucleico que, en algunas modalidades determinadas, comprende un gen indicador.

60 En algunos ejemplos, se proporciona un animal no humano que comprende en su genoma una delección de toda la secuencia codificante en un locus C9ORF72, es decir, una delección de una secuencia genómica que codifica todas las isoformas de C9ORF72 (es decir, isoformas V1, V2 y V3).

65 En algunos ejemplos, una delección es de un segmento genómico de aproximadamente 26 kb en un locus C9ORF72 de un animal no humano. En algunos ejemplos, una delección es de un segmento genómico que abarca al menos los exones

2-11 (por ejemplo, los exones 2-11 de V1), en su totalidad o en parte. En algunos ejemplos, una delección incluye los exones 1-11. En algunas modalidades, un locus *C9ORF72* que tiene una delección comprende un gen indicador. En algunas modalidades, un gen indicador se une operativamente a un promotor de *C9ORF72*. En algunas modalidades, un promotor de *C9ORF72* es un promotor endógeno.

En algunas modalidades, un locus *C9ORF72* de un animal no humano descrito en la presente descripción carece de la región codificante del exón 2 hasta la región codificante del exón 11, y comprende un gen indicador. En algunas modalidades, el gen indicador se une operativamente a un promotor de *C9ORF72*. En algunas modalidades, el gen indicador se une operativamente a la región no codificante del exón 2 (es decir, parte de la UTR 5') de un gen *C9ORF72*, lo que coloca de esta manera el gen indicador en unión operativa con el exón 1 (es decir, el exón 1a o el exón 1b) y las secuencias reguladoras aguas arriba (lo que incluye el promotor) de un locus *C9ORF72* de un animal no humano. En modalidades específicas, la unión operativa entre un gen indicador y la porción no codificante del exón 2 se logra mediante la delección dirigida de una secuencia genómica *C9ORF72* a partir del codón inmediatamente después del codón de inicio ATG en el exón 2 hasta la región codificante del exón 11, y la inserción de una secuencia codificante indicadora sin un codón de inicio ATG en el sitio del locus *C9ORF72* inmediatamente después del codón de inicio ATG restante en el exón 2 del gen *C9ORF72*. En algunas modalidades, la expresión de un gen indicador se asemeja al patrón de expresión (o perfil) de un locus *C9ORF72*.

En algunas modalidades, un gen indicador se selecciona del grupo que consiste en β -galactosidasa (*lacZ*), luciferasa, proteína fluorescente verde (GFP), GFP potenciada (eGFP), proteína fluorescente cian (CFP), proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente amarilla potenciada (eYFP), proteína fluorescente azul (BFP), proteína fluorescente azul potenciada (eBFP), DsRed y MmGFP. En algunas modalidades determinadas, un gen indicador es *lacZ*.

En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción es homocigoto o heterocigoto para una delección de toda la secuencia codificante en un locus *C9ORF72*.

En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla uno o más fenotipos como se describe en la presente descripción; en algunas modalidades determinadas, los fenotipos son detectables después de aproximadamente 8 semanas de edad.

En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla uno o más síntomas de ALS y/o FTD durante el desarrollo; en algunas modalidades determinadas, después de aproximadamente 36 semanas de edad; en algunas modalidades determinadas, después de aproximadamente 40 semanas de edad. En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla déficits motores progresivos después de aproximadamente 36 semanas de edad. En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla una patología de las neuronas motoras inferiores después de aproximadamente 40 semanas de edad. En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla una disminución en el peso corporal después de aproximadamente 36 semanas de edad. En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla disfunción mitocondrial en las neuronas motoras durante el desarrollo; en algunas modalidades determinadas, la disfunción mitocondrial se caracteriza por una disminución en una o más de respiración mitocondrial, respiración basal, respiración máxima, capacidad respiratoria de reserva, producción de ATP y fuga de protones; en algunas modalidades determinadas, la disfunción mitocondrial se caracteriza por un aumento en la relación ADN mitocondrial con respecto al nuclear en comparación con la relación ADN mitocondrial con respecto al nuclear de las neuronas motoras de un animal no humano control o de referencia.

En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla uno o más síntomas de glomerulonefritis durante el desarrollo; en algunas modalidades determinadas, después de aproximadamente 35 semanas de edad, después de aproximadamente 35-41 semanas de edad inclusive o después de aproximadamente 35-60 semanas de edad inclusive. En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla esplenomegalia después de aproximadamente 8 semanas de edad. En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla linfadenopatía después de aproximadamente 8 semanas de edad. En algunas modalidades, la linfadenopatía es palpable después de aproximadamente 12-18 semanas de edad inclusive o después de aproximadamente 18-60 semanas de edad inclusive. En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción se caracteriza por una infiltración de una o más de células plasmáticas, monocitos, granulocitos y macrófagos F4/80⁺; en algunas modalidades determinadas, la infiltración es detectable después de aproximadamente 8 semanas de edad; en algunas modalidades determinadas, la infiltración es detectable hasta las 60 semanas de edad. En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla una infiltración de macrófagos F4/80⁺ en el riñón y/o el hígado después de aproximadamente 8 semanas de edad.

En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla un nivel de citocinas en suero incrementado de una o más de IL-10, IL-12, IL-17, IFN- γ , TNF- α y MCP-1 después de aproximadamente 8 semanas de edad. En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla un nivel sérico aumentado de IL-12 después de aproximadamente 8 semanas de edad que es aproximadamente 6 veces o más en comparación con un animal no humano de referencia o control.

- En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla una enfermedad renal caracterizada por una membrana basal engrosada, formación de cilindros (o formación de cilindros hialinos), deposición del complejo inmunitario, glomerulonefritis membranoproliferativa, inflamación mononuclear intersticial, glomeruloesclerosis, túbulos basófilos o combinaciones de estas después de aproximadamente 28-35 semanas de edad inclusive, después de aproximadamente 35-41 semanas de edad inclusive, o después de aproximadamente 35-60 semanas de edad inclusive.
- En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla una población aumentada de células dendríticas mieloides en uno o más de bazo, ganglios linfáticos, médula ósea, riñón y sangre después de aproximadamente 28-35 semanas de edad inclusive. En algunas modalidades, una población de células dendríticas mieloides se caracteriza como CD45⁺CD11b⁺CD11c⁺MHCII⁺.
- En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla un nivel sérico aumentado de uno o más autoanticuerpos después de aproximadamente 8 semanas de edad; en algunas modalidades determinadas, después de aproximadamente 28-35 semanas de edad inclusive. En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla un nivel sérico aumentado de uno o más autoanticuerpos entre aproximadamente 8 semanas y aproximadamente 60 semanas de edad inclusive. En algunas modalidades, uno o más autoanticuerpos se seleccionan entre anticuerpos anti-factor reumatoide (anti-RF), anticuerpos anti-ADNbc, anticuerpos anti-nucleares (ANA), anticuerpos anti-Smith (anti-Sm), anticuerpos anti-cardiolipina, y combinaciones de estos.
- En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla un nivel aumentado de macrófagos F4/80⁺ en uno o más de bazo, ganglios linfáticos, médula ósea, riñón y sangre después de aproximadamente 28-35 semanas de edad inclusive. En algunas modalidades, los macrófagos F4/80⁺ se caracterizan como CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺Ly6G⁻.
- En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla una población de células T aumentada en uno o más de bazo, ganglios linfáticos, médula ósea, riñón y sangre después de aproximadamente 28-35 semanas de edad inclusive. En algunas modalidades, las células T se caracterizan como CD8⁺CD44⁺, CD8⁺CD69⁺, CD8⁺PD1⁺, CD4⁺CD44⁺, CD4⁺CD69⁺ o CD4⁺PD1⁺. En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla una población de células T reguladoras aumentada en el bazo y/o ganglios linfáticos después de aproximadamente 28-35 semanas de edad inclusive, y en donde la población de células T reguladoras se caracteriza como CD4⁺FoxP3⁺. En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla un aumento de células T auxiliares foliculares (Tfh) en el bazo, ganglios linfáticos (por ejemplo, ganglios linfáticos cervicales o "CLN", y ganglios linfáticos mesentéricos o "MLN"), y/o sangre después de aproximadamente 26 semanas de edad, y en donde la población de células Tfh se caracteriza como CD4⁺CXCR5⁺CD44⁺ICOS⁺PD-1⁺Bcl-6⁺.
- En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla una población de células plasmáticas aumentada en uno o más de bazo, ganglios linfáticos y médula ósea después de aproximadamente 8-60 semanas de edad inclusive. En algunas modalidades, una población de células plasmáticas se caracteriza como CD45⁺CD19⁺B220⁺CD138⁺ o CD45⁺CD19^{int}B220^{int}CD138⁺.
- En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla el síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (ALPS) durante el desarrollo. En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla nefritis lúpica durante el desarrollo. En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla glomerulonefropatía proliferativa. En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla uno o más fenotipos asociados con lupus eritematoso sistémico (SLE) durante el desarrollo. En algunas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción desarrolla uno o más fenotipos o síntomas seleccionados del grupo que consiste en títulos de autoanticuerpos elevados y citocinas séricas, linfadenopatía, esplenomegalia y expansiones seleccionadas de los compartimientos mieloides y linfoides, o una combinación de estos. En algunas modalidades, se observan uno o más fenotipos o síntomas tan temprano como a las 8 semanas. En algunas modalidades, se observan uno o más fenotipos o síntomas entre aproximadamente 18 semanas y aproximadamente 24 semanas inclusive.
- En algunas modalidades, se proporciona una célula o tejido no humano aislado de un animal no humano como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, una célula o tejido aislado comprende un locus *C9ORF72* como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, una célula es una célula neuronal o una célula a partir de un linaje neuronal. En algunas modalidades, una célula es de un linaje linfóide o mielóide. En algunas modalidades, una célula se selecciona de una célula B, una célula dendrítica, un macrófago, un monocito y una célula T. 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 combinación de estos.

En algunas modalidades, se proporciona una línea celular inmortalizada, que se crea a partir de una célula aislada de un animal no humano como se describe en la presente descripción.

En algunos ejemplos, se proporciona una célula madre embrionaria no humana cuyo genoma comprende un locus *C9ORF72* como se describe en la presente descripción o una delección en un locus *C9ORF72* como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, una célula madre embrionaria no humana es una célula madre embrionaria de roedor. 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 estas. 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, se proporciona el uso de una célula madre embrionaria no humana, como se describe en la presente descripción, para crear un animal no humano modificado genéticamente. En algunos ejemplos determinados, una célula madre embrionaria no humana es una célula madre embrionaria de ratón y se usa para crear un ratón que comprende un locus *C9ORF72* como se describe en la presente descripción. En algunos ejemplos determinados, una célula madre embrionaria no humana es una célula madre embrionaria de rata y se usa para crear una rata que comprende un locus *C9ORF72* como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, se proporciona un embrión no humano que comprende, se crea a partir de, o se obtiene a partir de, o se genera a partir de una célula madre embrionaria no humana que comprende un locus *C9ORF72* como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades determinadas, un embrión no humano es un embrión de roedor; en algunas modalidades, un embrión de ratón; en algunas modalidades, un embrión de rata.

En algunas modalidades, se proporciona el uso de un embrión no humano, como se describe en la presente descripción, para crear un animal no humano modificado genéticamente. En algunos ejemplos determinados, un embrión no humano es un embrión de ratón y se usa para crear un ratón que comprende un locus *C9ORF72* como se describe en la presente descripción. En algunos ejemplos determinados, un embrión no humano es un embrión de rata y se usa para crear una rata que comprende un locus *C9ORF72* como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, se proporciona un constructo de ácido nucleico (o constructo de direccionamiento o vector de direccionamiento) como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, un constructo de ácido nucleico como se describe en la presente descripción comprende, en dirección 5' a 3', un brazo de direccionamiento no humano que comprende un polinucleótido que es homólogo a una porción en dirección 5' de un locus *C9ORF72* no humano (por ejemplo, un roedor tal como un ratón o una rata), un primer sitio de reconocimiento de recombinasa; un primer promotor unido operativamente a un gen de recombinasa, un segundo promotor unido operativamente a un marcador seleccionable, un segundo sitio de reconocimiento de recombinasa, un gen indicador como se describe en la presente descripción, y un brazo de direccionamiento no humano que comprende un polinucleótido que es homólogo a una porción en dirección 3' de un locus *C9ORF72* no humano (por ejemplo, un roedor tal como un ratón o una rata). En algunas modalidades, la porción en dirección 3' de un locus *C9ORF72* no humano incluye una secuencia genómica aguas abajo del codón de parada en el exón 11 de un gen *C9ORF72* no humano (por ejemplo, un roedor tal como un ratón o una rata). En algunas modalidades, la porción en dirección 5' de un locus *C9ORF72* incluye una secuencia genómica aguas arriba del codón de inicio en el exón 2 de un gen *C9ORF72* no humano (por ejemplo, un roedor tal como un ratón o una rata). En muchas modalidades, los sitios de reconocimiento de recombinasa primero y segundo se orientan para dirigir una escisión. En muchas modalidades, un gen de recombinasa codifica una recombinasa que reconoce el primer y el segundo sitio de reconocimiento de recombinasa. En muchas modalidades, un primer promotor conduce la expresión de un gen de recombinasa en células diferenciadas y no conduce la expresión del gen de recombinasa en células no diferenciadas. En muchas modalidades, un primer promotor es competente transcripcionalmente y regulado por el desarrollo.

En algunas modalidades, los sitios de reconocimiento de recombinasa incluyen *loxP*, *lox511*, *lox2272*, *lox2372*, *lox66*, *lox71*, *loxM2*, *lox5171*, FRT, FRT11, FRT71, attP, att, FRT, Dre, rox o una combinación de estos. 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, los sitios de reconocimiento de recombinasa son sitios *lox* (por ejemplo, *loxP*), y un gen de recombinasa codifica una recombinasa Cre.

En algunas modalidades, se selecciona un primer promotor 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 determinadas, se selecciona un primer promotor de un promotor que aparece en la Tabla 2. En algunas modalidades determinadas, un primer promotor es o comprende la SEQ ID NO:5, la SEQ ID NO:6 o la SEQ ID NO:7.

En algunas modalidades, se selecciona un marcador seleccionable del grupo que consiste en neomicina fosfotransferasa (neo^r), higromicina B fosfotransferasa (hyg^r), puromycin-N-acetiltransferasa (puro^r), blasticidin S desaminasa (bsr^r), xantina/guanina fosforibosil transferasa (gpt) y timidina quinasa del virus del herpes simple (HSV-tk).

En algunas modalidades, se selecciona un segundo promotor del grupo que consiste en un promotor UbC, promotor Ubi, promotor hCMV, promotor mCMV, promotor CAGGS, promotor EF1, promotor pgk1, promotor beta-actina y un promotor ROSA26. En algunas modalidades determinadas, un marcador seleccionable es neo^r y un segundo promotor es Ubi.

- 5 En algunas modalidades, se proporciona un método para crear un animal no humano cuyo genoma comprende una delección de toda la secuencia codificante en un locus *C9ORF72*, el método comprende (a) introducir una secuencia de ácido nucleico en una célula madre embrionaria no humana de manera que se elimina toda la secuencia codificante en un locus *C9ORF72*, cuyo ácido nucleico comprende un polinucleótido que es homólogo al locus *C9ORF72*; (b) obtener una célula madre embrionaria no humana modificada genéticamente a partir de (a); y (c) crear un animal no humano mediante el uso de la célula madre embrionaria no humana modificada genéticamente de (b). En algunas modalidades, un método para crear un animal no humano descrito en la presente descripción comprende, además, una etapa de reproducir un animal no humano generado en (c) de manera que se cree un animal no humano homocigoto para una delección.
- 10
- 15 En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico es, comprende o aparece en un constructo de ácido nucleico como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico comprende uno o más marcadores de selección. En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico comprende uno o más sitios de recombinación específica de sitio. En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico comprende un gen de recombinasa y un marcador de selección flanqueado por sitios de reconocimiento de recombinasa, cuyos sitios de reconocimiento de recombinasa se orientan para dirigir una escisión. En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico comprende, además, un gen indicador ubicado aguas abajo de un marcador de selección. En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico comprende un gen de recombinasa unido operativamente a un promotor que conduce la expresión del gen de recombinasa en células diferenciadas y que no conduce la expresión del gen de recombinasa en células no diferenciadas. En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico comprende un gen de recombinasa unido operativamente a un promotor que es competente transcripcionalmente y regulado por el desarrollo. En algunas modalidades, una secuencia de ácido nucleico comprende un gen de recombinasa unido operativamente a un promotor que es o comprende la SEQ ID NO:5, la SEQ ID NO:6 o la SEQ ID NO:7.
- 20
- 25
- 30 En algunas modalidades, se proporciona un método para crear un animal no humano cuyo genoma comprende una delección de toda la secuencia codificante en un locus *C9ORF72*, el método comprende modificar el genoma de un animal no humano de manera que comprenda una delección de toda la secuencia codificante en un locus *C9ORF72*, lo que crea de esta manera dicho animal no humano.
- 35 En algunas modalidades, se proporciona un animal no humano que puede obtenerse, generarse o producirse a partir de un método como se describe en la presente descripción.
- 40 En algunas modalidades, se proporciona un modelo animal no humano de esclerosis lateral amiotrófica (ALS) o demencia frontotemporal (FTD), cuyo animal no humano tiene un genoma que comprende una delección de toda la secuencia codificante en un locus *C9ORF72*.
- 45 En algunas modalidades, se proporciona un modelo animal no humano de esclerosis lateral amiotrófica (ALS) o demencia frontotemporal (FTD), que se obtiene mediante la delección de toda la secuencia codificante en un locus *C9ORF72*, en donde el animal no humano desarrolla uno o más síntomas de ALS y/o FTD durante el desarrollo.
- 50 En algunas modalidades, se proporciona un modelo animal no humano de glomerulonefritis, cuyo animal no humano tiene un genoma que comprende una delección de toda la secuencia codificante en un locus *C9ORF72*.
- 55 En algunas modalidades, se proporciona un modelo animal no humano de glomerulonefritis, que se obtiene mediante la delección de toda la secuencia codificante en un locus *C9ORF72*, en donde el animal no humano desarrolla uno o más síntomas de glomerulonefritis durante el desarrollo.
- 60 En algunas modalidades, se proporciona un modelo animal no humano de enfermedad linfoproliferativa, cuyo animal no humano tiene un genoma que comprende una delección de toda la secuencia codificante en un locus *C9ORF72*.
- 65 En algunas modalidades, se proporciona un método para identificar un candidato terapéutico para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección en un animal no humano, el método comprende (a) administrar un agente candidato a un animal no humano cuyo genoma comprende una delección de toda la secuencia codificante en un locus *C9ORF72*; (b) realizar uno o más ensayos para determinar si el agente candidato tiene un efecto sobre uno o más signos, síntomas y/o condiciones asociadas con la enfermedad, trastorno o afección; e (c) identificar el agente candidato que tiene un efecto sobre uno o más signos, síntomas y/o condiciones asociados con la enfermedad, trastorno o afección como el candidato terapéutico.

En algunas modalidades, una enfermedad, trastorno o afección en un animal no humano es una enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa. En algunas modalidades, una enfermedad, trastorno o afección en un animal no humano es una enfermedad, trastorno o afección inflamatoria. En algunas modalidades, una enfermedad, trastorno o afección es una enfermedad, trastorno o afección autoinmunitaria.

En algunas modalidades, una enfermedad, trastorno o afección en un animal no humano es el síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (ALPS; también conocido como síndrome de Canale-Smith). En algunas modalidades, el ALPS se caracteriza por un nivel sérico incrementado de IL-10, anticuerpos anti-factor reumatoide (anti-RF), anticuerpos antinucleares (ANA) o combinaciones de estos.

En algunas modalidades, una enfermedad, trastorno o afección en un animal no humano es la nefritis lúpica. En algunas modalidades, la nefritis lúpica se caracteriza por la proliferación y/o expansión mesangial. En algunas modalidades, la nefritis lúpica se caracteriza por una o más anomalías tubulares. En algunas modalidades, una o más anomalías tubulares se seleccionan de dilatación, formación de cilindros, basofilia y combinaciones de estas.

En algunas modalidades, una enfermedad, trastorno o afección en un animal no humano es el lupus eritematoso sistémico (SLE). En algunas modalidades, el SLE se caracteriza por una o más de hiperplasia linfóide, activación de células T, anticuerpos antinucleares (ANA) elevados en suero e inflamación sistémica que afecta el corazón, los pulmones, el hígado, la piel, las articulaciones, el sistema nervioso y los riñones.

En algunas modalidades, se proporciona el uso de un animal no humano, como se describe en la presente descripción, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa.

En algunas modalidades, se proporciona el uso de un animal no humano, como se describe en la presente descripción, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección inflamatoria.

En algunas modalidades, se proporciona el uso de un animal no humano, como se describe en la presente descripción, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección autoinmunitaria.

En algunas modalidades, se proporciona el uso de un animal no humano, como se describe en la presente descripción, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección linfoproliferativa.

En algunas modalidades, se proporciona el uso de un animal no humano, como se describe en la presente descripción, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento del síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (ALPS).

En algunas modalidades, se proporciona el uso de un animal no humano, como se describe en la presente descripción, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la nefritis lúpica.

En algunas modalidades, una enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa es la esclerosis lateral amiotrófica (ALS). En algunas modalidades, una enfermedad, trastorno o afección neurodegenerativa es la demencia frontotemporal (FTD). En algunas modalidades, una enfermedad, trastorno o afección inflamatoria es la glomerulonefritis. En algunas modalidades, una enfermedad, trastorno o afección autoinmunitaria es glomerulonefritis, síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (ALPS), nefritis lúpica o lupus eritematoso sistémico (SLE).

En algunas modalidades, una enfermedad, trastorno o afección autoinmunitaria, como se describe en la presente descripción, se caracteriza por un aumento significativo en la concentración de autoanticuerpos en suero. En algunas modalidades, una enfermedad, trastorno o afección autoinmunitaria, como se describe en la presente descripción, se caracteriza por un aumento significativo en el nivel sérico de una o más citocinas (por ejemplo, IL-10, IL-12, IL-17, TNF- α , etcétera).

En algunas modalidades, una enfermedad, trastorno o afección linfoproliferativa, como se describe en la presente descripción, se caracteriza por un aumento significativo en una o más células inmunitarias en uno o más de bazo, médula ósea, ganglio(s) linfático(s), riñón o sangre. En algunas modalidades, una enfermedad, trastorno o afección linfoproliferativa, como se describe en la presente descripción, se caracteriza por la liberación o desregulación de uno o más linfocitos.

En diversas modalidades, una delección de toda la secuencia codificante en un locus *C9ORF72* incluye delecciones como se describen en la presente descripción. En diversas modalidades, un locus *C9ORF72* no humano incluye un locus *C9ORF72* no humano como se describe en la presente descripción. En diversas modalidades, un locus *C9ORF72* no humano es un locus *C9orf72* murino (por ejemplo, un locus *C9orf72* de ratón o de rata).

En diversas modalidades, uno o más fenotipos, como se describen en la presente descripción, es o son como se compara con respecto a una referencia o control. En diversas modalidades, una referencia o control incluye un animal no humano que tiene una modificación como se describe en la presente descripción, una modificación que es diferente de una modificación como se describe en la presente descripción o no tiene modificaciones (es decir, un animal no humano de tipo silvestre).

En diversas modalidades, un animal no humano descrito en la presente descripción es un roedor; en algunas modalidades, un ratón; en algunas modalidades, una rata.

5 Como se usa en esta solicitud, los términos “alrededor de” y “aproximadamente” se usan como equivalentes. Cualquier número usado en esta solicitud con o sin alrededor de/aproximadamente pretende abarcar cualquiera de las fluctuaciones normales apreciadas por un experto en la técnica en cuestión.

10 Otras características, objetos y ventajas de animales no humanos, células y métodos proporcionados en la presente descripción son evidentes en la descripción detallada de determinadas modalidades que siguen. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada, si bien indica determinadas modalidades, se proporciona solamente a modo de ilustración, no de limitación. Diversos cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción detallada.

15 Breve descripción de las figuras

El Dibujo que se incluye en la presente descripción, que se compone de las siguientes Figuras, es solamente con propósitos de ilustración y no de limitación. El archivo de la patente o la solicitud contiene al menos un dibujo a color. Las copias de esta publicación de patente o de la solicitud de patente con la (las) figura(s) a color se proporcionarán por la Oficina bajo petición y pago de la tarifa necesaria.

25 **La Figura 1A**, cuadro superior, muestra una ilustración esquemática, no a escala, de las tres isoformas de transcritos de *C9orf72* de ratón informadas (VI, V2 y V3) y una estrategia de delección dirigida para la interrupción del locus *C9orf72* de ratón. Se generó un vector de direccionamiento que incluye un brazo de homología de ratón aguas arriba (o “mHU”, que contiene una secuencia genómica aguas arriba del codón de inicio, y lo incluye, en el exón 2 del gen *C9ORF72* de ratón), un gen indicador *lacZ* (sin el codón de inicio ATG), un casete de selección de fármaco autoeliminable (que incluye un gen de resistencia a la neomicina y un gen de recombinasa *Cre* vinculado a un promotor de *protamina 1* (*Prm1*) de ratón, flanqueado por sitios *loxP*), y un brazo de homología de ratón aguas abajo (o “mHD”, que contiene una secuencia genómica de 49 pb aguas abajo del codón de parada del exón 11 del gen *C9ORF72* de ratón). Tras la recombinación homóloga, se eliminó una región genómica de ratón de aproximadamente 26 kb, lo que incluye la secuencia codificante de *C9orf72* para todas las isoformas predichas de *C9orf72* de ratón (es decir, la secuencia codificante que comienza desde el codón inmediatamente después del codón de inicio ATG en el exón 2 del *C9orf72* de ratón, hasta los exones 3-10, intrones intermedios y 49 pb de la UTR 3' en el exón 11 del *C9orf72* de ratón); y el gen indicador *lacZ* (sin el codón de inicio ATG) se insertó inmediatamente después del codón de inicio ATG endógeno restante del *C9orf72* de ratón. El locus *C9orf72* modificado resultante se representa en la **Figura 1A**, cuadro inferior. Se empleó tecnología de autodelección para eliminar el casete de neomicina antes del análisis fenotípico, lo que deja el indicador *lacZ* y un sitio *loxP* bajo control del promotor de *C9orf72* de ratón. El locus *C9orf72* de ratón modificado después de que se ha eliminado el casete de neomicina se representa en la **Figura 1A**, cuadro inferior. La secuencia de nucleótidos del locus *C9orf72* modificado que comienza desde la secuencia *lacZ* insertada hasta el sitio *loxP* en dirección 3' se expone en la SEQ ID NO: 8; y la secuencia de nucleótidos del locus *C9orf72* modificado que comienza desde el exón 1a hasta la UTR 3' se expone en la SEQ ID NO: 9.

45 **La Figura 1B** muestra el análisis de expresión por TAQMAN® de *C9orf72* (arriba; también conocido como 3110043021RIK) y el activador quinasa MOB 3B (*Mob3b*; abajo) para los ratones de tipo silvestre (WT), *C9orf72*^{+/-} (Het) y *C9orf72*^{-/-} (KO).

Las Figuras 2A-2L muestran fenotipos similares a la ALS medidos en ratones de tipo silvestre (n=9) y *C9orf72*^{-/-} (n=11).
Figura 2A: por ciento ilustrativo de supervivencia (eje y) en el tiempo (eje x, semanas);
Figura 2B: cambio de peso corporal ilustrativo (eje y, en gramos) en el tiempo (eje x, semanas);
50 **Figura 2C:** puntuación de deterioro motor medio ilustrativo en el tiempo (eje x, semanas);
Figura 2D: puntuación de temblor medio ilustrativo en el tiempo (eje x, semanas)
Figura 2E: puntuación de rigidez media ilustrativa en el tiempo (eje x, semanas);
Figura 2F: tiempo máximo ilustrativo en rotarod (eje y, en segundos) en el tiempo (eje x, semanas);
Figura 2G: comportamiento locomotor en campo abierto ilustrativo, por ejemplo, inmovilidad (izquierda; eje y, en segundos) y tiempo de exploración vertical (derecha; eje y, en segundos) en el tiempo (eje x, semanas);
55 **Figura 2H:** comportamiento en pasarela ilustrativo, por ejemplo, longitud de zancada media (arriba a la izquierda, eje y, centímetros [cm]), coordinación entre extremidades (arriba a la derecha) presentada como por ciento de índice de regularidad (eje y) en el tiempo (eje x, semanas), y fase de apoyo (centro inferior) presentada como parada media (eje y, en segundos) en el tiempo (eje x, semanas);
60 **Figura 2I:** imágenes ilustrativas de neuronas motoras de ratones de tipo silvestre de 60 semanas de edad (WT, n=5) y *C9orf72*^{-/-} (n=5), y un recuento de neuronas motoras ilustrativo (abajo a la izquierda), área media (abajo en el centro, p <0,0001) y área del cuerpo celular (en número de células, abajo a la derecha) para los ratones de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-}; se midieron 10 neuronas motoras para el área del cuerpo celular por lámina portaobjetos (tres láminas portaobjetos por grupo), la hinchazón indicó hipoxia y daño celular;
65 **Figura 2J:** por ciento de supervivencia ilustrativo en el tiempo (arriba a la izquierda), cambio de peso corporal en gramos (arriba a la derecha), puntuación de deterioro motor medio en el tiempo (abajo a la izquierda), puntuación de temblor

medio en el tiempo (abajo a la mitad) y puntuación de rigidez media en el tiempo (abajo a la derecha) en ratones de tipo silvestre de 32-60 semanas de edad (*C9orf72*^{+/+}; n=14) y *C9orf72*^{-/-} (n=17);

Figura 2K: tiempo máximo ilustrativo en rotarod en el tiempo (arriba a la izquierda), comportamiento locomotor en campo abierto, por ejemplo, inmovilidad en el tiempo (arriba a la mitad) y tiempo de exploración vertical en el tiempo (arriba a la derecha), comportamiento en la pasarela, por ejemplo, longitud de zancada media en el tiempo (abajo a la izquierda) y coordinación entre extremidades presentada como por ciento de índice de regularidad en el tiempo (abajo a la mitad) y distancia total recorrida en el tiempo (abajo a la derecha) en ratones de tipo silvestre de 32-60 semanas de edad (*C9orf72*^{+/+}; n=14) y *C9orf72*^{-/-} (n=17);

Figura 2L: puntuación de deterioro motor medio ilustrativo en el tiempo (arriba a la izquierda), puntuación de temblor medio en el tiempo (arriba a la mitad), puntuación de rigidez media en el tiempo (arriba a la derecha) y fuerza de agarre (en gramos de fuerza) en ratones de tipo silvestre (*C9orf72*^{+/+}), heterocigotos (*C9orf72*^{+/-}) y homocigotos (*C9orf72*^{-/-}). La significación estadística se determinó mediante el uso de la prueba t no apareada de Student y la prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA).

Las Figuras 3A-3AL muestran resultados de inmunofenotipaje medidos en ratones de tipo silvestre (n= ≥4) y ratones que tienen una interrupción en un locus *C9orf72* (n= ≥4).

Figura 3A: imágenes ilustrativas de ratones hembras de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-} diseccionados que muestran ganglios linfáticos cervicales agrandados (flechas) en ratones *C9orf72*^{-/-} y pesos de bazo (derecha, en gramos) en ratones hembras de tipo silvestre (WT), *C9orf72*^{+/-} (HET), y *C9orf72*^{-/-} (KO) a las 8 (fila superior) y 18 (fila inferior) semanas;

Figura 3B: imágenes ilustrativas de ratones machos de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-} diseccionados que muestran ganglios linfáticos cervicales agrandados (flechas) en ratones *C9orf72*^{-/-} y pesos del bazo (derecha, en gramos) en ratones de tipo silvestre (WT) machos, *C9orf72*^{+/-} (HET), y *C9orf72*^{-/-} (KO) a las semanas 9-10 (fila superior) y 18 (fila inferior);

Figura 3C: imágenes ilustrativas de ratones hembras de 37 semanas y machos de 56 semanas *C9orf72*^{-/-} que muestran ganglios linfáticos cervicales agrandados (flechas);

Figura 3D: imágenes ilustrativas de ratones hembras de 30-35 semanas de edad de tipo silvestre (fila superior) y *C9orf72*^{-/-} (fila central) diseccionadas que muestran ganglios linfáticos cervicales agrandados (flechas) y pesos corporales (en gramos), pesos del bazo (en gramos) y peso del bazo normalizado con respecto al peso corporal (como % de peso corporal) (fila inferior); imagen ilustrativa del bazo diseccionado (abajo a la izquierda) de ratones de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-} (-/-);

Figura 3E: datos de CBC ilustrativos con diferencial que muestra el recuento total de glóbulos blancos y las poblaciones circulantes de diversos tipos de células inmunitarias en ratones de 34-38 semanas de edad de tipo silvestre (WT), *C9orf72*^{+/-} (HET), y *C9orf72*^{-/-} (KO) (el tipo de célula se indica arriba de cada gráfico);

Figura 3F: imágenes ilustrativas de tejido seccionado de bazo y ganglios linfáticos cervicales de ratones de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-} a 4x de potencia teñidos con hematoxilina y eosina;

Figura 3G: imágenes ilustrativas de tejido de ganglios linfáticos cervicales seccionados de ratones *C9orf72*^{-/-} a 60x de potencia teñidos con hematoxilina y eosina (flechas azules: células con morfología plasmacitoide; flechas amarillas: neutrófilos; flechas verdes: células de tipo macrófago; flecha roja: célula Mott);

Figura 3H: Por ciento ilustrativo de células B positivas (CD11b⁺, CD11c⁺, CD3⁺B220⁺, CD19⁺) del bazo, los ganglios linfáticos cervicales, la médula ósea y la sangre en ratones machos de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-} (KO);

Figura 3I: células plasmáticas ilustrativas en diversos estadios que expresan antígenos específicos de la superficie celular aislados del bazo, los ganglios linfáticos cervicales, la médula ósea y la sangre de ratones machos de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-} (KO) a las 9-10 semanas (barras negras), 18 semanas (barras grises claras) y 57-60 semanas (barras grises oscuras);

Figura 3J: células plasmáticas ilustrativas en diversos estadios que expresan antígenos específicos de la superficie celular aislados del bazo, los ganglios linfáticos cervicales, la médula ósea y la sangre de ratones hembras de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-} (KO) a las 8 semanas (barras negras), 18 semanas (barras grises claras) y 30-35 semanas (barras grises oscuras);

Figura 3K: Por ciento ilustrativo de células mieloides positivas en diversos estadios que expresan antígenos específicos de la superficie celular aislados del bazo, los ganglios linfáticos cervicales, la médula ósea y la sangre de ratones machos de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-} (KO) a las 9-10 semanas (barras negras), 18 semanas (barras grises claras) y 57-60 semanas (barras grises oscuras);

Figura 3L: Por ciento ilustrativo de células mieloides positivas en diversos estadios que expresan antígenos específicos de la superficie celular aislados del bazo, los ganglios linfáticos cervicales, la médula ósea y la sangre de ratones hembras de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-} (KO) a las 8 semanas (barras negras), 18 semanas (barras grises claras) y 30-35 semanas (barras grises oscuras);

Figura 3M: Por ciento ilustrativo de células macrófagos positivas (CD45⁺, CD11b⁺, F4/80⁺, Ly6G⁺) en bazo, ganglios linfáticos cervicales, médula ósea, riñón y sangre de ratones hembras de 30-35 semanas de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-} (-/-);

Figura 3N: imágenes ilustrativas de bazo seccionado de ratones de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-} a 4x de potencia teñidos con diversos marcadores (indicados debajo de cada imagen);

Figura 3O: imágenes ilustrativas de ganglios linfáticos cervicales seccionados de ratones de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-} a 4x de potencia teñidos con diversos marcadores (indicados debajo de cada imagen; flecha: células teñidas intermitentemente con CD138);

Figura 3P: imágenes ilustrativas de bazo y ganglio linfático cervical seccionados de ratones de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-} a potencia 4x y 60x teñidos con F4/80;

- Figura 3Q:** recuentos ilustrativos de células totales en bazo, ganglios linfáticos cervicales, médula ósea y riñón en ratones de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-}. Las células se contaron mediante el uso de un contador de viabilidad celular Cellometer Auto T4 antes del análisis FACS. Esto se hizo para calcular el número total de células positivas para marcadores de superficie de interés además de presentar los datos en por ciento de células positivas para dichos marcadores. Como estos recuentos se realizaron después de la lisis de glóbulos rojos, también son representativos de una gran infiltración inmunitaria (glóbulos blancos) ya que el recuento de células totales aumentó en ratones anulados en comparación con el tipo silvestre; **Figura 3R:** por ciento ilustrativo de positivas y recuentos celulares de células dendríticas mieloides (izquierda; CD11b⁺, CD11c⁺, MHCII⁺) y células NK (derecha; NKp46^{mid}, CD49b⁺) en bazo y médula ósea para ratones de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-};
- Figura 3S:** Por ciento ilustrativo de positivas (fila superior) y recuento de células totales (fila inferior) para células CD45⁺ en diversos tejidos de ratones de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-};
- Figura 3T:** Por ciento ilustrativo de positivas (fila superior) y recuento de células totales (fila inferior) para células T CD8⁺ en diversos tejidos de ratones de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-};
- Figura 3U:** Por ciento ilustrativo de positivas (fila superior) y recuento de células totales (fila inferior) para células T CD4⁺ en diversos tejidos de ratones de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-};
- Figura 3V:** Por ciento ilustrativo de positivas (fila superior) y recuento de células totales (fila inferior) para células T CD8⁺CD44⁺ en diversos tejidos de ratones de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-};
- Figura 3W:** Por ciento ilustrativo de positivas (fila superior) y recuento de células totales (fila inferior) para células T CD4⁺CD44⁺ en diversos tejidos de ratones de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-};
- Figura 3X:** Por ciento ilustrativo de positivas (fila superior) y recuento de células totales (fila inferior) para células T CD8⁺CD69⁺ en diversos tejidos de ratones de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-};
- Figura 3Y:** Por ciento ilustrativo de positivas (fila superior) y recuento de células totales (fila inferior) para células T CD4⁺CD69⁺ en diversos tejidos de ratones de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-};
- Figura 3Z:** Por ciento ilustrativo de positivas (fila superior) y recuento de células totales (fila inferior) para células T CD8⁺PD1⁺ en diversos tejidos de ratones de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-};
- Figura 3AA:** Por ciento ilustrativo de positivas (fila superior) y recuento de células totales (fila inferior) para células T CD4⁺PD1⁺ en diversos tejidos de ratones de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-};
- Figura 3AB:** Por ciento ilustrativo de positivas (fila superior) y recuento de células totales (fila inferior) para células T CD4⁺FoxP3⁺ en diversos tejidos de ratones de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-};
- Figura 3AC:** Por ciento ilustrativo de positivas (izquierda en cada par) y recuento de células totales (derecha en cada par) para poblaciones de células T CD8⁺CD62L⁺ (arriba a la izquierda), CD4⁺CD62L⁺ (abajo a la izquierda), CD8⁺CD127⁺ (arriba a la derecha) y CD4⁺CD127⁺ (abajo a la derecha) en bazo de ratones de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-};
- Figura 3AD:** panel ilustrativo de citocinas que muestra la expresión de diversas citocinas en ratones machos de 18 semanas de edad de tipo silvestre (WT), *C9orf72*^{+/-} (Het), y *C9orf72*^{-/-} (KO) (las citocinas se indican encima de cada gráfico);
- Figura 3AE:** panel ilustrativo de citocinas que muestra la expresión de diversas citocinas en ratones machos de 8-58 semanas de edad de tipo silvestre (WT), *C9orf72*^{+/-} (Het), y *C9orf72*^{-/-} (KO) (las citocinas se indican encima de cada gráfico);
- Figura 3AF:** panel ilustrativo de citocinas que muestra la expresión de diversas citocinas en ratones hembras de 8-38 semanas de edad de tipo silvestre (WT), *C9orf72*^{+/-} (Het), y *C9orf72*^{-/-} (KO) (las citocinas se indican encima de cada gráfico);
- Figura 3AG:** niveles ilustrativos de nitrógeno ureico en sangre (eje y, mg/dl), globulina (eje y, g/dl) e inmunoglobulina sérica (eje y, IgG, U/ml (izquierda); eje y, IgM, U/ml (derecha)) en ratones de tipo silvestre (WT), *C9orf72*^{+/-}, y *C9orf72*^{-/-} (la medición de nitrógeno ureico en sangre y globulina es en ratones machos de 45-56 semanas; la medición del factor reumatoide IgM e IgG en suero es en ratones machos de 8-58 semanas; se observó un aumento significativo en RF IgG e IgM en ratones *C9orf72*^{-/-} en todos los puntos de tiempo a partir de las 8 semanas de edad);
- Figura 3AH:** niveles ilustrativos de factor reumatoide IgG e IgM en ratones hembras (fila superior) y machos (fila inferior) de tipo silvestre (WT), *C9orf72*^{+/-} (Het) y *C9orf72*^{-/-} (KO); medición en suero de ratones de 8-10 semanas de edad (machos: 7 WT, 5 Het, 9 KO; hembras: 7 WT, 5 Het, 8 KO), 18 semanas (machos: 9 WT, 6 Het, 13 KO; hembras: 5 WT, 12 Het, 15 KO), 30-41 semanas (machos: 3 WT, 4 Het, 4 KO; hembras: 10 WT, 9 Het, 9 KO) y 54-65 semanas (machos: 6WT, 9 Het, 5 KO);
- Figura 3AI:** niveles ilustrativos de IgG e IgM circulantes (en µg/ml, eje y) en ratones hembras (fila superior) y machos (fila inferior) de tipo silvestre (WT), *C9orf72*^{+/-} (Het) y *C9orf72*^{-/-} (KO);
- Figura 3AJ:** niveles ilustrativos de autoanticuerpos circulantes (en U/ml, eje y) en ratones hembras, 26-34 semanas de edad, (fila superior) y machos, 26-34 semanas de edad, (fila inferior) de tipo silvestre (WT), *C9orf72*^{+/-} (Het) y *C9orf72*^{-/-} (KO);
- Figura 3AK:** imágenes ilustrativas de riñón (arriba) e hígado (abajo) seccionados de ratones de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-} a 100x y 20x de potencia, respectivamente, teñidos con hematoxilina y eosina (H-E) o F4/80 mediante inmunohistoquímica (IHC F4/80);
- Figura 3AL:** imágenes ilustrativas de tejido renal seccionado de ratones de 8-63 semanas de edad de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-} teñidos con hematoxilina y eosina (H-E, panel superior), IgG (2^{do} panel desde arriba), IgM (3^{er} panel desde arriba) y Complemento C3 (panel inferior). La significación estadística se determinó mediante el uso de la prueba t no apareada de Student y la prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA).
- La Figura 4** muestra un porcentaje ilustrativo de neuronas vivas con respecto al control (eje y) en neuronas de tipo silvestre cultivadas tratadas con diversas concentraciones de toxinas. La parte superior ilustra el diseño experimental

como se describe en el Ejemplo 4. DA (ácido domoico; agonista del receptor de AMPA/kainato), BMAA (β -metilamino-L-alanina, 100 μ M), MK801 (Dizocilpina, 10 μ M; antagonista del receptor NMDA), NBQX (2,3-dihidroxi-6-nitro-7-sulfamiloil-benzoquinoxalina-2,3-diona, 10 μ M; antagonista del receptor AMPA/kainato); Glutathión (10 μ M, antioxidante). La significación estadística se determinó mediante el uso de la prueba t no apareada de Student y la prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA). Cox, P.A. y otros, 2003, Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 100(23):13380-13383; Murch, S.J. y otros, 2004, Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 101(33):12228-12231; Cox, P.A. y otros, 2005, Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU. 102(14):5074-5078; Erdner, D.L. y otros, 2008, Environmental Health, 7 (Supl. 2):S2.

Las Figuras 5A-5D muestran la medición de fenotipos similares a la ALS en ratones de tipo silvestre administrados con inyecciones i.p. de BMMA (n=5) o PBS (control, n=5).

Figura 5A: la parte superior ilustra el diseño experimental y los puntos de tiempo para el tratamiento, la medición del peso corporal y los estudios de comportamiento, la parte inferior muestra un cambio ilustrativo del peso corporal (eje y, en gramos) en el tiempo (eje x, semanas) en ratones control (negro) y tratados con BMAA (gris);

Figura 5B: tiempo máximo ilustrativo en rotarod (eje y, segundos) en el tiempo (eje x, semanas) en ratones control (negro) y tratados con BMAA (gris);

Figura 5C: comportamiento locomotor en campo abierto ilustrativo, por ejemplo, inmovilidad (izquierda; eje y, en segundos) y tiempo de exploración vertical (derecha; eje y, en segundos) en el tiempo (eje x, semanas) en ratones control (negro) y tratados con BMAA (gris);

Figura 5D: comportamiento de pasarela ilustrativo, por ejemplo, longitud de zancada media (arriba a la izquierda, eje y, centímetros [cm]), coordinación entre extremidades (arriba a la derecha) presentada como por ciento de índice de regularidad (eje y) en el tiempo (eje x, semanas), y fase de apoyo (centro inferior) presentada como parada media (eje y, en segundos) en el tiempo (eje x, semanas) en ratones control (negro) y tratados con BMAA (gris). La significación estadística se determinó mediante el uso de la prueba t no apareada de Student y la prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA).

Las Figuras 6A-6E muestran la medición de fenotipos similares a la ALS en ratones de tipo silvestre y *C9orf72*^{-/-} administrados con inyecciones i.p. de BMMA (tipo silvestre con BMAA: 3 machos, 2 hembras; con anulación del gen con BMAA: 3 machos, 3 hembras) o PBS (control de tipo silvestre: 4 machos, 1 hembra; control con anulación del gen: 5 machos, 1 hembra).

Figura 6A: la parte superior ilustra el diseño experimental y los puntos de tiempo para el tratamiento, la medición del peso corporal y los estudios de comportamiento, la parte inferior izquierda muestra un por ciento de supervivencia ilustrativo (eje y) en el tiempo (eje x, semanas), la parte inferior derecha muestra un cambio ilustrativo de peso corporal (eje y, en gramos) en el tiempo (eje x, semanas);

Figura 6B: arriba a la izquierda muestra una puntuación de deterioro motor medio ilustrativo en el tiempo (eje x, semanas), en la parte superior a la derecha muestra una puntuación de temblor medio ilustrativo en el tiempo (eje x, semanas), la parte inferior muestra una puntuación de rigidez media ilustrativa en el tiempo (eje x, semanas); **Figura 6C:** tiempo máximo ilustrativo en rotarod (eje y, segundos) en el tiempo (eje x, semanas);

Figura 6D: comportamiento locomotor en campo abierto ilustrativo, por ejemplo, inmovilidad (izquierda; eje y, en segundos) y tiempo de exploración vertical (derecha; eje y, en segundos) en el tiempo (eje x, semanas);

Figura 6E: comportamiento de pasarela ilustrativo, por ejemplo, longitud de zancada media (arriba a la izquierda, eje y, centímetros [cm]), coordinación entre extremidades (arriba a la derecha) presentada como por ciento de índice de regularidad (eje y) en el tiempo (eje x, semanas), y fase de apoyo (centro inferior) presentada como parada media (eje y, en segundos) en el tiempo (eje x, semanas). La significación estadística se determinó mediante el uso de la prueba t no apareada de Student y la prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA).

La Figura 7 muestra la supervivencia (abajo a la izquierda) y estrés oxidativo (abajo a la derecha) *in vitro* de neuronas motoras de tipo silvestre y *C9orf72*^{-/-} (con anulación del gen) tratadas con BMAA. Arriba, ilustración esquemática del diseño experimental; la supervivencia (abajo a la izquierda) se presenta como porcentaje de neuronas vivas con respecto al control de tipo silvestre (eje y) en neuronas de tipo silvestre (control) y *C9orf72*^{-/-} (con anulación del gen) tratadas con BMAA 100 mM. El estrés oxidativo en el día 1 (izquierda de abajo a la derecha) y el día 7 (derecha de abajo a la derecha) se presenta como densidad óptica media de fluorescencia de -485/520 nm producida por una sonda sensible a las ROS, CellROX Green (Life Technologies). La significación estadística se determinó mediante el uso de la prueba t no apareada de Student y la prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA).

La Figura 8 muestra supervivencia (arriba a la izquierda), estrés oxidativo (arriba a la mitad), relación de ADN mitocondrial con respecto a nuclear (arriba a la derecha) ilustrativas y diversas mediciones de la función mitocondrial (abajo de izquierda a derecha) en neuronas motoras de tipo silvestre (WT) y *C9orf72*^{-/-}. La supervivencia (arriba a la izquierda) se presenta como el número de células como por ciento con respecto a *C9orf72*^{+/+}; el estrés oxidativo en el día 1 y el día 7 se presenta como especies reactivas de oxígeno (ROS; por ciento de densidad óptica con respecto a *C9orf72*^{+/+}); la relación ADN mitocondrial con respecto al nuclear se presenta como el número medio de copias mitocondriales; la respiración mitocondrial se presenta como la tasa de consumo de oxígeno calculada como por ciento con respecto a *C9orf72*^{+/+} 1^{ra} medición; la respiración basal, la producción de ATP, la fuga de protones, la respiración máxima, la capacidad respiratoria de reserva y la respiración no mitocondrial se presentan como la tasa de consumo de oxígeno calculada como por ciento con respecto al control *C9orf72*^{+/+}.

Las Figuras 9A-9C muestran glomerulonefropatía progresiva en ratones *C9orf72*^{-/-}. La Figura 9A muestra gráficos ponderados de puntuación histopatológica que demuestran que los cambios renales más significativos observados en ratones anulados se asocian con la glomerulonefritis membranoproliferativa. La Figura 9B muestra puntuaciones histopatológicas individuales correspondientes a los gráficos ponderados representados en la Figura 9A. Brevemente, las secciones de riñón teñidas con H-E se puntuaron a ciegas para las categorías de enfermedad renal asociada con la glomerulonefropatía mediada por el sistema inmunitario: glomerulonefritis membranoproliferativa, inflamación mononuclear intersticial, formación de cilindros hialinos, glomeruloesclerosis y túbulos basófilos. Puntuación de 0=ninguno, 1=mínimo, 2=leve, 3=moderado y 4=severo. Todos los ratones anulados mostraron glomerulonefritis membranoproliferativa mínima a severa con evidencia ocasional de categorías de enfermedades adicionales en animales más gravemente afectados. La Figura 9C muestra las mediciones de ACR en orina analizadas a los 14 días (Figura 9C, arriba) y 24 semanas (Figura 9C, abajo), los puntos de tiempo de la misma cohorte de ratones indican la aparición de albuminuria en ratones *C9orf72*^{-/-} con la edad. Los ratones heterocigotos mostraron valores comparables a los WT consistentes con la ausencia de un fenotipo observado.

La Figura 10 demuestra que las células T foliculares auxiliares (Tfh) (CD4+CXCR5+CD44+ICOS+PD-1+Bcl-6+) aumentaron significativamente en por ciento y el recuento de células totales en bazo, CLN, MLN y sangre *C9orf72*^{-/-}. Los gráficos representan la media ± s.e.m. (*P ≤ 0,05, **P ≤ 0,01, ***P ≤ 0,001 por prueba t de Student no apareada), hembras de 26 semanas, n=5 por genotipo. Además, se observaron células Tfh elevadas en BM *C9orf72*^{-/-} que no alcanzó significación.

Definiciones

Esta invención no se limita a los métodos y condiciones experimentales particulares descritos en la presente descripción, ya que estos métodos y condiciones pueden variar. Además, debe entenderse que la terminología usada en la presente descripción es solamente para el propósito de describir modalidades particulares, y no pretende ser limitante, dado que el alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos y frases que se usan en la presente descripción incluyen los significados que se atribuyen a los términos y frases en la técnica, a menos que se indique claramente lo contrario o sea claramente evidente a partir del contexto en el que se usa el término o frase. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción puede usarse en la práctica o prueba de la presente invención, a continuación, se describirán métodos y materiales particulares.

“Administración” incluye la administración de una composición a un sujeto o sistema (por ejemplo, a una célula, órgano, tejido, organismo, o componente en cuestión o conjunto de componentes de estos). Los expertos apreciarán que la vía de administración puede variar en dependencia de, por ejemplo, el sujeto o sistema a los cuales la composición se administra, la naturaleza de la composición, el propósito de la administración, etcétera. Por ejemplo, en modalidades determinadas, la administración a un sujeto animal (por ejemplo, a un ser humano o a un roedor) puede ser bronquial (lo que incluye mediante instilación bronquial), bucal, enteral, interdérmica, intraarterial, intradérmica, intragástrica, intramedular, intramuscular, intranasal, intraperitoneal, intratecal, intravenosa, intraventricular, mucosal, nasal, oral, rectal, subcutánea, sublingual, tópica, traqueal (lo que incluye mediante instilación intratraqueal), transdérmica, vaginal y/o vítea. En algunas modalidades, la administración puede implicar una dosificación intermitente. En algunas modalidades, la administración puede implicar una dosificación continua (por ejemplo, perfusión) durante al menos un periodo de tiempo seleccionado.

“Mejoría” incluye la prevención, reducción o alivio de un estado, o mejoría del estado de un sujeto. La mejoría incluye, pero no requiere la recuperación completa o prevención completa de una enfermedad, trastorno o afección (por ejemplo, daño por radiación).

“Aproximadamente”, como se aplica en la presente descripción a uno o más valores de interés, incluye un valor que es similar a un valor de referencia indicado. En ciertas modalidades, el término “aproximadamente” o “alrededor de” se refiere a un intervalo de valores que caen dentro de 25 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, o menos en cualquier dirección (mayor o menor) del valor de referencia indicado a menos que se indique de cualquier otra manera o sea evidente de cualquier otra manera a partir del contexto (excepto cuando tal número exceda el 100 % de un valor posible).

“Biológicamente activo” incluye una característica de cualquier agente que tiene actividad en un sistema biológico, *in vitro* o *in vivo* (por ejemplo, en un organismo). Por ejemplo, un agente que, cuando está presente en un organismo, tiene un efecto biológico dentro de ese organismo, se considera biológicamente activo. En modalidades particulares, cuando una proteína o polipéptido es biológicamente activo, una porción de esa proteína o polipéptido que comparte al menos una actividad biológica de la proteína o polipéptido se refiere típicamente como una porción “biológicamente activa”.

“Comparable” incluye dos o más agentes, entidades, situaciones, conjuntos de condiciones, etcétera, que pueden no ser idénticos entre sí pero que son suficientemente similares para permitir la comparación entre ellos de manera que puedan obtenerse conclusiones razonables en base a las diferencias o las similitudes observadas. Los expertos en la

materia comprenderán, en contexto, el grado de identidad necesario en cualquier circunstancia determinada para dos o más de tales agentes, entidades, situaciones, conjuntos de condiciones, etcétera, para considerarse comparables.

"Conservadora", cuando describe una sustitución de aminoácido conservadora, incluye la sustitución de un residuo de aminoácido por otro residuo de aminoácido que tiene un grupo R de cadena lateral con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, una sustitución de aminoácido conservadora no cambiará sustancialmente las propiedades funcionales de interés de una proteína, por ejemplo, la capacidad de un receptor de unirse a un ligando. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen: cadenas laterales alifáticas tales como glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; cadenas laterales hidroxialifáticas tales como serina y treonina; cadenas laterales que contienen amida tales como asparagina y glutamina; cadenas laterales aromáticas tales como fenilalanina, tirosina, y triptófano; cadenas laterales básicas tales como lisina, arginina, e histidina; cadenas laterales ácidas tales como ácido aspártico y ácido glutámico; y, cadenas laterales que contienen azufre tales como cisteína y metionina. Los grupos de sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen, por ejemplo, valina/leucina/isoleucina, fenilalanina/tirosina, lisina/arginina, alanina/valina, glutamato/aspartato, y asparagina/glutamina. En algunas modalidades, una sustitución de aminoácido conservadora puede ser una sustitución de cualquier residuo nativo en una proteína con alanina, como se usa en, por ejemplo, la mutagénesis por barrido de alanina. En algunas modalidades, se produce una sustitución conservadora que tiene un valor positivo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250 descrita en Gonnet G.H. y otros, 1992, Science 256:1443-1445. En algunas modalidades, una sustitución es una sustitución moderadamente conservadora en donde la sustitución tiene un valor no negativo en la matriz de probabilidad logarítmica PAM250.

"Control" incluye el significado que se entiende en la técnica de un *"control"* que es un estándar contra el cual se comparan los resultados. Típicamente, los controles se usan para aumentar la integridad en los experimentos mediante el aislamiento de variables para llegar a una conclusión sobre tales variables. En algunas modalidades, un control es una reacción o un ensayo que se realiza simultáneamente con una reacción o un ensayo de prueba para proporcionar un comparador. Un *"control"* incluye, además, un *"animal de control"*. Un *"animal de control"* puede tener una modificación como se describe en la presente descripción, una modificación que es diferente a como se describe en la presente descripción, o puede no tener modificaciones (es decir, un animal de tipo silvestre). En un experimento, se aplica una *"prueba"* (es decir, una variable que se prueba). En un segundo experimento, el *"control"*, no se aplica la variable que se prueba. En algunas modalidades, un control es un control histórico (es decir, de una prueba o un ensayo realizados anteriormente, o una cantidad o resultado que se conoce previamente). En algunas modalidades, un control es o comprende un registro impreso o guardado de cualquier otra manera. Un control puede ser un control positivo o un control negativo.

"Interrupción" incluye el resultado de un evento de recombinación homóloga con una molécula de ADN (por ejemplo, con una secuencia homóloga endógena tal como un gen o locus génico). En algunas modalidades, una interrupción puede lograr o representar una inserción, una delección, una sustitución, un reemplazo, una mutación con pérdida de sentido, o un desplazamiento del marco de una(s) secuencia(s) de ADN, o cualquier combinación de estos. 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). En algunas modalidades, una interrupción puede aumentar la expresión y/o actividad de un gen o producto génico (por ejemplo, de una proteína codificada por un gen). En algunas modalidades, una interrupción puede disminuir la expresión y/o actividad de un gen o producto génico. En algunas modalidades, una interrupción puede alterar la secuencia de un gen o un producto génico codificado (por ejemplo, una proteína codificada). En algunas modalidades, una interrupción puede truncar o fragmentar un gen o un producto génico codificado (por ejemplo, una proteína codificada). En algunas modalidades, una interrupción puede extender un gen o un producto génico codificado. En algunas de dichas modalidades, una interrupción puede lograr el ensamblaje de una proteína de fusión. En algunas modalidades, una interrupción puede afectar el nivel, pero no la actividad de un gen o producto génico. En algunas modalidades, una interrupción puede afectar la actividad, pero no el nivel de un gen o producto génico. En algunas modalidades, 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. En algunas modalidades, una interrupción puede no tener un efecto significativo sobre el nivel o la actividad de un gen o producto génico.

"Determinar", "medir", "evaluar", "valorar", "ensayar" y "analizar" incluyen cualquier forma de medición, e incluye determinar si un elemento está presente o no. Estos términos incluyen determinaciones cuantitativas y/o cualitativas. El ensayo puede ser relativo o absoluto. *"Ensayar para determinar la presencia de"* puede ser determinar la cantidad de algo presente y/o determinar si está presente o ausente.

"Locus endógeno" o "gen endógeno" incluye un locus genético encontrado en un organismo parental o de referencia antes de la introducción de una interrupción, delección, reemplazo, alteración o modificación como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, el locus endógeno tiene una secuencia que se encuentra en la naturaleza. En algunas modalidades, el locus endógeno es un locus de tipo silvestre. En algunas modalidades, el organismo de referencia es un organismo de tipo silvestre. En algunas modalidades, el organismo de referencia es un organismo diseñado. En algunas modalidades, el organismo de referencia es un organismo criado en un laboratorio (ya sea de tipo silvestre o modificado genéticamente).

"Promotor endógeno" incluye un promotor que se asocia naturalmente, por ejemplo, en un organismo de tipo silvestre, con un gen endógeno.

"Gen" incluye una secuencia de ADN en un cromosoma que codifica para un producto (por ejemplo, un producto de ARN y/o un producto polipeptídico). En algunas modalidades, un gen incluye una secuencia codificante (es decir, una secuencia que codifica un producto en particular). En algunas modalidades, un gen incluye una secuencia no codificante. En algunas modalidades particulares, un gen puede incluir tanto secuencias codificantes (por ejemplo, exónicas) como no codificantes (por ejemplo, intrónicas). En algunas modalidades, un gen puede incluir una o más secuencias reguladoras (*por ejemplo*, promotores, potenciadores, *etcétera*) y/o secuencias intrónicas que, por ejemplo, pueden controlar o influir en uno o más aspectos de la expresión génica (por ejemplo, la expresión celular tipo específica, la expresión inducible, *etcétera*). Para mayor claridad observamos que, como se usa en la presente solicitud, el término **"gene"** se refiere generalmente a una porción de un ácido nucleico que codifica un polipéptido; el término puede abarcar opcionalmente secuencias reguladoras, como quedará claro por el contexto para los expertos en la técnica. Esta definición no pretende excluir la aplicación del término **"gen"** a unidades de expresión que no codifican proteínas, sino más bien para aclarar que, en la mayoría de los casos, el término como se usa en la presente descripción se refiere a un ácido nucleico que codifica polipéptidos.

"Heterólogo" incluye un agente o entidad a partir de una fuente diferente. Por ejemplo, cuando se usa en referencia a un polipéptido, un gen, o un producto génico presente en una célula u organismo en particular, el término aclara que el polipéptido, gen, o producto génico en cuestión: 1) se modificó genéticamente por la mano del hombre; 2) se introdujo en la célula u organismo (o un precursor de estos) a través de la mano del hombre (por ejemplo, por medio de ingeniería genética); y/o 3) no se produce o no está presente naturalmente en la célula u organismo en cuestión (por ejemplo, el tipo de célula o el tipo de organismo en cuestión). **"Heterólogo"** incluye, además, un polipéptido, gen o producto génico que está presente normalmente en una célula u organismo nativo particular, pero que se ha modificado, por ejemplo, por mutación o colocación bajo el control de agentes no asociados naturalmente y, en algunas modalidades, elementos reguladores no endógenos (por ejemplo, un promotor).

"Célula huésped" incluye una célula en la cual se ha introducido un ácido nucleico o una proteína. Después de leer esta descripción los expertos entenderán que tales términos no se refieren solamente a la célula particular en cuestión, sino que se usan, además, para referirse a la progenie de tal una célula. Debido a que pueden producirse determinadas modificaciones en las generaciones posteriores ya sea debido a una mutación o a influencias del ambiente, tal progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula parental, pero aún se incluye dentro del alcance de la frase **"célula huésped"**. En algunas modalidades, una célula huésped es, o comprende, una célula procariota o eucariota. En general, una célula huésped es cualquier célula que sea adecuada para recibir y/o producir un ácido nucleico o una proteína heterólogos, independientemente del reino de la vida al que pertenece la célula. Las células ilustrativas incluyen las procariotas y eucariotas (célula única o célula múltiple), células bacterianas (por ejemplo, cepas de *Escherichia coli*, *Bacillus* spp., *Streptomyces* spp., *etcétera*), células de micobacterias, células fúngicas, células de levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *etcétera*), células vegetales, células de insectos (por ejemplo, SF-9, SF-21, células de insectos infectados con baculovirus, *Trichoplusia ni*, *etcétera*), células animales no humanas, células humanas, o fusiones celulares tales como, por ejemplo, hibridomas o cuádrimas. En algunas modalidades, la célula es una célula humana, de mono, simio, hámster, rata o ratón. En algunas modalidades, la célula es eucariota y se selecciona de las células siguientes: CHO (por ejemplo, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (por ejemplo, COS-7), célula de retina, Vero, CV1, riñón (por ejemplo, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo205, HB 8065, HL-60, (por ejemplo, BHK21), Jurkat, Daudi, A431 (epidérmica), CV-1, U937, 3T3, célula L, célula C127, SP2/0, NS-0, MMT 060562, célula de Sertoli, célula BRL 3A, célula HT1080, célula de mieloma, célula tumoral, y una línea celular derivada de una célula mencionada anteriormente. En algunas modalidades, la célula comprende uno o más genes virales, por ejemplo, una célula de retina que expresa un gen viral (por ejemplo, una célula PER.C6®). En algunas modalidades, una célula huésped es, o comprende, una célula aislada. En algunas modalidades, una célula huésped es parte de un tejido. En algunas modalidades, una célula huésped es parte de un organismo.

"Identidad", en relación con una comparación de secuencias, incluye la identidad según se determina mediante una serie de algoritmos diferentes que se conocen en la técnica que pueden usarse para medir la identidad de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos. En algunas modalidades, las identidades como se describen en la presente descripción, se determinan mediante el uso de un alineamiento ClustalW v. 1.83 (lento) que emplea una penalización por apertura de interrupción de 10.0, una penalización por extensión de interrupción de 0.1, y el uso de una matriz de similitud de Gonnet (MACVECTOR™ 10.0.2, MacVector Inc., 2008).

"Mejorar", "aumentar", "eliminar" o "reducir", incluye los valores indicados que son relativos a una medición de los valores iniciales, tal como una medición en el mismo individuo (o animal) antes de iniciar el tratamiento descrito en la presente descripción, o una medición en un individuo control (o animal) o múltiples individuos controles (o animales) en ausencia del tratamiento descrito en la presente descripción.

"Aislada" incluye una sustancia y/o entidad que (1) se ha separado de al menos algunos de los componentes con los que se asociaba cuando se produjo inicialmente (ya sea en la naturaleza y/o en un entorno experimental), y/o (2) se ha diseñado, producido, preparado, y/o fabricado por la mano del hombre. Las sustancias y/o entidades aisladas pueden separarse de aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, o aproximadamente 100 %.

- aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o más de aproximadamente 99 % de los otros componentes con los que se asociaron inicialmente. En algunas modalidades, los agentes aislados son aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o más de aproximadamente 99 % puros. En algunas modalidades, una sustancia es "*pura*" si está sustancialmente libre de otros componentes. En algunas modalidades, como comprenderán los expertos en la materia, una sustancia aún puede considerarse "*aislada*" o incluso "*pura*", después de haberse combinado con otros determinados componentes tales como, por ejemplo, uno o más portadores o excipientes (por ejemplo, tampón, disolvente, agua, etcétera); en tales modalidades, el por ciento de aislamiento o pureza de la sustancia se calcula sin incluir tales portadores o excipientes. Para proporcionar un ejemplo, en algunas modalidades, un polímero biológico tal como un polipéptido o un polinucleótido que se produce en la naturaleza se considera "*aislado*" cuando: a) en virtud de su origen o fuente de obtención no se asocia con algunos o todos los componentes que lo acompañan en su estado nativo en la naturaleza; b) está sustancialmente libre de otros polipéptidos o ácidos nucleicos de la misma especie de la especie que lo produce en la naturaleza; o c) se expresa por, o se encuentra de cualquier otra manera en asociación con componentes de una célula u otro sistema de expresión que no es de la especie que lo produce en la naturaleza. Por lo tanto, por ejemplo, en algunas modalidades, un polipéptido que se sintetiza químicamente o se sintetiza en un sistema celular diferente del que lo produce en la naturaleza se considera un polipéptido "*aislado*". Alternativa o adicionalmente, en algunas modalidades, un polipéptido que se ha sometido a una o más técnicas de purificación puede considerarse un polipéptido "*aislado*" en la medida en que se haya separado de otros componentes a) con los que se asocia en la naturaleza; y/o b) con los que se asoció cuando se produjo inicialmente.
- "Locus" o "Locí"** incluye una localización(s) específica(s) de un gen (o secuencia significativa), secuencia de ADN, secuencia codificante de un polipéptido, o posición en un cromosoma del genoma de un organismo. Por ejemplo, un "*locus C9ORF72*" puede referirse a la localización específica de un gen *C9ORF72*, secuencia de ADN de *C9ORF72*, secuencia codificante de *C9ORF72*, o la posición de *C9ORF72* en un cromosoma del genoma de un organismo que se ha identificado que es donde reside dicha secuencia. Un "*locus C9ORF72*" puede comprender un elemento regulador de un gen *C9ORF72*, lo que incluye, pero no se limita a, un potenciador, un promotor, una UTR 5' y/o 3', o una combinación de estos. Los expertos en la técnica apreciarán que los cromosomas pueden, en algunas modalidades, contener cientos o incluso miles de genes y demostrar la colocalización física de loci genéticos similares cuando se compara entre diferentes especies. Dichos loci genéticos pueden describirse como que tienen una sintenia compartida.
- "Animal no humano" incluye cualquier organismo vertebrado que no es un ser humano. En algunas modalidades, un animal no humano es un ciclóstomo, un pez óseo, un pez cartilaginoso (por ejemplo, un tiburón o una raya), un anfibio, un reptil, un mamífero, y un ave. En algunas modalidades, un mamífero no humano es un primate, una cabra, una oveja, un cerdo, un perro, una vaca, o un roedor. En algunas modalidades, el animal no humano es un roedor tal como una rata o un ratón.
- "Ácido nucleico"** incluye cualquier compuesto y/o sustancia que es una cadena de oligonucleótido, o que puede incorporarse a ella. En algunas modalidades, un *ácido nucleico* es un compuesto y/o sustancia que es una cadena de oligonucleótido, o que puede incorporarse a ella, mediante un enlace fosfodiéster. Como será evidente a partir del contexto, en algunas modalidades, "*ácido nucleico*" se refiere a residuos de ácido nucleico individuales (por ejemplo, nucleótidos y/o nucleósidos); en algunas modalidades, "*ácido nucleico*" se refiere a una cadena de oligonucleótido que comprende residuos de ácido nucleico individuales. En algunas modalidades, un "*ácido nucleico*" es o comprende ARN; en algunas modalidades, un "*ácido nucleico*" es o comprende ADN. En algunas modalidades, un *ácido nucleico* es, comprende, o consiste en uno o más residuos de ácido nucleico naturales. En algunas modalidades, un *ácido nucleico* es, comprende, o consiste en uno o más análogos de ácido nucleico. En algunas modalidades, un análogo de ácido nucleico difiere de un *ácido nucleico* en el hecho de que no utiliza una cadena con enlaces fosfodiéster. Por ejemplo, en algunas modalidades, un *ácido nucleico* es, comprende, o consiste en uno o más "*ácidos nucleicos peptídicos*", que se conocen en la técnica y tienen enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster en la cadena principal, y se consideran dentro del alcance de la presente invención. Alternativa o adicionalmente, en algunas modalidades, un *ácido nucleico* tiene uno o más enlaces fosforotioato y/o 5'-N-fosforamidita en lugar de enlaces fosfodiéster. En algunas modalidades, un "*ácido nucleico*" es, comprende, o consiste en uno o más nucleósidos naturales (por ejemplo, adenosina, timidina, guanosina, citidina, uridina, desoxiadenosina, desoxitimidina, desoxiguanosina, y desoxicitidina). En algunas modalidades, un "*ácido nucleico*" es, comprende, o consiste en uno o más análogos de nucleósidos (por ejemplo, 2-aminoadenosina, 2-tiotimidina, inosina, pirrolopirimidina, 3-metiladenosina, 5-metilcitidina, C-5 propiniluridina, C-5 propiniluridina, 2-aminoadenosina, C-5-bromouridina, C-5-fluorouridina, C-5-yodouridina, C-5-propiniluridina, C-5-propiniluridina, C-5-metilcitidina, 2-aminoadenosina, 7-deazaadenosina, 7-deazaguanosina, 8-oxoadenosina, 8-oxoguanosina, O(6)-metilguanina, 2-tiocitidina, bases metiladas, bases intercaladas, y combinaciones de estos). En algunas modalidades, un "*ácido nucleico*" comprende uno o más azúcares modificados (por ejemplo, 2'-fluororribosa, ribosa, 2'-desoxirribosa, arabinosa, y hexosa) en comparación con los de ácidos nucleicos naturales. En algunas modalidades, un "*ácido nucleico*" tiene una secuencia de nucleótidos que codifican un producto génico funcional tal como un ARN o proteína. En algunas modalidades, un "*ácido nucleico*" incluye uno o más intrones. En algunas modalidades, un "*ácido nucleico*" incluye uno o más exones. En algunas modalidades, un "*ácido nucleico*" se prepara mediante uno o más de aislamiento a partir de una fuente natural, síntesis enzimática por polimerización basada en una plantilla

- complementaria (*in vivo* o *in vitro*), reproducción en una célula o sistema recombinantes, y síntesis química. En algunas modalidades, un "ácido nucleico" es de al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 o más residuos de largo. En algunas modalidades, un "ácido nucleico" es monocatenario; en algunas modalidades, un "ácido nucleico" es bicatenario. En algunas modalidades "ácido nucleico" tiene una secuencia de nucleótidos que comprende al menos un elemento que codifica, o es el complemento de una secuencia que codifica, un polipéptido. En algunas modalidades, un "ácido nucleico" tiene actividad enzimática.
- 5 **"Unidos operativamente"** incluye una yuxtaposición en donde los componentes descritos se encuentran en una relación que les permite funcionar en su manera prevista. Una secuencia control "unida operativamente" a una secuencia codificante está ligada de manera que la expresión de la secuencia codificante se logra en condiciones compatibles con las secuencias control. Las secuencias "unidas operativamente" incluyen las secuencias de control de la expresión contiguas al gen de interés y las secuencias de control de la expresión que actúan en trans o a una distancia para controlar el gen de interés. El término "secuencia de control de la expresión" incluye secuencias de polinucleótidos, que son necesarias para efectuar la expresión y procesamiento de las secuencias codificantes a las que se unen. Las "secuencias de control de la expresión" incluyen secuencias de iniciación de la transcripción, terminación, promotoras y potenciadoras apropiadas; señales eficientes para el procesamiento del ARN tales como señales de corte y empalme y poliadenilación; secuencias que estabilizan el ARNm citoplasmático; secuencias que potencian la eficiencia de la traducción (es decir, secuencia consenso Kozak); secuencias que potencian la estabilidad de las proteínas; y cuando sea deseado, secuencias que potencian la secreción de proteínas. La naturaleza de tales secuencias control difiere según el organismo huésped. Por ejemplo, en procariotas, tales secuencias control generalmente incluyen secuencias promotoras, sitio de unión al ribosoma, y terminación de la transcripción, mientras que, en eucariotas, típicamente, tales secuencias control incluyen promotores y secuencias de terminación de la transcripción. El término "secuencias control" está destinado a incluir componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y puede incluir, además, componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder y secuencias de parejas de fusión.
- 10 **"Fenotipo"** incluye un rasgo, o una clase o conjunto de rasgos mostrados por una célula u organismo. En algunas modalidades, un fenotipo particular puede correlacionarse con un alelo o genotipo particular. En algunas modalidades, un fenotipo puede ser discreto; en algunas modalidades, un fenotipo puede ser continuo.
- 15 **"Condiciones fisiológicas"** incluye su significado conocido en la técnica que hace referencia a las condiciones en las cuales las células u organismos viven y/o se reproducen. En algunas modalidades, el término incluye las condiciones del medio externo o interno que pueden producirse en la naturaleza para un organismo o sistema celular. En algunas modalidades, las condiciones fisiológicas son las condiciones presentes dentro del cuerpo de un animal humano o no humano, especialmente las condiciones presentes en un sitio quirúrgico y/o dentro de él. Las condiciones fisiológicas típicamente incluyen, por ejemplo, un intervalo de temperatura de 20-40 °C, presión atmosférica de 1, pH de 6-8, concentración de glucosa de 1-20 mM, concentración de oxígeno a niveles atmosféricos, y gravedad similar a la presente en la tierra. En algunas modalidades, las condiciones en un laboratorio se manipulan y/o se mantienen en condiciones fisiológicas. En algunas modalidades, las condiciones fisiológicas se encuentran en un organismo.
- 20 **"Polipéptido"** incluye cualquier cadena polimérica de aminoácidos. En algunas modalidades, un polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos presente en la naturaleza. En algunas modalidades, un polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que no está presente en la naturaleza. En algunas modalidades, un polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que contiene porciones que se producen en la naturaleza separadas entre sí (es decir, a partir de dos o más organismos diferentes, por ejemplo, porciones humanas y no humanas). En algunas modalidades, un polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos que está modificada genéticamente en el hecho de que se diseña y/o produce mediante la acción del hombre.
- 25 **"Prevenir" o "prevención"**, cuando se usa en relación con la ocurrencia de una enfermedad, trastorno, y/o afección, incluye reducir el riesgo de desarrollar la enfermedad, trastorno y/o afección y/o a retrasar la aparición de una o más características o síntomas de la enfermedad, trastorno o afección. La prevención puede considerarse completa cuando la aparición de una enfermedad, trastorno o afección se ha retrasado durante un periodo de tiempo predefinido.
- 30 **"Referencia"** incluye un agente, animal, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor estándar o control contra el cual se compara un agente, animal, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de interés. En algunas modalidades, un agente, cohorte, animal, individuo, población, muestra, secuencia o valor de referencia se somete a prueba y/o se determina sustancialmente de manera simultánea con la prueba o determinación del agente, animal, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de interés. En algunas modalidades, un agente, cohorte, animal, individuo, población, muestra, secuencia o valor de referencia es una referencia histórica, materializada opcionalmente en un medio tangible. En algunas modalidades, una referencia puede referirse a un control. Una "referencia" incluye, además, un "animal de referencia". Un "animal de referencia" puede tener una modificación como se describe en la presente descripción, una modificación que es diferente a como se describe en la presente descripción o puede no tener modificaciones (es decir, un animal de tipo silvestre). Típicamente, como entenderán los expertos en la técnica, un agente, animal, cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de referencia se determina o se

caracteriza en condiciones comparables a las utilizadas para determinar o caracterizar el agente, animal (por ejemplo, un mamífero), cohorte, individuo, población, muestra, secuencia o valor de interés.

5 **"Respuesta"** incluye cualquier alteración beneficiosa en la afección de un sujeto que se produce como resultado de o se correlaciona con el tratamiento. Dicha alteración puede incluir la estabilización de la afección (por ejemplo, prevención del deterioro que habría tenido lugar en ausencia del tratamiento), la mejoría de los síntomas de la afección y/o la mejoría de las perspectivas de curación de la afección, etcétera. Puede referirse a la respuesta de un sujeto o a la respuesta de una neurona. La respuesta de la neurona o del sujeto puede medirse de acuerdo con una amplia variedad de criterios, lo que incluye criterios clínicos y criterios objetivos. El examen del sistema motor de un sujeto puede incluir el examen de uno o
10 más de fuerza, reflejos tendinosos, reflejos superficiales, masa muscular, coordinación, tono muscular, movimientos anormales, postura y marcha. Las técnicas para evaluar la respuesta incluyen, pero no se limitan a, examen clínico, flexión de estiramiento (reflejo miotático), reflejo de Hoffmann y/o pruebas de presión. Los métodos y guías para evaluar la respuesta al tratamiento se analizan en Brodal, A.: *Neurological Anatomy in Relation to Clinical Medicine*, ed. 2, Nueva York, Oxford University Press, 1969; Medical Council of the U.K.: *Aids to the Examination of the Peripheral Nervous System*, Palo Alto, Calif., Pendragon House, 1978; Monrad-Krohn, G.H., Refsum, S.: *The Clinical Examination of the Nervous System*, ed. 12, Londres, H.K. Lewis y otros, 1964; y Wolf, J.K.: *Segmental Neurology, A Guide to the Examination and Interpretation of Sensory and Motor Function*, Baltimore, University Park Press, 1981. Los criterios de respuesta exactos pueden seleccionarse de cualquier manera apropiada, siempre y cuando al comparar grupos de neuronas y/o
15 pacientes, los grupos a comparar se evalúen con base en los mismos criterios o en criterios comparables para determinar la tasa de respuesta. Un experto en la técnica podrá seleccionar los criterios apropiados.

"Riesgo", como se entenderá del contexto, de una enfermedad, trastorno y/o afección comprende la probabilidad de que un individuo en particular desarrolle una enfermedad, trastorno y/o afección (por ejemplo, un daño por radiación). En algunas modalidades, el riesgo se expresa como un porcentaje. En algunas modalidades, el riesgo es de 0, 1, 2, 3, 4, 5,
25 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y hasta 100 %. En algunas modalidades el riesgo se expresa como un riesgo relativo a un riesgo asociado con una muestra de referencia o grupo de muestras de referencia. En algunas modalidades, una muestra de referencia o grupo de muestras de referencia tienen un riesgo conocido de una enfermedad, trastorno, afección y/o evento (por ejemplo, un daño por radiación). En algunas modalidades una muestra de referencia o grupo de muestras de referencia son de individuos comparables con un individuo particular. En algunas modalidades, el riesgo relativo es 0,1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más.

"Sustancialmente" incluye la condición cualitativa de exhibir una medida o grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un experto en las técnicas biológicas entenderá que los fenómenos biológicos y químicos casi nunca, si alguna vez, llegan a completarse y/o avanzan hasta su completamiento o alcanzan o evitan un resultado
35 absoluto. El término *"sustancialmente"* se usa por lo tanto en la presente descripción para captar la carencia potencial de completamiento inherente en muchos fenómenos biológicos y químicos.

"Homología sustancial" incluye una comparación entre secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos. Como se apreciará por los expertos en la técnica, generalmente se considera que dos secuencias son *"sustancialmente homólogas"* si contienen residuos homólogos en posiciones correspondientes. Los residuos homólogos pueden ser residuos idénticos. Alternativamente, los residuos homólogos pueden ser residuos no idénticos con características estructurales y/o
40 funcionales adecuadamente similares. Por ejemplo, como bien conocen los expertos en la técnica, ciertos aminoácidos se clasifican típicamente como aminoácidos *"hidrófobos"* o *"hidrófilos"*, y/o como que tienen cadenas laterales *"polares"* o *"no polares"*. La sustitución de un aminoácido por otro del mismo tipo puede considerarse frecuentemente una sustitución *"homóloga"*. Las categorías típicas de los aminoácidos se resumen más abajo.

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
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
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

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
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, lo que incluye aquellos disponibles en programas informáticos comerciales tales como BLASTN para las secuencias de nucleótidos y BLASTP, BLAST con huecos, y PSI-BLAST para las secuencias de aminoácidos. Dichos 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 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de sus residuos correspondientes son homólogos en un segmento relevante de residuos. En algunas modalidades, el tramo pertinente es una secuencia completa. En algunas modalidades, el tramo en cuestión es de al menos 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 o más residuos. En algunas modalidades, el tramo en cuestión incluye residuos contiguos a lo largo de una secuencia completa. En algunas modalidades, el tramo relevante incluye residuos discontinuos a lo largo de una secuencia completa, por ejemplo, residuos no contiguos unidos entre sí por la conformación plegada de un polipéptido o una porción de este. En algunas modalidades, el tramo en cuestión es de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, o más residuos.

"Identidad sustancial" incluye una comparación entre secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos. Como se apreciará por 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, lo que incluye aquellos disponibles en programas informáticos comerciales tales como BLASTN para las secuencias de nucleótidos y BLASTP, BLAST con huecos, y PSI-BLAST para las secuencias de aminoácidos. Dichos 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 secuencias idénticas, los programas mencionados anteriormente típicamente proporcionan un indicio del grado de identidad. En algunas modalidades, dos secuencias se consideran sustancialmente idénticas si al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de sus residuos correspondientes son idénticos en un tramo pertinente de residuos. En algunas modalidades, el tramo pertinente es una secuencia completa. En algunas modalidades, el tramo en cuestión es de al menos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, o más residuos.

"Vector de direccionamiento" o **"constructo de direccionamiento"** incluye una molécula de polinucleótido que comprende una región de direccionamiento. Una región de direccionamiento comprende una secuencia que es idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia en una célula, tejido o animal objetivo y proporciona la integración del constructo de direccionamiento en una posición dentro del genoma de la célula, tejido o animal por medio de recombinación homóloga. Se incluyen, además, las regiones de direccionamiento que se dirigen hacia el objetivo mediante el uso de sitios de reconocimiento de recombinasas sitio específicas (por ejemplo, sitios *loxP* o *Frt*). En algunas modalidades, un constructo de direccionamiento como se describe en la presente descripción comprende, además, una secuencia de ácido nucleico o gen (por ejemplo, un gen indicador o gen homólogo o heterólogo) de particular interés, un marcador seleccionable, secuencias de control y/o reguladoras, y otras secuencias de ácido nucleico que codifican una recombinasa o proteína recombinogénica. En algunas modalidades, un constructo de direccionamiento comprende, además, 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, un constructo de direccionamiento puede comprender un gen de interés humanizado, en su totalidad o en parte, en donde el gen de interés humanizado codifica un 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, un constructo de direccionamiento 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.

"Animal transgénico", "animal transgénico no humano" o "Tg" incluye cualquier animal no humano de origen no natural en el que una o más de las células del animal no humano contienen ácido nucleico heterólogo y/o un gen que codifica un polipéptido de interés, en su totalidad o en parte. En algunas modalidades, un ácido nucleico heterólogo y/o gen se introduce en la célula, directa o indirectamente, mediante la introducción en un precursor de la célula, por medio de la manipulación genética deliberada, tal como por microinyección, o por infección con un virus recombinante. El término manipulación genética no incluye técnicas de reproducción clásicas, sino que en su lugar se dirige a la introducción de una molécula(s) de ADN recombinante. Esta molécula puede integrarse dentro de un cromosoma, o el ADN puede replicarse de manera extracromosómica. El término "Tg" incluye animales que son heterocigotos u homocigotos para un ácido nucleico y/o gen heterólogo, y/o animales que tienen copias simples o múltiples de un ácido nucleico y/o gen heterólogo.

"Tratamiento", "trata" o "tratar" incluye cualquier administración de una sustancia (por ejemplo, un candidato terapéutico) que parcialmente o completamente alivia, mejora, mitiga, inhibe, retarda la aparición, reduce la gravedad, y/o reduce la incidencia de uno o más síntomas, características, y/o causas de una enfermedad, trastorno, y/o afección en particular. En algunas modalidades, dicho tratamiento puede administrarse a un sujeto que no exhibe signos de la enfermedad, trastorno y/o afección en cuestión y/o de un sujeto que sólo exhibe signos tempranos de la enfermedad, trastorno, y/o afección. Alternativamente o adicionalmente, en algunas modalidades, el tratamiento puede administrarse a un sujeto que exhibe uno o más signos establecidos de la enfermedad, trastorno y/o afección en cuestión. En algunas modalidades, el tratamiento puede ser de un sujeto que se ha diagnosticado que padece de la enfermedad, trastorno, y/o afección en cuestión. En algunas modalidades, el tratamiento puede ser de un sujeto que se conoce que tiene uno o más factores de susceptibilidad correlacionados estadísticamente con un mayor riesgo de desarrollo de la enfermedad, trastorno, y/o afección en cuestión.

"Variante" incluye 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 muchas modalidades, una "variante" se diferencia, además, funcionalmente de su entidad de referencia. En general, el hecho de que una entidad particular se considere adecuadamente como una "variante" de una entidad de referencia se basa en su grado de identidad estructural con la entidad de referencia. Como apreciarán los expertos en la técnica, cualquier entidad de referencia biológica o química tiene determinados elementos estructurales característicos. Una "variante", por definición, es una entidad química definida que comparte uno o más de tales elementos estructurales característicos. Para proporcionar algunos ejemplos, una molécula pequeña puede tener un elemento estructural central característico (por ejemplo, un macrociclo central) y/o una o más porciones colgantes características de manera que una variante de la molécula pequeña es una que comparte el elemento estructural central y las porciones colgantes características pero se diferencia en otras porciones colgantes y/o en los tipos de enlaces presentes (simples vs. dobles, E vs. Z, etcétera) dentro del núcleo central, un polipéptido puede tener un elemento de secuencia característico que se compone de una pluralidad de aminoácidos que tienen posiciones designadas relacionadas entre sí en el espacio lineal o tridimensional y/o que contribuyen a una función biológica particular, un ácido nucleico puede tener un elemento de secuencia característico que se compone de una pluralidad de residuos de nucleótidos que tienen posiciones designadas con respecto a otras en el espacio lineal o tridimensional. 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 las porciones químicas (por ejemplo, carbohidratos, lípidos, etcétera) unidas 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 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 muchas modalidades, un polipéptido de interés se considera una "variante" de un polipéptido parental o de referencia si el polipéptido de interés tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la del parental excepto por un pequeño número de alteraciones de la secuencia en posiciones particulares. Típicamente, menos de 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 % o 2 % de los residuos en la variante se sustituyen en comparación con el parental. 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 parental. 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 parental. Por

otra parte, cualquiera de las adiciones o deleciones son típicamente menores que aproximadamente 25, aproximadamente 20, aproximadamente 19, aproximadamente 18, aproximadamente 17, aproximadamente 16, aproximadamente 15, aproximadamente 14, aproximadamente 13, aproximadamente 10, aproximadamente 9, aproximadamente 8, aproximadamente 7, aproximadamente 6, y comúnmente son menores que aproximadamente 5, aproximadamente 4, aproximadamente 3, o aproximadamente 2 residuos. En algunas modalidades, el polipéptido parental o de referencia es uno que se encuentra en la naturaleza. Como entenderán 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 agente infeccioso.

“**Vector**” incluye una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se asocia. En algunas modalidades, los vectores son capaces de replicar de manera extracromosómica y/o expresar los ácidos nucleicos a los que se encuentran unidos en una célula huésped tal como una célula eucariota y/o procariota. Los vectores capaces de dirigir la expresión de genes unidos operativamente se denominan en la presente descripción como “*vectores de expresión*”.

“**De tipo silvestre**” incluye una entidad que tiene una estructura y/o actividad como la que se encuentra en la naturaleza en un estado o contexto “*normal*” (por el contrario, a mutante, enfermo, alterado, etcétera). Los expertos en la técnica apreciarán que los genes y polipéptidos de tipo silvestre existen frecuentemente en múltiples formas diferentes (por ejemplo, alelos).

Descripción detallada de ciertas modalidades

Se proporcionan animales no humanos que tienen una interrupción en un locus *C9ORF72*. En particular, los animales no humanos descritos en la presente descripción tienen una delección de toda la secuencia codificante en un locus *C9ORF72*, es decir, una delección de un segmento genómico que codifica para todas las isoformas de *C9ORF72* (por ejemplo, una delección de la porción codificante del exón 2 hasta la porción codificante del exón 11 de la isoforma V1). Los animales no humanos, como se describe en la presente descripción, demuestran pérdida de peso y anomalías motoras similares a la ALS tales como, por ejemplo, inactividad motora y deterioro de la marcha. Además, los animales no humanos descritos en la presente descripción demuestran esplenomegalia y/o linfadenopatía aproximadamente a las ocho (8) semanas de edad. Además, los animales no humanos descritos en la presente descripción demuestran glomerulonefritis aproximadamente a las 35 semanas de edad. Por lo tanto, los animales no humanos proporcionados son particularmente útiles para el desarrollo e identificación de candidatos terapéuticos para el tratamiento y/o mejora de enfermedades, trastornos y afecciones neurodegenerativas y, en algunas modalidades, enfermedades, trastornos y afecciones autoinmunitarias y/o inflamatorias. En particular, los animales no humanos descritos en la presente descripción abarcan la introducción de un gen indicador en un locus *C9ORF72* endógeno, lo que resulta en la expresión del gen indicador (es decir, un polipéptido indicador) en los sistemas nervioso e inmunitario del animal no humano. Dichos animales transgénicos no humanos proporcionan una fuente de células para determinar la eficacia de candidatos terapéuticos para mejorar la ALS y/o la FTD. Además, dichos animales transgénicos no humanos proporcionan un sistema de modelo animal útil para el desarrollo de agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades, trastornos y afecciones neurodegenerativas, autoinmunitarias y/o inflamatorias.

En algunas modalidades, los animales no humanos descritos en la presente descripción desarrollan una enfermedad similar a la ALS y/o la FTD debido a la ausencia, falta o disminución del nivel de *C9ORF72* (por ejemplo, ARN, polipéptido, etcétera) en células de los animales no humanos. En algunas modalidades, los animales no humanos descritos en la presente descripción desarrollan glomerulonefritis debido a la ausencia, falta o disminución del nivel de *C9ORF72* (por ejemplo, ARN, polipéptido, etcétera). En algunas modalidades, los animales no humanos descritos en la presente descripción son heterocigotos para una interrupción en un locus *C9ORF72* como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, los animales no humanos descritos en la presente descripción son homocigotos para una interrupción en un locus *C9ORF72* como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, los animales no humanos como se describen en la presente descripción comprenden un gen indicador, en su totalidad o en parte, en donde dicho gen indicador se une operativamente a un promotor de *C9ORF72*. En algunas modalidades, los promotores de *C9ORF72* incluyen promotores de *C9ORF72* endógenos.

La presente descripción proporciona un análisis fenotípico integral de una línea de animal no humano con ablación global de *C9orf72* y el descubrimiento de un papel único para *C9orf72* en la homeostasis del sistema inmunitario. La presente descripción demuestra específicamente que una ablación completa de *C9orf72* resultó en anomalías de la marcha y una indicación de la debilidad de las extremidades posteriores que sugiere un posible inicio de la patología de las neuronas motoras inferiores que comienza aproximadamente a las 40 semanas de edad. Como se describe en la presente descripción, el fenotipo inmunitario exhibido por animales no humanos *C9orf72*^{-/-} consistió en expansiones selectas tanto en los compartimientos mieloides como linfoides, con una mayor activación de células T y células plasmáticas elevadas. La neutrofilia y la monocitosis resultaron en infiltrados mixtos en los órganos inmunitarios que se expandieron, pero no destruyeron la arquitectura básica. Los animales no humanos *C9orf72*^{-/-} demostraron citocinas séricas elevadas (por ejemplo, IL-12) y firmas de ARN tisular compatibles con regulación positiva mieloide. La enfermedad renal con cambios patológicos acompañantes tales como, por ejemplo, la membrana basal engrosada y la formación de cilindros, estaba presente en la mayoría de los animales no humanos aproximadamente a las 35 semanas de edad. A nivel microscópico, los glomérulos se tiñeron fuertemente con anticuerpos IgG e IgM y complemento C3 en un patrón que indica la deposición

de complejos inmunitarios. Como también se describió en la presente descripción, los animales no humanos *C9orf72*^{-/-} demostraron un alto título de autoanticuerpos, lo que incluye anti-RF, ANA, anti-Sm y anti-cardiolipina, que indicaron que la pérdida de la expresión de *C9orf72* altera profundamente la homeostasis inmunitaria. No se observó ninguna de las características del fenotipo relacionadas con el sistema inmunitario en animales no humanos de tipo silvestre o *C9orf72*^{+/-} (heterocigotos). Por lo tanto, la presente invención proporciona, entre otras cosas, la creación de un sistema mejorado *in vivo* para el desarrollo de nuevas terapias y/o la identificación de nuevos objetivos terapéuticos para el tratamiento de diversas enfermedades, trastornos o afecciones que no pueden lograrse mediante el uso de los sistemas *in vivo* establecidos debido, en parte, a la inexistencia de fenotipos particulares en dichos sistemas establecidos.

Varios aspectos de la invención se describen en detalle en las secciones siguientes. El uso de secciones no significa que limite la invención. Cada sección puede aplicarse a cualquier aspecto de la invención. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique de cualquier otra manera.

C9ORF72

La esclerosis lateral amiotrófica (ALS), también conocida como enfermedad de Lou Gehrig, es el trastorno paralítico de inicio en adultos más frecuente, caracterizado por la pérdida de neuronas motoras superiores y/o inferiores. La ALS se produce en hasta 20 000 personas en los Estados Unidos con aproximadamente 5000 casos nuevos cada año. La demencia frontotemporal (FTD), originalmente denominada como enfermedad de Pick por el médico Arnold Pick, es un grupo de trastornos provocados por la degeneración celular progresiva en los lóbulos frontales o temporales del cerebro. Se informa que la FTD representa el 10-15 % de todos los casos de demencia. La expansión repetida de hexanucleótidos de GGGGCC entre dos exones no codificantes de *C9ORF72* se ha vinculado tanto a la ALS como a la FTD (DeJesus-Hernandez, M. y otros, 2011, *Neuron* 72:245-256; Renton, A.E. y otros, 2011, *Neuron* 72:257-268; Majounie, E. y otros, 2012, *Lancet Neurol.* 11:323-330; Waite, A.J. y otros, 2014, *Neurobiol. Aging* 35:1779.e5-1779.e13). Sin embargo, el mecanismo mediante el cual dichas mutaciones repetidas provocan la enfermedad, ya sea a través de una pérdida o ganancia de función de toxicidad, sigue sin aclararse. Por ejemplo, el pez cebra con una expresión reducida de *C9ORF72* a partir de la reducción dirigida o la anulación del gen muestra axonopatía y déficits en la función locomotora (Ciura, S. y otros, 2013, *Ann. Neurol* 74(42):180-187), mientras que los ratones con expresión reducida de *C9ORF72* no muestran ninguna característica conductual o patológica asociada con la enfermedad de ALS (Lagier-Tourenne, C. y otros, 2013, *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.* E4530-E4539). Además, los ratones con introducción de genes que se han generado para contener 66 expansiones repetidas de *C9ORF72* exhiben focos de ARN y agregados de proteínas dipeptídicas en sus neuronas. Estos ratones mostraron pérdida de neuronas corticales y exhibieron déficits de comportamiento y motores a los 6 meses de edad (Chew, J. y otros, 2015, *Science*, 14 de mayo. Pii:aaa9344).

Se han informado muchos aspectos patológicos relacionados con las expansiones repetidas de hexanucleótidos GGGGCC en *C9ORF72*, como, por ejemplo, la formación dependiente de la longitud de la repetición de los focos de ARN, el secuestro de proteínas específicas de unión al ARN y la acumulación y agregación de proteínas repetidas dipeptídicas (por ejemplo, revisado en Stepto, A. y otros, 2014, *Acta Neuropathol.* 127:377-389; ver también Almeida, S. y otros, 2013, *Acta Neuropathol.* 126:385-399; Bieniek, K.F. y otros, 2014, *JAMA Neurol.* 71(6):775-781; van Blitterswijk, M. y otros, 2014, *Mol. Neurodegen* 9:38, 10 páginas). Aunque se ha informado que *C9ORF72* regula el tráfico endosómico (Farg, M.A. y otros, 2014, *Human Mol. Gen.* 23(13):3579-3595), gran parte de la función celular de *C9ORF72* es aún desconocida. En efecto, *C9ORF72* es un gen que codifica una proteína no caracterizada con una función desconocida. A pesar de la falta de comprensión que rodea a *C9ORF72*, se han desarrollado varios modelos animales, lo que incluye líneas celulares modificadas genéticamente, para la ALS y/o la FTD (Roberson, E.D., 2012, *Ann. Neurol.* 72(6):837-849; Panda, S.K. y otros, 2013, *Genetics* 195:703-715; Suzuki, N. y otros, 2013, *Nature Neurosci.* 16(12):1725-1728; Xu, Z. y otros, 2013, *Proc. Nat. Acad. Sci. EE.UU.* 110(19):7778-7783; Hukema, R.K. y otros, 2014, *Acta Neuropathol. Comm.* 2:166, 4 páginas). Por ejemplo, ratones transgénicos que tienen una inserción de un gen *lacZ* que reemplazó a los exones 2-6 de *C9orf72* (*311004021Rik*) se han producido por los esfuerzos de direccionamiento de genes del Proyecto Knockout Mouse (ver Figura 1d de Suzuki, N. y otros, 2013, *supra*; para KOMP, ver Skarnes, W.C. y otros, 2011, *Nature* 474(7351):337-342). Se observó tinción de X-gal en el cerebro, la médula espinal, los testículos y los centros germinales del bazo en esos ratones, sin embargo, no en el músculo (tibial anterior), corazón, pulmón, hígado y riñón. Sin embargo, no está claro si los exones no eliminados restantes (es decir, 7-11) producen alguna expresión y, en consecuencia, funcionan. Otro informe que usa una cepa de ratón transgénico que contiene 80 repeticiones GGGGCC unidas operativamente con un indicador fluorescente y controladas por un elemento de respuesta a la tetraciclina sin ninguna secuencia de *C9orf72* circundante, demostraron inclusiones citoplasmáticas neuronales similares a las observadas en pacientes con ALS-FTD, lo que sugiere que la expansión de la repetición en sí misma puede ser responsable de la enfermedad (Hukema, R.K. y otros, 2014, *Acta Neuropathol. Comm.* 2:166, 4 páginas). Estos ratones han sido útiles para establecer un perfil de expresión inicial de *C9orf72* en células del SNC y proporcionar cierta comprensión del mecanismo de acción asociado con la expansión de repeticiones; sin embargo, aún no está claro si el diseño específico de estos constructos en estos ratones indica funciones específicas que pueden atribuirse con confianza a *C9orf72* o son el resultado de algo más, no relacionado con la función de *C9orf72*.

Sin embargo, en algunos casos, el diseño del constructo puede influir en el fenotipo del animal transgénico resultante (ver, por ejemplo, Muller, U., 1999, *Mech. Develop.* 81:3-21). Debido a que los ratones con interrupción de *C9orf72* como se describió anteriormente usaron un vector de direccionamiento con un casete de selección dirigido por un promotor (ver Figura 1d de Suzuki, N. y otros, 2013, *supra*; Figura 1 de Skarnes, W.C. y otros, 2011, *supra*), no está claro si el patrón

de expresión mostrado se correlaciona correctamente con la expresión normal de C9ORF72. De hecho, la expresión de los exones restantes 7-11 conducida por el promotor asociado al casete de selección o el promotor de C9ORF72 en sí mismo no se ha determinado. Como resultado, los fenotipos, y tal vez la expresión de C9ORF72 a través de *lacZ*, observada en dichos ratones puede modificarse o de cualquier otra manera sesgarse debido a aspectos del vector de direccionamiento. Además, una cepa de ratón transgénico que contenía una repetición inducible de GGGGCC (Hukema, 2014, *supra*) se diseñó sin secuencia de flanqueo humano presumiblemente debido al hecho de que se pensaba que dicha secuencia circundante afectaba la traducción de las secuencias de repeticiones. Por lo tanto, dichos sistemas *in vivo* que explotan la biología mediada por C9ORF72 para aplicaciones terapéuticas están incompletos.

Como se describe en la presente descripción, la presente descripción describe específicamente un modelo animal no humano para la ALS y/o la FTD, cuyo animal no humano comprende una interrupción en un locus C9ORF72. En particular, la presente descripción describe específicamente un modelo de roedor para la ALS y/o la FTD, en donde el roedor comprende una delección de toda la secuencia codificante para todas las isoformas de C9orf72 (por ejemplo, la porción codificante del exón 2 hasta la porción codificante del exón 11 de V1) de un gen C9orf72 a través de la inserción de un gen indicador *lacZ*. El vector de direccionamiento empleado por los presentes inventores se diseñó para contener un casete de selección de fármaco con autoeliminación (ver, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos núms. 8,697,851, 8,518,392 y 8,354,389), lo que permite la eliminación del casete de selección de fármaco de una manera dependiente del desarrollo, lo que elimina de esta manera cualquier posibilidad de efectos del promotor o la expresión aberrante de los exones restantes o efectos a partir del propio casete de selección. Como se describe en la presente descripción, los presentes inventores lograron la ablación completa de C9orf72. Además, los presentes inventores midieron los comportamientos motores de estos roedores mediante el uso de ensayos en rotarod, campo abierto y pasarela hasta 60 semanas de edad y déficits neurológicos durante el mismo período. Sin desear limitarse por ninguna teoría en particular, la presente descripción demuestra que solo el 40 % de los roedores con anulación del gen C9orf72 sobrevivieron después de las 60 semanas de edad y los roedores dejaron de aumentar de peso a partir de alrededor las 40 semanas de edad. Si bien las pruebas de rotarod no mostraron cambios significativos debido a la delección de C9orf72, los roedores descritos en la presente descripción demostraron paresia significativa de las extremidades posteriores, deterioro motor, movilidad reducida y anomalías de la marcha alrededor de las 50 semanas de edad. Además, la presente descripción demuestra específicamente que el silenciamiento genético del C9orf72 murino resulta en múltiples anomalías motoras y neurológicas similares a las que se encuentran en las enfermedades de las neuronas motoras humanas. Por lo tanto, los roedores descritos en la presente descripción proporcionan, al menos en algunas modalidades, sistemas *in vivo* mejorados para el desarrollo de candidatos terapéuticos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas tales como, por ejemplo, la ALS y/o la FTD. Además, los roedores descritos en la presente descripción superan los déficits en los modelos animales existentes caracterizados por la delección subóptima de C9orf72 para el desarrollo de terapias dirigidas a C9orf72.

Secuencias de C9ORF72

Se han informado variantes de transcritos de C9ORF72 de ratón en la técnica (por ejemplo, Koppers y otros, Ann Neurol (2015); 78:426-438; Atkinson y otros, Acta Neuropathologica Communications (2015) 3:59), y también se representan en la Figura 1A. La información genómica de las tres variantes de transcritos de C9ORF72 de ratón también están disponibles en el sitio web de Ensembl bajo las designaciones de ENSMUST00000108127 (V1), ENSMUST00000108126 (V2) y ENSMUST00000084724 (V3). Las secuencias de ARNm y de aminoácidos de C9ORF72 no humano ilustrativas (por ejemplo, de roedor) se exponen en la Tabla 1. Para las secuencias de ARNm, la letra en negritas contenida entre paréntesis indica la secuencia codificante y los exones consecutivos, donde se indican, se separan al alternar letras mayúsculas y minúsculas. Para las secuencias de aminoácidos, las secuencias de polipéptidos maduros, donde se indica, están en letras negritas.

Se conocen en la técnica variantes de transcritos de C9ORF72 humano. Una variante de transcripto de C9ORF72 humano carece de múltiples exones en las regiones codificantes central y 3', y su exón terminal 3' se extiende más allá de un sitio de empalme que se usa en la variante 3 (ver más abajo), lo que resulta en una nueva región no traducida (UTR) 3' en comparación a la variante 3. Esta variante codifica un polipéptido significativamente más corto y su aminoácido C-terminal es distinto en comparación con el que se codifica por otras dos variantes. Las secuencias de ARNm y de aminoácidos de esta variante pueden encontrarse en los números de acceso GenBank NM_145005.6 y NP_659442.2, respectivamente. Una segunda variante (2) de transcripto de C9ORF72 humano difiere en la región no traducida (UTR) 5' en comparación con la variante 3. Las secuencias de ARNm y aminoácidos de esta variante pueden encontrarse en los números de acceso de GenBank NM_018325.4 y NP_060795.1, respectivamente. Una tercera variante (3) de transcripto de C9ORF72 humano contiene la secuencia más larga entre las tres variantes informadas y codifica la isoforma más larga. Las secuencias de ARNm y de aminoácidos de esta variante pueden encontrarse en los números de acceso de GenBank NM_001256054.2 y NP_001242983.1, respectivamente. Las variantes 2 y 3 codifican la misma proteína.

TABLA 1

Mus musculus C9orf72 ARNm (NM_001081343; SEQ ID NO:1)

gtgtccggggcgggcggtcccggggcggggcccggagcgggctgcggttgcggtccctgcgccggcggtgaaggcgc
 agcagcggcgagtggCTATTGCAAGCGTTCGGATAATGTGAGACCTGGAATGCAGTG
 AGACCTGGGATGCAGGG(ATGTCGACTATCTGCCCCCACCATCTCCTGCT
 GTTGCCAAGACAGAGATTGCTTTAAGTGGTGAATCACCTTGTTGGCGG
 CTACCTTTGCTTACTGGGATAATATTCTTGGTCCTAGAGTAAGGCATATT
 TGGGCTCCAAAGACAGACCAAGTGCTTCTCAGTGATGGAGAAATAACTT
 TTCTTGCCAACCACACTCTAAATGGAGAAATTCTTCGAAATGCAGAGAG
 TGGGGCTATAGATGTAAAATTTTTTGTCTTATCTGAAAAAGGGGTAAATTA
 TTGTTTCATTAATCTTCGACGGAACTGGAATGGAGATCGGAGCACTTA
 TGGACTATCAATTATACTGCCGCAGACAGAGCTGAGCTTCTACCTCCCA
 CTTACAGAGTGTGTGTTGACAGGCTAACACACATTATTCGAAAAGGAA
 GAATATGGATGCATAAGgaaagacaagaaaatgtccagaaaattgtcttgggaaggcacagagaggat
 ggaagatcagGGTCAGAGTATCATTCCCATGCTTACTGGGGAAGTCATTCCTG

[illegible]

***Mus musculus* C9orf72 aminoácido (NM_001081343; SEQ ID NO:2)**

MSTICPPPSPAVAKTEIALSGESPLLAATFAYWDNILGPRVRHIWAPKTDQV
LLSDGEITFLANHTLNGEILRNAESGAIDVKFFVLSEKGVIIIVSLIFDGNWNG
DRSTYGLSILPQTELSFYLP LHRVCVDRLTHIRKGRIMHMERQENVQKI
VLEGTERMEDQGGSIIPMLTGEVIPVMELLASMKSHSVPEDIDIADTVLNDD
DIGDSCHIEGFLNNAISSILQTCGCSVVVGSSAEKVNKIVRTLCLFLTPAERK
CSRLCEAESSFKYESGLFVQGLLKDATGSFVLPFRQVMYAPYPTTHIDVDVN
TVKOMPPCHEHIYNORRYMRSELTAFWRATSEEDMAQDTHIYTDESFTPD

NIFQDVLHRDTLVKAFLDQVFHLKPGLSLRSTFLAQFLLILHRKALTLLIKYIE
DDTQKGKKPFKSLRNLKIDLDLTAEGDLNIMALAEKIKPGLHSFIFGRPFYTSVQ
ERDVLMTF

Rattus norvegicus C9orf72 mRNA (NM_001007702; SEQ ID NO:3)

CGTTTGTAGTGTTCAGCCATCCCAATTGCCTGTTTCCTTCTCTGTGGGAGTGGTG
TCTAGACAGTCCAGGCAGGGTATGCTAGGCAGGTGCGTTTTGGTTGCCTCAG
ATCGCAACTTGACTCCATAACGGTGACCAAAGACAAAAGAAGGAAACCAGA
TTAAAAAGAACCGGACACAGACCCCTGCAGAATCTGGAGCGGCCGTGGTTG
GGGGCGGGGCTACGACGGGGCGGACTCGGGGGCGTGGGAGGGCGGGGCCG
GGGCGGGGCCCCGAGCCGGCTGCGGTTGCGGTCCCTGCGCCGGCGGTGAAG
GCGCAGCGGCGGCGAGTGGCTATTGCAAGCGTTTGGATAATGTGAGACCTGG
GATGCAGGG(ATGTCGACTATCTGCCCCCACCATCTCCTGCTGTTGCCA
AGACAGAGATTGCTTTAAGTGGTGAATCACCCCTTGGTTGGCGGCTACCTT
TGCTTACTGGGATAATATTCTTGGTCCTAGAGTAAGGCACATTTGGGGCT
CCAAAGACAGACCAAGTACTCCTCAGTGATGGAGAAATCACTTTTCTTG
CCAACCACACTCTGAATGGAGAAATTCTTCGGAATGCGGAGAGTGGGGC
AATAGATGTAAAGTTTTTTGTCTTATCTGAAAAGGGCGTCATTATTGTTT
CATTAACTCTTCGACGGGAACCTGGAACGGAGATCGGAGCACTTACGGACT
ATCAATTATACTGCCGCAGACGGAGCTGAGTTTCTACCTCCCACTGCAC
AGAGTGTGTGTTGACAGGCTAACGCACATCATTTCGAAAAGGAAGGATAT
GGATGCACAAGGAAAGACAAGAAAATGTCCAGAAAATTGTCTTGGAAGG
CACCGAGAGGATGGAAGATCAGGGTCAGAGTATCATCCCTATGCTTACT
GGGGAGGTCATCCCTGTGATGGAGCTGCTTGCGTCTATGAGATCACACA
GTGTTCTCTGAAGACCTCGATATAGCTGATACAGTACTCAATGATGATGA
CATTGGTGACAGCTGTCATGAAGGCTTTCTTCTCAATGCCATCAGCTCA
CATCTGCAGACCTGCGGCTGTTCTGTGGTGGTAGGCAGCAGTGCAGAGA
AAGTAAATAAGATAGTAAGAACACTGTGCCTTTTTCTGACACCAGCAGA
GAGGAAGTGCTCCAGGCTGTGTGAAGCCGAATCGTCCTTTAAATACGAA
TCTGGACTCTTTGTACAAGGCTTGCTAAAGGATGCGACTGGCAGTTTTG
TACTACCTTTCCGGCAAGTTATGTATGCCCTTATCCCACCACACACATC
GATGTGGATGTCAACACTGTCAAGCAGATGCCACCGTGTCATGAACATA
TTTATAATCAACGCAGATACATGAGGTCAGAGCTGACAGCCTTCTGGAG
GGCAACTTCAGAAGAGGACATGGCTCAGGACACCATCATCTACACAGAT
GAGAGCTTCACTCCTGATTTGAATATTTTCCAAGATGTCTTACACAGAGA
CACTCTAGTGAAAGCCTTTCTGGATCAGGTCTTCCATTTGAAGCCTGGC
CTGTCTCTCAGGAGTACTTTCCTTGACAGTTCCTCCTCATTCTTCACAG
AAAAGCCTTGACACTAATCAAGTACATAGAGGATGACACGCAGAAGGGG
AAAAAGCCCTTTAAGTCTCTTCGGAACCTGAAGATAGATCTTGATTAAAC
AGCAGAGGGGCGACCTTAACATAATAATGGCTCTAGCTGAGAAAATTAAG
CCAGGCCTACACTCTTTCATCTTCGGGAGACCTTTCTACACTAGTGTCCA
AGAACGTGATGTTCTAATGACTTTTTAA)ACATGTGGTTTGCTCCGTGTGTC

TCATGACAGTCACACTTGCTGTTACAGTGTCTCAGCGCTTTGGACACATCCTT
 CCTCCAGGGTCTTGCCGAGGACACGTTACACTACACTTGTCTAGTAGAGGTC
 TGTACCAGATGTCAGGTACATCGTTGTAGTGAATGTCTCTTTTCCTAGACTAG
 ATGTACCCTCGTAGGGACTTATGTTTACAACCCTCCTAAGTACTAGTGCTGTC
 TTGTAAGGATACGAATGAAGGGATGTAAACTTCACCACAACCTGCTGGTTGGT
 TTTGTTGTTTTTGTTTTTTGAACCTTATAATTCATGGTTTACATGCATCACACT
 GAAACCCTAGTTAGCTTTTTACAGGTAAGCTGTGAGTTGACTGCCTGTCCCTG
 TGTCTCTGGCCTGTACGATCTGTGGCGTGTAGGATCACTTTTGCAACAACCTA
 AAAACTAAAGCACTTTGTTTGCAGTTCTACAGAAAGCAACTTAGTCTGTCTG
 CAGATTCGTTTTTGAAGAAGACATGAGAAAGCGGAGTTTTAGGTGAAGTCA
 GTTGTGGATCTTCCTTTATAGACTTAGTCCCTTAGATGTGGTCTGTATAGAC
 ATGCCCAACCATCATGCATGGGCACTGAATATCGTGAACCTGTGGTATGCTTT
 TTGTTGGTTTATTGTACTTCTGTCAAAGAAAGTGGCATTGGTTTTTATAATTG
 TTGCCAAGTTTTAAGGTTAATTTTCATTATTTTTGAGCCAAATTAATAATGTGC
 ACCTCCTGTGCCTTTCCCAATCTTGGAAAATATAATTTCTTGGCAGAAGGTCA
 GATTTACAGGGCCAGTCACTTTCGTCTGACTTCCCTTTGCACAGTCCGCCATG
 GGCCTGGCTTAGAAGTTCTTGTAACCTATGCCAGAGAGTACATTTCGCTGATA
 AAATCTTCTTTGCAGAGCAGGAGAGCTTCTTGCCTCTTTCCTTTCATTTCTGC
 CTGGACTTTGGTGTCTCTCCACGTTCCTTGCATCCTAAGGACAGCAGGAGAAC
 TCTGACCCCAGTGCTATTTCTCTAGGTGCTATTGTGGCAAACCTCAAGCGGTCC
 GTCTCTGTCCCTGTAACGTTCTGACCTTGCTGGCTGTGAAGTACTGACTGGTA
 AAGCTCCGTGCTACAGCAGTGTAGGGTATACACAAACACAAGTAAGTGTTTT
 ATTTAAACTGTGGACTTAGCATAAAAAGGGAGACTATATTTATTTTTTACA
 AAAGGGATAAAAATGGAACCTTTCTCACCACACAGATTTAGTCAGAAAAA
 AACATTCTATTCTGAAAGGTCACAGTGGTTTTGACATGACACATCAGAACAA
 CGCACACTGTCCATGATGGCTTATGAACTCCAAGTCACTCCATCATGGTAAA
 TGGGTAGATCCCTCCTTCTAGTGTGCCACACCATTGCTTCCCACAGTAGAATC
 TTATTTAAGTGCTAAGTGTGTCTCTGCTGGTTTACTCTGTTGTTTTAGAGAAT
 GTAAGTTGTATAGTGAATAAGTTATTGAAGCATGTGTAAACACTGTTATACA
 TCTTTTCTCCTAGATGGGGAATTTGGAATAAAATACCTTTAAATTCAAAAA
 AAAAAAAAAAAAAAAAAA

***Rattus norvegicus* C9orf72 aminoácido [NP_001007703; SEQ ID NO:4)**

MSTICPPSPPAVAKTEIALSGESPLLAATFAYWDNILGPRVRHIWAPKTDQVLLS
 DGEITFLANHTLNGEILRNAESGAIDVKFFVLSEKGVIIIVSLIFDGNWNGDRSTYG
 LSIIPLQTELSFYLPVHRVCVDRLTHIIRKGRIMHMERQENVQKIVLEGTERMED
 QGQSIIPLMTGEVIPVMELLASMRSHSVPELDIADIVLNDDDIGDSCHEGFLN
 AISSHLQTCGCSVVVGSSAEKVNKIVRTLCLFLTPAERKCSRCEAESSFKYESGL
 FVQGLLKDATGSFVLPFRQVMYAPYPTTHIDVDVNTVKQMPPCHEHIYNQRRY
 MRSELTAFWRATSEEDMAQDTHIYTDESFTPDNLNIFQDVLHRDTLVKAFLDQVFH
 LKPGLSLRSTFLAQFLILHRKALTLIKIEDDTQKGKKPFKSLRNLKIDLDLTAE
 GDLNIIMALAEEKIPGLHSFIFGRPFYTSVQERDVLMTF

Vectores de direccionamiento a C9ORF72 y producción de animales no humanos que tienen una interrupción en un locus C9ORF72

- 5 En la presente descripción se proporcionan vectores de direccionamiento o constructos de direccionamiento para la producción de animales no humanos que tienen una interrupción en un locus *C9ORF72* como se describe en la presente descripción.
- 10 Pueden usarse secuencias de ADN para preparar vectores de direccionamiento para animales con anulación del gen (por ejemplo, un KO *C9ORF72*). Típicamente, una molécula de polinucleótido (por ejemplo, un inserto de ácido nucleico) que codifica un gen indicador y/o un marcador seleccionable se inserta en un vector, preferentemente un vector de ADN, para replicar la molécula de polinucleótido en una célula huésped adecuada.
- 15 Una molécula de polinucleótido (o inserto de ácido nucleico) comprende un segmento de ADN que se desea integrar en un locus objetivo. 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. Prácticamente cualquier polinucleótido de interés puede contenerse dentro de
- 20 un inserto de ácido nucleico y de esta manera integrarse en un locus genómico objetivo. Los métodos descritos en la presente descripción, proporcionan al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más polinucleótidos de interés para integrarse en un locus genómico *C9ORF72* objetivo.
- 25 En algunas modalidades, un polinucleótido de interés contenido en un inserto de ácido nucleico codifica un indicador. En algunas modalidades, un polinucleótido de interés codifica un marcador seleccionable.
- En algunas modalidades, un polinucleótido de interés se flanquea por o comprende sitios de recombinación específica de sitio (por ejemplo, *loxP*, *Frt*, etcétera). En algunas modalidades determinadas, los sitios de recombinación específica de sitio flanquean un segmento de ADN que codifica un indicador y/o un segmento de ADN que codifica un marcador seleccionable. En la presente descripción se describen polinucleótidos de interés ilustrativos, lo que incluye marcadores de selección y genes indicadores que pueden incluirse dentro de los insertos de ácido nucleico.
- 30 Se conocen en la técnica diversos métodos empleados en la preparación de plásmidos, constructos de ADN y/o vectores de direccionamiento y transformación de organismos huéspedes. Para otros sistemas de expresión adecuados para células procariotas y eucariotas, así como también para procedimientos generales de recombinación, ver Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2da Ed., ed. por Sambrook, J. y otros, Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989.
- 35 Como se describió anteriormente, secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos de *C9ORF72* no humanos (por ejemplo, de roedores) ilustrativas para su uso en la construcción de vectores de direccionamiento para animales con anulación del gen se proporcionan en la Tabla 1. Otras secuencias de *C9ORF72* no humanos pueden encontrarse, además, en la base de datos GenBank. Los vectores de direccionamiento a *C9ORF72*, en algunas modalidades, comprenden secuencias de ADN que codifican un gen indicador y/o un marcador seleccionable, flanqueado por secuencias que son idénticas o sustancialmente homólogas a las secuencias flanqueantes de una región objetivo (también denominadas como "brazos de homología") para su inserción en el genoma de un animal no humano transgénico. Para dar solo un ejemplo, puede
- 40 establecerse un punto de inicio de delección aguas arriba (en dirección 5') de un primer exón, un primer exón codificante o el primer o segundo codón, para permitir que un inserto de ácido nucleico se una operativamente a una secuencia reguladora endógena (por ejemplo, un promotor). La Figura 1A ilustra una estrategia de direccionamiento para realizar una delección dirigida de toda la secuencia codificante de un gen *C9orf72* murino y su reemplazo con un casete que contiene una secuencia de un gen *lacZ* que codifica β -galactosidasa y un casete de selección de fármaco (Neo) que codifica la neomicina fosfotransferasa para la selección de colonias de células madre embrionarias (ES) resistentes a G418. El vector de direccionamiento incluye, además, 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 protamina 1; Prot-Cre-SV40). El casete de selección de fármaco y las secuencias que codifican la recombinasa Cre se
- 45 flanquean por sitios de reconocimiento de recombinasas *loxP* (LP) que permiten la escisión mediada por Cre del casete de selección de fármaco de una manera dependiente del desarrollo, por ejemplo, la progenie derivada de roedores cuyas células germinales contienen el gen *C9orf72* interrumpido descrito anteriormente liberará el marcador seleccionable (Neo) durante el desarrollo (ver 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 desde las células diferenciadas o las células germinales. Por lo tanto, antes del análisis fenotípico, el casete de selección de fármaco se elimina, lo que deja solo el gen indicador *lacZ* unido operativamente al promotor de *C9orf72* murino.
- 50
- 55 Como se describe en la presente descripción, la interrupción de un locus *C9orf72* puede comprender un reemplazo o una inserción/adición al locus *C9orf72* o a una porción de este 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 ubica en unión operativa con un promotor de *C9orf72* endógeno. Dicha modificación permite la expresión de un gen indicador
- 60

impulsado por un promotor de *C9orf72* endógeno. Alternativamente, un gen indicador no se ubica en unión operativa con un promotor de *C9orf72* endógeno.

Puede usarse una variedad de genes indicadores (o restos detectables) en vectores de direccionamiento descritos en la presente descripción. Los genes indicadores ilustrativos incluyen, por ejemplo, β -galactosidasa (codificada por el gen *lacZ*), proteína fluorescente verde (GFP), proteína fluorescente verde mejorada (eGFP), MmGFP, proteína fluorescente azul (BFP), proteína fluorescente azul mejorada (eBFP), mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, DsRed, mOrange, mKO, mCitrine, Venus, YPet, proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente amarilla mejorada (eYFP), Emerald, CyPet, proteína fluorescente cian (CFP), Cerulean, T-Sapphire, luciferasa, fosfatasa alcalina, o una combinación de estos. Los métodos descritos en la presente descripción demuestran la construcción de vectores de direccionamiento que emplean el uso de un gen indicador *lacZ* que codifica la β -galactosidasa, sin embargo, los expertos, al leer esta descripción, comprenderán que los animales no humanos descritos en la presente descripción pueden generarse en ausencia de un gen indicador o con cualquier gen indicador conocido en la técnica.

Cuando sea adecuado, la región codificante del material genético o secuencia(s) de polinucleótido(s) que codifica(n) un polipéptido indicador, en su totalidad o en parte, pueden modificarse de manera que incluyan codones optimizados para la expresión en el animal no humano (por ejemplo, ver las patentes de Estados Unidos núms. 5,670,356 y 5,874,304). Las secuencias con optimización de codones 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) codificado por el polinucleótido original sin optimización de codones. 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 para un tipo de célula particular (por ejemplo, una célula de roedor). Por ejemplo, los codones del gen indicador que se insertarán en el genoma de un animal no humano (por ejemplo, un roedor) pueden optimizarse para la expresión en una célula del animal no humano. Una secuencia de este tipo puede describirse como una secuencia con optimización de codones.

Se proporcionan composiciones y métodos para crear animales no humanos que comprenden una interrupción en un locus *C9ORF72* como se describe en la presente descripción, lo que incluye composiciones y métodos para crear animales no humanos que expresan un gen indicador a partir de un promotor de *C9ORF72* y una secuencia reguladora de *C9ORF72*. En algunas modalidades se proporcionan, además, composiciones y métodos para crear animales no humanos que expresan un gen indicador a partir de un promotor endógeno y una secuencia reguladora endógena. Los métodos incluyen insertar un vector de direccionamiento, como se describe en la presente descripción, que codifica un gen indicador (por ejemplo, *lacZ*) en el genoma de un animal no humano de manera que toda la secuencia de codificación de un locus *C9ORF72* se elimina, en su totalidad o en parte. En algunas modalidades, los métodos incluyen insertar un vector de direccionamiento en el genoma de un animal no humano de manera que toda la secuencia codificante para todas las isoformas de *C9ORF72* en un locus *C9ORF72* se eliminan.

La inserción de un gen indicador unido operativamente a un promotor de *C9ORF72* (por ejemplo, un promotor de *C9ORF72* endógeno) emplea una modificación relativamente mínima del genoma y resulta en la expresión del polipéptido indicador de una manera específica de *C9ORF72* en el animal no humano. En algunas modalidades, un animal no humano descrito en la presente descripción comprende un locus *C9ORF72* que comprende un vector de direccionamiento como se describe en la presente descripción.

Los vectores de direccionamiento descritos en la presente descripción pueden introducirse en células ES y tamizarse para determinar clones de ES que alberguen una interrupción en un locus *C9orf72* como se describe en Frendewey, D., y otros, 2010, *Methods Enzymol.* 476:295-307. Puede emplearse una variedad de embriones huésped en los métodos y composiciones descritos en la presente descripción. Por ejemplo, las células pluripotentes y/o totipotentes que tienen la modificación genética objetivo pueden introducirse en un embrión en etapa de premórula (por ejemplo, un embrión en la etapa de 8 células) de un organismo correspondiente. Ver, *por ejemplo*, los documentos US 7,576,259, US 7,659,442, US 7,294,754 y US 2008/0078000 A1. En otros casos, las células ES donantes 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. El embrión huésped puede ser, además, un blastocito o puede ser un embrión preblastocito, un embrión en etapa de premórula, un embrión en etapa de mórula, un embrión en etapa de mórula no compactado o un embrión en etapa de mórula compactada.

En algunas modalidades, puede aplicarse el método VELOCIMOUSE® (Poueymirou, W.T. y otros, 2007, *Nat. Biotechnol.* 25:91-99) para inyectar células ES positivas en un embrión de 8 células para generar ratones heterocigotos de generación F0 completamente derivados de células ES listos para perfilar la expresión de *lacZ* o reproducirse hasta la homocigotidad. Métodos ilustrativos para generar animales no humanos que tienen una interrupción en un locus *C9orf72* se proporcionan en el Ejemplo 1.

Los métodos para generar animales transgénicos no humanos, lo que incluye animales con anulación de genes y con inserción de genes, se conocen bien en la técnica (ver, por ejemplo, *Gene Targeting: A Practical Approach*, Joyner, ed., Oxford University Press, Inc. (2000)). Por ejemplo, la generación de roedores transgénicos puede involucrar, opcionalmente, la interrupción del loci genético de uno o más genes endógenos de roedor y la introducción de un gen indicador en el genoma del roedor, en algunas modalidades, en la misma localización que el gen endógeno de roedor.

Una ilustración esquemática (no a escala) de la organización genómica de un *C9orf72* de ratón se proporciona en la Figura 1A. Además, se proporciona en la Figura 1A una estrategia de direccionamiento ilustrativa para la delección de toda la secuencia codificante de un locus *C9orf72* murino mediante el uso de un gen indicador. Como se ilustra, el ADN genómico que contiene la porción codificante del exón 2 hasta la porción codificante del exón 11 de un locus *C9orf72* murino se elimina y se reemplaza con un gen indicador y un casete de selección de fármaco flanqueado por sitios de reconocimiento de recombinasas específicas de sitio. El vector de direccionamiento usado en esta estrategia incluye una secuencia codificante de recombinasa que se une operativamente a un promotor que se regula por el desarrollo de manera que la recombinasa se expresa en células indiferenciadas. Los promotores ilustrativos que pueden incluirse en los vectores de direccionamiento descritos en la presente descripción se proporcionan en la Tabla 2. Los promotores adecuados adicionales que pueden usarse en los vectores de direccionamiento descritos en la presente descripción incluyen aquellos descritos en las patentes de Estados Unidos núms. 8,697,851, 8,518,392 y 8,354,389). Tras la recombinación homóloga, toda la secuencia codificante (por ejemplo, la porción codificante del exón 2 hasta la porción codificante del exón 11) de un locus *C9orf72* murino endógeno se reemplaza por la secuencia contenida en el vector de direccionamiento. El casete de selección de 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 el locus *C9orf72*, descrito anteriormente, liberarán el marcador seleccionable de las células diferenciadas durante el desarrollo (ver las patentes de Estados Unidos núms. 8,697,851, 8,518,392 y 8,354,389).

TABLA 2

Promotor prot (SEQ ID NO:5)

CCAGTAGCAGCACCCACGTCCACCTTCTGTCTAGTAATGTCCAACACCTCCCT
CAGTCCAAACACTGCTCTGCATCCATGTGGCTCCCATTTATACCTGAAGCACT
TGATGGGGCCTCAATGTTTTACTAGAGCCACCCCCCTGCAACTCTGAGACC
CTCTGGATTTGTCTGTCTCAGTGCCTCACTGGGGCGTTGGATAATTTCTTAAAG
GTCAAGTTCCCTCAGCAGCATTCTCTGAGCAGTCTGAAGATGTGTGCTTTTCA
CAGTTCAAATCCATGTGGCTGTTTCACCCACCTGCCTGGCCTTGGGTTATCTA

TCAGGACCTAGCCTAGAAGCAGGTGTGTGGCACTTAACACCTAAGCTGAGTG
 ACTAACTGAACACTCAAGTGGATGCCATCTTTGTCACCTTCTTGACTGTGACAC
 AAGCAACTCCTGATGCCAAAGCCCTGCCACCCCTCTCATGCCCATATTTGG
 ACATGGTACAGGTCCTCACTGGCCATGGTCTGTGAGGTCCTGGTCCTCTTTGA
 CTTCATAATTCCTAGGGGCCACTAGTATCTATAAGAGGAAGAGGGGTGCTGGC
 TCCCAGGCCACAGCCCACAAAATTCCACCTGCTCACAGGTTGGCTGGCTCGA
 CCCAGGTGGTGTCCCCTGCTCTGAGCCAGCTCCCGGCCAAGCCAGCACC

Promotor Blimp1 1kb (SEQ ID NO:6)

TGCCATCATCACAGGATGTCCTTCTCTCCAGAAGACAGACTGGGGCTGAA
 GGAAAAGCCGGCCAGGCTCAGAACGAGCCCCACTAATTACTGCCTCCAACA
 GCTTTCCTCACTCACTGCCCCCAGCCCAACATCCCCCTTTTAACTGGGAAGCATT
 CCTACTCTCCATTGTACGCACACGCTCGGAAGCCTGGCTGTGGGTTTGGGCA
 TGAGAGGCAGGGACAACAAAACCAGTATATATGATTATAACTTTTTCTGT
 TCCCTATTTCCAAATGGTCGAAAGGAGGAAGTTAGGTCTACCTAAGCTGAAT
 GTATTCAGTTAGCAGGAGAAATGAAATCCTATACGTTTAATACTAGAGGAGA
 ACCGCCTTAGAATATTTATTTCAATTGGCAATGACTCCAGGACTACACAGCGA
 AATTGTATTGCATGTGCTGCCAAAATACTTTAGCTCTTTCCTTCGAAGTACGT
 CGGATCCTGTAATTGAGACACCGAGTTTAGGTGACTAGGGTTTTCTTTTGAG
 GAGGAGTCCCCCACCCTGCCCCGCTCTGCCGCGACAGGAAGCTAGCGATCCG
 GAGGACTTAGAATAACAATCGTAGTGTGGGTAAACATGGAGGGCAAGCGCCT
 GCAAAGGGAAGTAAGAAGATTCCAGTCCTTGTGAAATCCATTTGCAAACA
 GAGGAAGCTGCCGCGGGTCGCACTCGGTGGGGGGAAGCCCTGAACCCACG
 CTGCACGGCTGGGCTGGCCAGGTGCGGCCACGCCCCCATCGCGGCGGCTGGT
 AGGAGTGAATCAGACCGTCAGTATTGGTAAAGAAGTCTGCGGCAGGGCAGG
 GAGGGGGAAGAGTAGTCAGTCGCTCGCTCACTCGCTCGCTCGCACAGACACT
 GCTGCAGTGACACTCGGCCCTCCAGTGTGCGGGAGACGCAAGAGCAGCGCG
 CAGCACCTGTCCGCCCGGAGCGAGCCCGGCCCGCGGCCGTAGAAAAGGAGG
 GACCGCCGAGGTGCGCGTCAGTACTGCTCAGCCCGGCAGGGACGCGGGAGG
 ATGTGGACTGGGTGGAC

Promotor Blimp1 2kb (SEQ ID NO:7)

GTGGTGCTGACTCAGCATCGGTTAATAAACCCCTCTGCAGGAGGCTGGATTTC
 TTTTGTTTAATTATCACTTGGACCTTTCTGAGAACTCTTAAGAATTGTTTATTC
 GGGTTTTTTTTGTTTTGTTTTGGTTTTGGTTTTTTTTGGGTTTTTTTTTTTTTTTT
 TTTGGTTTTTTGGAGACAGGGTTTCTCTGTATATAGCCCTGGCACAAGAGCAA
 GCTAACAGCCTGTTTCTTCTTGGTGCTAGCGCCCCCTCTGGCAGAAAATGAA
 ATAACAGGTGGACCTACAACCCCCCCCCCCCCCCCCCAGTGTATTCTACTCTTG
 TCCCCGGTATAAATTTGATTGTTCCGAACCTACATAAATTGTAGAAGGATTTTT
 TAGATGCACATATCATTTTTCTGTGATACCTTCCACACACCCCTCCCCCCCCAAA
 AAAATTTTTCTGGGAAAGTTTCTTGAAAGGAAAACAGAAGAACAAGCCTGTC
 TTTATGATTGAGTTGGGCTTTTGTGTTTGCTGTGTTTCATTTCTTCTGTAAACA
 AATACTCAAATGTCCACTTCATGTATGACTAAGTTGGTATCATTAGGTTGGG
 TCIGGGTGTGTGAATGTGGGTGTGGATCTGGAATGTGGGTGGGTGTGTATGCC
 CCGTGTGTTTAGAATACTAGAAAAGATAACCACATCGTAAACTTTTGGGAGAG
 ATGATTTTTAAAAATGGGGGTGGGGGTGAGGGGAACCTGCGATGAGGCAAG
 CAAGATAAGGGGAAGACTTGAGTTTCTGTGATCTAAAAAGTCGCTGTGATGG
 GATGCTGGCTATAAATGGGCCCTTAGCAGCATTGTTTCTGTGAATTGGAGGA
 TCCCTGCTGAAGGCAAAAGACCATTGAAGGAAGTACCGCATCTGGTTTGT

TGTAATGAGAAGCAGGAATGCAAGGTCCACGCTCTTAATAATAAAACAAACA
 GGACATTGTATGCCATCATCACAGGATGTCTTCTTCTCCAGAAGACAGAC
 TGGGGCTGAAGGAAAAGCCGGCCAGGCTCAGAACGAGCCCCACTAATTACT
 GCCTCCAACAGCTTTTCCACTCACTGCCCCAGCCCAACATCCCCTTTTTAACT
 GGAAGCATTCTACTCTCCATTGTACGCACACGCTCGGAAGCCTGGCTGTG
 GGTGTTGGGCATGAGAGGCAGGGACAACAAAACCAGTATATATGATTATAAC
 TTTTTCCTGTTTCCCTATTTCCAAATGGTTCGAAAGGAGGAAGTTAGGTCTACC
 TAAGCTGAATGTATTAGTTAGCAGGAGAAATGAAATCCTATACGTTTAATA
 CTAGAGGAGAACCGCCTTAGAATATTTATTTTATTGGCAATGACTCCAGGAC
 TACACAGCGAAATTGTATTGCATGTGCTGCCAAAATACTTTAGCTCTTTCCTT
 CGAAGTACGTGGATCCTGTAATTGAGACACCGAGTTTAGGTGACTAGGGTT
 TTCTTTTGAGGAGGAGTCCCCCACCCCGCCCGCTCTGCCGCGACAGGAAGC
 TAGCGATCCGGAGGACTTAGAATACAATCGTAGTGTGGGTAAACATGGAGG
 GCAAGCGCCTGCAAAGGGAAGTAAGAAGATTCCCAGTCCTTGTTGAAATCCA
 TTTGCAAACAGAGGAAGCTGCCGCGGGTTCGCAGTCGGTGGGGGGAAGCCCT
 GAACCCACGCTGCACGGCTGGGCTGGCCAGGTGCGGCCACGCCCCCATCGC
 GGCGGCTGGTAGGAGTGAATCAGACCGTCAGTATTGGTAAAGAAGTCTGCG
 GCAGGGCAGGGAGGGGGAAGAGTAGTCAGTCGCTCGCTCACTCGCTCGCTC
 GCACAGACACTGCTGCAGTGACACTCGGCCCTCCAGTGTCGCGGAGACGCAA
 GAGCAGCGCGCAGCACCTGTCCGCCCCGAGCGAGCCCCGGCCCCGCGGCCGTA
 GAAAAGGAGGGACCGCCGAGGTGCGCGTCAGTACTGCTCAGCCCCGGCAGGG
 ACGCGGGAGGATGTGGACTGGGTGGAC

5 Puede identificarse un animal no humano fundador transgénico en función de la presencia de un gen indicador (o ausencia de *C9ORF72*) en su genoma y/o la expresión de un indicador en tejidos o células del animal no humano (o la falta de expresión de *C9ORF72*). Un animal no humano transgénico fundador puede usarse después para reproducir animales no humanos transgénicos adicionales que portan el gen indicador, de esta manera se crean una serie de animales no humanos que cada uno es portador de una o más copias de un locus *C9ORF72* como se describe en la presente descripción.

10 Los animales no humanos transgénicos pueden producirse, además, para contener sistemas seleccionados que permitan la regulación o la expresión directa del transgén. Los sistemas ilustrativos incluyen el sistema de la recombinasa Cre/*loxP* del bacteriófago P1 (ver, por ejemplo, Lakso, M. y otros, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89:6232-6236) y el sistema de la recombinasa FLP/Frt de *S. cerevisiae* (O'Gorman, S. y otros, 1991, Science 251:1351-1355). Dichos animales pueden proporcionarse mediante la construcción de animales "doble" transgénicos, por ejemplo, mediante el apareamiento de dos animales transgénicos, uno que contiene un transgén que comprende un polipéptido seleccionado (por ejemplo, un gen indicador) y el otro que contiene un transgén que codifica una recombinasa (por ejemplo, una recombinasa Cre).

20 Aunque modalidades que emplean una interrupción en un locus *C9ORF72* en un ratón (es decir, un ratón con la delección de toda la secuencia codificante de *C9orf72*) se analizan ampliamente en la presente descripción, también se proporcionan otros animales no humanos que comprenden una interrupción en un locus *C9ORF72*. En algunas modalidades, dichos animales no humanos comprenden una interrupción en un locus *C9ORF72* caracterizada por la inserción de un indicador unido operativamente a un promotor de *C9ORF72* endógeno. Dichos animales no humanos incluyen cualquiera de aquellos que pueden modificarse genéticamente para eliminar toda la secuencia codificante de un locus *C9ORF72* como se describe en la presente descripción, lo que incluye, por ejemplo, mamíferos, por ejemplo, ratón, rata, conejo, cerdo, bovino (por ejemplo, vaca, toro, búfalo), ciervo, oveja, cabra, pollo, gato, perro, hurón, primates (por ejemplo, mono títí, mono Rhesus), etcétera. Por ejemplo, para los animales no humanos donde las células ES genéticamente modificables adecuadas no están fácilmente disponibles, pueden emplearse otros métodos para producir un animal no humano que comprende la modificación genética. Dichos 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 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.

30 Brevemente, los métodos para la transferencia nuclear incluyen las etapas de: (1) enuclear un ovocito; (2) aislar una célula o núcleo donante para combinarse con el ovocito enucleado; (3) insertar la célula o núcleo en el ovocito enucleado para formar una célula reconstituida; (4) implantar la célula reconstituida en el útero de un animal para formar un embrión; y (5)

5 permitir que se desarrolle el embrión. En dichos métodos, los ovocitos se recuperan generalmente de animales fallecidos, aunque pueden aislarse, además, de oviductos y/u ovarios de animales vivos. Los ovocitos pueden madurarse en una
 10 variedad de medios conocidos por los expertos en la técnica antes de la enucleación. La enucleación del ovocito puede realizarse de varias maneras conocidas por los expertos en la técnica. La inserción de una célula o núcleo donante en un
 15 ovocito enucleado para formar una célula reconstituida se logra típicamente mediante la microinyección de una célula donante debajo de la zona pelúcida antes de la fusión. La fusión puede inducirse por la aplicación de un pulso eléctrico de DC a través del plano de contacto/fusión (electrofusión), por la exposición de las células a sustancias químicas que
 20 promueven la fusión, tales como el 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
 25 donante nuclear y el ovocito receptor. Los métodos de activación incluyen pulsos eléctricos, choques inducidos químicamente, penetración de espermatozoides, aumento de los niveles de cationes divalentes en el ovocito y reducción de la fosforilación de proteínas celulares (como por medio de inhibidores de la cinasa) en el ovocito. Las células reconstituidas activadas, o los embriones, se cultivan típicamente en un medio conocido por los expertos en la técnica y después se
 30 transfieren al útero de un animal. Ver, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2008-0092249 A1, el documento WO 1999/005266 A2, la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. 2004-0177390 A1, el documento WO 2008/017234 A1 y la Patente de Estados Unidos Núm. 7,612,250.

Los métodos para modificar el genoma de un animal no humano (por ejemplo, un cerdo, vaca, roedor, pollo, etcétera) incluyen, por ejemplo, emplear una nucleasa de dedos de zinc (ZFN) o una nucleasa efectora similar a activador de la
 20 transcripción (TALEN) para modificar un genoma para incluir una interrupción en un locus *C9ORF72* como se describe en la presente descripción.

En algunas modalidades, un animal no humano descrito en la presente descripción es un mamífero. En algunas modalidades, un animal no humano descrito en la presente descripción, es un mamífero pequeño, por ejemplo, de la
 25 superfamilia Dipodoidea o Muroidea. En algunas modalidades, un animal modificado genéticamente descrito en la presente descripción es un roedor. En algunas modalidades, un roedor descrito en la presente descripción se selecciona de un ratón, una rata y un hámster. En algunas modalidades, un roedor descrito en la presente descripción se selecciona de la superfamilia Muroidea. En algunas modalidades, un animal modificado genéticamente descrito en la presente
 30 descripción es de una familia seleccionada de Calomyscidae (por ejemplo, hámsteres similares a ratón), Cricetidae (por ejemplo, hámster, ratas y ratones del Nuevo Mundo, ratones campestres), Muridae (ratones y ratas verdaderos, jerbos, ratones espinosos, ratas crestadas), Nesomyidae (ratones trepadores, ratones de roca, ratas coliblanco, ratas y ratones de Madagascar), Platacanthomyidae (por ejemplo, lirones espinosos), y Spalacidae (por ejemplo, ratas topo, ratas de bambú, y zokor). En algunas modalidades determinadas, un roedor modificado genéticamente descrito en la presente
 35 descripción se selecciona de un ratón o rata verdaderos (familia Muridae), un jerbo, un ratón espinoso, y una rata crestada. En algunas modalidades determinadas, un ratón modificado genéticamente descrito en la presente descripción es un miembro de la familia Muridae. En algunas modalidades, un animal no humano descrito en la presente descripción es un roedor. En algunas modalidades determinadas, un roedor descrito en la presente descripción se selecciona de un ratón y una rata. En algunas modalidades, un animal no humano descrito en la presente descripción es un ratón.

40 En algunas modalidades, un animal no humano descrito en la presente descripción es un roedor que 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/O1a. En algunas modalidades determinadas, un ratón descrito 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 (ver, 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
 45 ratón modificado genéticamente descrito 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 descrito 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, una cepa 129 de la mezcla como se describe en la presente descripción es una cepa 129S6 (129/SvEvTac). En algunas modalidades, un ratón descrito en la presente
 50 descripción es una cepa BALB, por ejemplo, la cepa BALB/c. En algunas modalidades, un ratón descrito en la presente descripción es una mezcla de una cepa BALB y otra cepa mencionada anteriormente.

55 En algunas modalidades, un animal no humano descrito en la presente descripción es una rata. En algunas modalidades determinadas, una rata descrita en la presente descripción se selecciona de una rata Wistar, una cepa LEA, una cepa Sprague Dawley, una cepa Fischer, F344, F6, 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 seleccionadas del grupo que consiste en Wistar, LEA, Sprague Dawley, Fischer, F344, F6, y Dark Agouti.

60 Una célula pluripotente y/o totipotente de rata puede ser de cualquier cepa de rata, lo 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 pueden obtenerse, además, a partir de cepas derivadas de una mezcla de dos o más cepas mencionadas anteriormente. Por ejemplo, la célula pluripotente y/o totipotente de rata puede ser de una cepa DA o una cepa ACI. La
 65 cepa de rata ACI se caracteriza por tener agutí negro, con patas y vientre blanco y un haplotipo *RT1^{av1}*. Tales cepas están

disponibles a partir de una diversidad de fuentes que incluyen los laboratorios Harlan. Un ejemplo de una línea celular ES de rata de una rata ACI es una línea celular ES ACI.G1 de rata. La cepa de rata Dark Agouti (DA) se caracteriza por tener un pelaje agutí y un haplotipo *RT1^{av1}*. Tales ratas están disponibles a partir de una diversidad de fuentes que incluyen los laboratorios Charles River y Harlan. Los ejemplos de una línea celular ES de rata a partir de una rata DA son la línea celular ES de rata DA.2B y la línea celular ES de rata DA.2C. En algunos casos, las células pluripotentes y/o totipotentes de ratas son de una cepa de rata endogámica. Ver, por ejemplo, el documento US 2014/0235933 A1, presentado el 20 de febrero de 2014.

Se proporcionan animales no humanos que comprenden una interrupción en un locus *C9ORF72*. En algunas modalidades, una interrupción en un locus *C9ORF72* 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 *C9ORF72* y/o una disminución o falta de actividad/función de *C9ORF72*. En algunas modalidades, las mutaciones de pérdida de función resultan en uno o más fenotipos como se describe en la presente descripción. La expresión de *C9ORF72* puede medirse directamente, por ejemplo, al analizar el nivel de *C9ORF72* en una célula o tejido de un animal no humano como se describe en la presente descripción.

Típicamente, el nivel de expresión y/o actividad de *C9ORF72* disminuye si la expresión y/o nivel de actividad de *C9ORF72* es estadísticamente menor ($p \leq 0,05$) que el nivel de *C9ORF72* en una célula control apropiada o un animal no humano que no comprende la misma interrupción (por ejemplo, delección). En algunas modalidades, la concentración y/o actividad de *C9ORF72* se reduce en al menos 1 %, 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o más con relación a una célula control o un animal no humano que carece de la misma interrupción (por ejemplo, delección).

En otras modalidades, las células u organismos que tienen una interrupción en un locus *C9ORF72* que reduce el nivel de expresión y/o la actividad de *C9ORF72* 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. Dichas células o animales no humanos se emplean después en los diversos métodos y composiciones descritos en la presente descripción.

En algunos ejemplos, un locus *C9ORF72* endógeno no se elimina (es decir, está intacto). En algunas modalidades, un locus *C9ORF72* endógeno se altera, se interrumpe, se elimina o se reemplaza con una secuencia heteróloga (por ejemplo, una secuencia codificante del gen indicador). En algunas modalidades, todo o sustancialmente todo el locus *C9ORF72* endógeno se reemplaza con un inserto de ácido nucleico; en algunas modalidades determinadas, el reemplazo incluye el reemplazo de toda la secuencia codificante de un locus *C9ORF72* endógeno con un gen indicador *lacZ* de manera que el gen indicador *lacZ* se une operativamente con un promotor de *C9ORF72* (por ejemplo, un promotor de *C9ORF72* endógeno). En algunas modalidades, una porción de un gen indicador (por ejemplo, un fragmento de función de este) se inserta en un locus *C9ORF72* no humano endógeno. En algunas modalidades, el gen indicador es un gen *lacZ*. En algunas modalidades, un gen indicador se inserta en una de las dos copias del locus *C9ORF72* endógeno, lo que da lugar a un animal no humano que es heterocigoto con respecto al gen indicador. En otras modalidades, se proporciona un animal no humano que es homocigoto para un gen indicador.

Métodos que emplean animales no humanos que tienen una interrupción en un locus *C9ORF72*

Los animales no humanos como se describe en la presente descripción proporcionan modelos animales mejorados para enfermedades, trastornos y afecciones neurodegenerativas. En particular, los animales no humanos como se describe en la presente descripción proporcionan modelos animales mejorados que se traducen en enfermedades humanas tales como, por ejemplo, ALS y/o FTD, caracterizadas por síntomas de las neuronas motoras superiores y/o pérdida de las neuronas no motoras.

Por ejemplo, una interrupción en un locus *C9ORF72* como se describe en la presente descripción puede resultar en diversos síntomas (o fenotipos) en los animales no humanos proporcionados en la presente descripción. En algunas modalidades, la eliminación de un locus *C9ORF72* resulta en animales no humanos que son totalmente normales al nacer, pero que desarrollan síntomas similares a la ALS 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, etcétera. En algunas modalidades, la eliminación de un locus *C9ORF72* resulta en funciones anormales de uno o más tipos de células, por ejemplo, una neurona y/o una porción de esta. Una neurona incluye una neurona sensorial o una neurona motora. Otros fenotipos asociados con la ALS y/o la FTD pueden presentarse en animales no humanos descritos en la presente descripción. Por ejemplo, un fenotipo similar a la ALS puede implicar el deterioro de una o más neuronas, por ejemplo, neuronas motoras y/o neuronas sensoriales. Además, un fenotipo similar a la ALS que implique a las neuronas motoras superiores puede provocar espasticidad (por ejemplo, parálisis espástica, rigidez), reflejos aumentados y/o anormales (por ejemplo, signo de Babinski), temblores y una combinación de estos. Un fenotipo similar a la ALS que implique el deterioro de las neuronas motoras inferiores puede provocar debilidad y desgaste muscular, fasciculaciones y una combinación de estos, y/o deterioro del bulbar lo que resulta en una incapacidad para tragar y fasciculaciones de la lengua.

Un síntoma similar a la ALS puede comprender, además, uno o más de los siguientes fenotipos: a) cifosis; b) espasmo de las extremidades posteriores, arrastre o curvatura de los dedos; c) deficiencia en la coordinación motora y la capacidad de aprendizaje motor, deficiencia en pruebas de rotarod, pasarela y/o de campo abierto; d) pérdida de neuronas motoras en la médula espinal; e) astrocitosis en la médula espinal; f) pérdida de peso en comparación con un roedor control; g) acumulación de proteínas poliubiquitinadas y/o (h) aumento de la puntuación neurológica mediante el uso del sistema de puntuación neurológica ALS-TDI (Tabla 3).

Tabla 3.

Sistema de puntuación neurológica ALS-TDI	
Puntuación de 0:	Extensión completa de las patas traseras lejos de la línea media lateral cuando el ratón se suspende por su cola, y el ratón puede sostener esto durante dos segundos, suspendido dos o tres veces.
Puntuación de 1:	Colapso o colapso parcial de la extensión de la pata hacia la línea media lateral (debilidad) o temblor de las patas traseras durante la suspensión por la cola.
Puntuación de 2:	Los dedos de los pies se curvan al menos dos veces al caminar 12 pulgadas, o cualquier parte del pie se arrastra a lo largo de la mesa/fondo de la jaula.
Puntuación de 3:	Parálisis rígida o movimiento articular mínimo, el pie no se usa para generar movimiento hacia adelante.
Puntuación de 4:	El ratón no puede enderezarse dentro de los 30 segundos posteriores a su colocación sobre cualquier lado.

Por lo tanto, en al menos algunas modalidades, los animales no humanos descritos en la presente descripción proporcionan modelos animales mejorados para enfermedades, trastornos o afecciones neurodegenerativas (por ejemplo, ALS y/o FTD) y pueden usarse para el desarrollo y/o identificación de agentes terapéuticos para el tratamiento, prevención y/o inhibición de uno o más fenotipos (o síntomas) de enfermedades, trastornos o afecciones neurodegenerativas. En algunas modalidades, uno o más síntomas (o fenotipos) en animales no humanos descritos en la presente descripción aparecen en la Tabla 3.

Los animales no humanos como se describen en la presente descripción proporcionan, además, un sistema *in vivo* para identificar un agente terapéutico para tratar, prevenir y/o inhibir uno o más síntomas de enfermedades, trastornos o afecciones neurodegenerativas (por ejemplo, ALS y/o FTD). En algunas modalidades, se determina un efecto inhibitorio de un agente terapéutico *in vivo*, mediante la administración de dicho agente terapéutico a un animal no humano que tiene una interrupción en *C9ORF72* como se describe en la presente descripción, y desarrolla síntomas neurodegenerativos después de las 38 semanas de edad.

Los animales no humanos como se describe en la presente descripción proporcionan, además, modelos animales mejorados para enfermedades, trastornos y afecciones inflamatorias o autoinmunitarias. En particular, los animales no humanos como se describe en la presente descripción proporcionan modelos animales mejorados que se traducen en una enfermedad inflamatoria humana caracterizada por la infiltración de células inmunitarias en diversos órganos (por ejemplo, riñón, hígado, bazo, etcétera). Además, los animales no humanos como se describe en la presente descripción proporcionan modelos animales mejorados que se traducen en una enfermedad autoinmunitaria humana caracterizada por el aumento de la presencia de autoanticuerpos (por ejemplo, IgG e IgM) en el suero.

Por ejemplo, una interrupción en un locus *C9ORF72* como se describe en la presente descripción puede resultar en diversas condiciones (o fenotipos) en los animales no humanos proporcionados en la presente descripción. En algunas modalidades, la eliminación de un locus *C9ORF72* resulta en animales no humanos que son totalmente normales al nacer, pero que desarrollan afecciones inflamatorias y/o autoinmunitarias 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 eliminación de un locus *C9ORF72* resulta en una infiltración de uno o más tipos de células inmunitarias, por ejemplo, células plasmáticas, monocitos, granulocitos y/o macrófagos. Otros fenotipos asociados con una afección inflamatoria y/o autoinmunitaria pueden presentarse en animales no humanos descritos en la presente descripción. Por ejemplo, una afección inflamatoria o autoinmunitaria puede implicar el agrandamiento de uno o más de bazo, ganglios linfáticos, riñones y/o hígado. Además, una afección inflamatoria o autoinmunitaria que involucre la sangre puede resultar en un aumento de la presencia de autoanticuerpos. Una afección inflamatoria o autoinmunitaria que afecte al hígado puede provocar hepatitis.

- Por lo tanto, en al menos algunas modalidades, los animales no humanos como se describe en la presente descripción proporcionan modelos animales mejorados para enfermedades, trastornos o afecciones inflamatorias y/o autoinmunitarias y pueden usarse para el desarrollo y/o identificación de agentes terapéuticos para el tratamiento, prevención y/o inhibición de uno o más fenotipos (o síntomas) de una enfermedad, trastorno o afección inflamatoria y/o autoinmunitaria. En algunas modalidades, una enfermedad, trastorno o afección inflamatoria y/o autoinmunitaria se presenta en uno o más órganos o tejidos de un animal no humano descrito en la presente descripción. En algunas modalidades determinadas, uno o más órganos o tejidos incluyen bazo, hígado, ganglios linfáticos, riñón, médula ósea y sangre.
- Los animales no humanos como se describe en la presente descripción proporcionan, además, un sistema *in vivo* para identificar un agente terapéutico para tratar, prevenir y/o inhibir uno o más síntomas de una enfermedad, trastorno o afección inflamatoria y/o autoinmunitaria. En algunas modalidades, se determina un efecto inhibitorio de un agente terapéutico *in vivo*, mediante la administración de dicho agente terapéutico a un animal no humano que tiene una interrupción en C9ORF72 como se describe en la presente descripción, y desarrolla una enfermedad, trastorno o afección inflamatoria y/o autoinmunitaria después de las 8 semanas de edad. En diversas modalidades, una enfermedad, trastorno o afección inflamatoria y/o autoinmunitaria es o comprende glomerulonefritis o hepatitis.
- A los animales no humanos puede administrárseles un agente terapéutico para probarlo por cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante inyección sistémica, bombas para exposición a largo plazo o inyección intracerebral directa. Dichos animales pueden incluirse en un estudio de comportamiento, para determinar el efecto del agente terapéutico en el comportamiento, por ejemplo, el comportamiento motor, de los animales no humanos en comparación con los animales no humanos control apropiados que no recibieron el agente terapéutico. Además, puede realizarse una biopsia o una evaluación anatómica de la médula espinal, el músculo y/o el tejido cerebral del animal, y/o puede recolectarse una muestra de sangre o CSP.
- Los animales no humanos 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 C9ORF72 que son útiles para una variedad de ensayos. En diversas modalidades, los animales no humanos descritos en la presente descripción se usan para desarrollar terapias que tratan, previenen y/o inhiben uno o más síntomas asociados con la falta de expresión y/o actividad de C9ORF72. En diversas modalidades, los animales no humanos en la presente descripción se usan para identificar, tamizar y/o desarrollar agentes terapéuticos candidatos (por ejemplo, anticuerpos, ARNip, etcétera) que se unen a C9ORF72. En diversas modalidades, los animales no humanos como se describe en la presente descripción, se usan para seleccionar y desarrollar agentes terapéuticos candidatos (por ejemplo, anticuerpos, ARNip, etcétera) que bloquean la actividad de C9ORF72. En diversas modalidades, los animales no humanos descritos en la presente descripción se usan para determinar el perfil de unión de antagonistas y/o agonistas de un polipéptido (o transcripto) de C9ORF72 de un animal no humano como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades, los animales no humanos descritos en la presente descripción se usan para determinar el epítipo o epítopos de uno o más anticuerpos terapéuticos candidatos que se unen a C9ORF72.
- En diversas modalidades, los animales no humanos descritos en la presente descripción, se usan para determinar los perfiles farmacocinéticos de un fármaco dirigido a C9ORF72. En diversas modalidades, uno o más animales no humanos descritos en la presente descripción y uno o más animales no humanos de control o de referencia se exponen cada uno a uno o más fármacos candidatos dirigidos a C9ORF72 a 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/kg, 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 anticuerpos terapéuticos candidatos pueden dosificarse por medio de cualquier ruta de administración deseada que incluye las rutas de administración parenterales y no parenterales. Las rutas parenterales incluyen, por ejemplo, intravenosa, intraarterial, intraportal, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, intraespinal, intratecal, intracerebroventricular, intracraneal, intrapleural u otras rutas de inyección. Las rutas no parenterales incluyen, por ejemplo, oral, nasal, transdérmica, pulmonar, rectal, bucal, vaginal, ocular. La administración puede ser, además, por infusión continua, administración local, liberación sostenida a partir de implantes (geles, membranas o similares), y/o inyección intravenosa. La sangre se aísla de animales no humanos (humanizados y de control) en diversos puntos de tiempo (por ejemplo, 0 h, 6 h, 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). Diversos ensayos pueden realizarse para determinar los perfiles farmacocinéticos de los fármacos dirigidos a C9ORF72 administrados mediante el uso de muestras obtenidas a partir de animales no humanos como se describen en la presente descripción, lo que incluye, pero no se limita a, IgG total, respuesta contra el anticuerpo terapéutico, aglutinación, etcétera.
- En diversas modalidades, los animales no humanos como se describen en la presente descripción se usan para medir el efecto terapéutico de bloquear, modular y/o inhibir la actividad de C9ORF72 (o la señalización de C9ORF72 o las interacciones mediadas por C9ORF72) y el efecto sobre la expresión génica como resultado de los cambios celulares. En diversas modalidades, un animal no humano como se describe en la presente descripción o las células aisladas del mismo se exponen a un fármaco dirigido a C9ORF72 del animal no humano y, después de un período de tiempo posterior, se analizan para determinar los efectos sobre procesos (o interacciones) dependientes de C9ORF72, por ejemplo, tráfico endosómico, homeostasis inmunitaria o función de neuronas motoras y/o neuronas no motoras.
- Las células de los animales no humanos como se describen en la presente descripción, pueden aislarse y usarse con base a fines específicos, o pueden mantenerse en cultivo por muchas generaciones. En diversas modalidades, las células

de un animal no humano como se describen en la presente descripción se immortalizan (por ejemplo, por medio del uso de un virus) y se mantienen en cultivo indefinidamente (por ejemplo, en cultivos en serie).

- En diversas modalidades, las células y/o animales no humanos como se describen en la presente descripción se usan en diversos regímenes de inmunización para determinar las funciones mediadas por C9ORF72 en la respuesta inmunitaria a un antígeno (por ejemplo, una respuesta de células B). En algunas modalidades, los agentes terapéuticos candidatos que se unen, o bloquean una o más funciones de C9ORF72, se caracterizan en un animal no humano descrito en la presente descripción. Las mediciones adecuadas incluyen diversos ensayos celulares, ensayos de proliferación, análisis de inmunoglobulinas séricas (por ejemplo, titulación de anticuerpos), ensayos de citotoxicidad, caracterización de interacciones ligando-receptor (por ejemplo, ensayos de inmunoprecipitación) y caracterización de interacciones ligando-ligando. En algunas modalidades, los animales no humanos descritos en la presente descripción se usan para caracterizar las funciones mediadas por C9ORF72 que regulan una respuesta inmunitaria a un antígeno. En algunas modalidades, el antígeno se asocia con una enfermedad, trastorno o afección autoinmunitarios. En algunas modalidades, el antígeno se asocia con una enfermedad, trastorno o afección inflamatorios. En algunas modalidades, el antígeno se asocia con una enfermedad, trastorno o afección neurológicos. En algunas modalidades, el antígeno se asocia con un agente infeccioso (por ejemplo, una bacteria). En algunas modalidades, el antígeno es un antígeno de prueba (por ejemplo, ovoalbúmina u OVA). En algunas modalidades, el antígeno es un objetivo asociado con una enfermedad o afección que padecen uno o más pacientes humanos que necesitan tratamiento.
- En diversas modalidades, los animales no humanos como se describen en la presente descripción se usan para el desafío con uno o más antígenos para determinar el potencial terapéutico de compuestos o agentes biológicos para modular la regulación dependiente de C9ORF72 de una respuesta inmunitaria, lo que incluye, pero no se limita a, las respuestas dependientes de células B específicas a un antígeno dado.
- Los animales no humanos como se describen 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 candidato puede administrarse a uno o más animales no humanos descritos en la presente descripción, seguido del monitoreo de los animales no humanos para determinar una o más de la respuesta inmunitaria frente 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 una 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 animales no humanos.
- La eficacia de las vacunas puede determinarse en una diversidad de vías. Brevemente, los animales no humanos descritos en la presente descripción se vacunaron mediante el uso de métodos conocidos en la técnica y después se desafiaron con una vacuna, o se administró una vacuna a los animales no humanos ya infectados. La respuesta de un(os) animal(es) no humano(s) a una vacuna puede medirse mediante el control de, y/o la realización de uno o más ensayos en el(los) animal(es) no humano(s) (o células aisladas de estos) para determinar la eficacia de la vacuna. Después, la respuesta de un(os) animal(es) no humano(s) a la vacuna se compara después con los animales controles, mediante el uso de una o más mediciones conocidas en la técnica y/o descritas en la presente descripción.
- La eficacia de la vacuna puede determinarse, además, mediante ensayos de neutralización viral. Brevemente, los animales no humanos como se describe en la presente descripción se inmunizan y, diversos días posteriores a la inmunización se recolecta el suero. Diluciones seriadas del suero se incuban previamente con un virus durante un tiempo en el cual los anticuerpos del suero, que son específicos al virus, se unirán a estos. Después se añade la mezcla virus/suero a células permisivas para determinar la infectividad mediante un ensayo de placa o ensayo de microneutralización. Si los anticuerpos del suero neutralizan el virus, habrá menor cantidad de placas y menores unidades relativas de luciferasa en comparación con un grupo control.
- Los animales no humanos descritos en la presente descripción proporcionan un sistema *in vivo* para evaluar las propiedades farmacocinéticas y/o eficacia de un fármaco (por ejemplo, un fármaco dirigido a C9ORF72). En diversas modalidades, un fármaco puede suministrarse o administrarse a uno o más animales no humanos como se describen en la presente descripción, seguido del control de los animales no humanos (o células aisladas a partir de estos), o la realización de uno o más ensayos en éstos, para determinar el efecto del fármaco sobre el animal no humano. Las propiedades farmacocinéticas incluyen, pero no se limitan a, cómo un animal procesa el fármaco a diversos metabolitos (o detección de la presencia o ausencia de uno o más metabolitos del fármaco, lo que incluye, pero no se limita a, metabolitos tóxicos), tiempo de vida media del fármaco, niveles circulantes del fármaco después de su administración (por ejemplo, concentración sérica del fármaco), respuesta contra el fármaco (por ejemplo, anticuerpos contra el fármaco), absorción y distribución del fármaco, ruta de administración, rutas de excreción y/o eliminación del fármaco. En algunas modalidades, las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de los fármacos (por ejemplo, moduladores de C9ORF72) se monitorean en o mediante el uso de los animales no humanos 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 animal no humano al que se administra el fármaco. En algunas modalidades, la realización de un ensayo incluye determinar la variabilidad lote a lote de un fármaco (por ejemplo, un modulador de C9ORF72 tal como, por ejemplo, un antagonista o un agonista). En algunas modalidades, la realización de un ensayo incluye determinar las diferencias entre

los efectos de un fármaco administrado a un animal no humano descrito en la presente descripción y a un animal no humano de referencia. En diversas modalidades, los animales no humanos de referencia pueden tener una modificación como se describe en la presente descripción, una modificación que es diferente a como se describe en la presente descripción (por ejemplo, uno que tiene un locus *C9ORF72* alterado, interrumpido, eliminado, insertado, modificado, etcétera o de cualquier otra manera no funcional) o puede no tener modificaciones (es decir, un animal no humano de tipo silvestre).

Los parámetros ilustrativos que pueden medirse en animales no humanos (o en células aisladas a partir de estos y/o mediante el uso de éstas) 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 para el fármaco, metabolismo del fármaco, arreglos de expresión génica, actividad metabólica, actividad mitocondrial, estrés oxidativo, fagocitosis, biosíntesis de proteínas, degradación de proteínas, secreción de proteínas, respuesta al estrés, concentración del fármaco en el tejido objetivo, concentración del fármaco en tejido que no es objetivo, actividad transcripcional y similares. En diversas modalidades, los animales no humanos descritos en la presente descripción se usan para determinar una dosis eficaz farmacéuticamente de un fármaco (por ejemplo, un fármaco dirigido a *C9ORF72*).

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para describir a los expertos en la técnica cómo producir y usar métodos y composiciones de la invención, y no están destinados a 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 una interrupción en un locus *C9ORF72* no humano

Este ejemplo ilustra una interrupción dirigida en un locus *C9orf72* de un roedor. En particular, este ejemplo describe específicamente la delección de toda la secuencia codificante de un locus *C9orf72* de ratón mediante el uso de un constructo de indicador *lacZ* colocado en unión operativa con un promotor de *C9orf72* de ratón. El vector de direccionamiento *C9orf72-lacZ* para crear una interrupción en un locus *C9orf72* endógeno de ratón se hizo como se describió anteriormente (ver, por ejemplo, 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, Berlin Heidelberg, 2006). El locus *C9orf72* resultante modificado se representa en la Figura 1A, cuadro inferior.

Brevemente, se generó un vector de direccionamiento mediante el uso de clones de cromosomas artificiales bacterianos (BAC) de una biblioteca BAC RP23 de ratón (Adams, D.J. y otros, 2005, *Genomics* 86:753-758) y se introdujeron en células madre embrionarias (ES) híbridas F1 (129S6SvEvTac/C57BL6NTac) seguidas de cultivo en medio de selección que contiene G418. Las colonias resistentes a los fármacos se recogieron 10 días después de la electroporación y se tamizaron para determinar el direccionamiento correcto como se describió anteriormente (Valenzuela y otros, *supra*; Frendewey, D. y otros, 2010, *Methods Enzymol.* 476:295-307). Se usó el método VELOCIMOUSE® (DeChiara, T.M. y otros, 2010, *Methods Enzymol.* 476:285-294; DeChiara, T.M., 2009, *Methods Mol. Biol.* 530:311-324; Poueymirou y otros, 2007, *Nat. Biotechnol.* 25:91-99), en el que se inyectaron células ES dirigidas a embriones Swiss Webster en etapa de 8 células no compactadas, para producir ratones de generación F0 sanos totalmente derivados de células ES heterocigotos para la delección de *C9orf72*. Los machos heterocigotos de la generación F0 se cruzaron con hembras C57B16/NTac para generar heterocigotos F1 que se entrecruzaron para producir ratones de generación F2 *C9orf72*^{-/-}, *C9orf72*^{+/-} y de tipo silvestre para análisis fenotípicos. Se generó una segunda cohorte de ratones de generación N2F2 a través de fertilización *in vitro* (IVF) mediante el uso de espermatozoides heterocigotos F1 congelados y ovocitos de hembras donantes C57B16/NTac. La descendencia heterocigota N2F1 se entrecruzó para generar ratones N2F2 *C9orf72*^{-/-}, *C9orf72*^{+/-} y de tipo silvestre para análisis fenotípico.

Los estudios fenotípicos de ratones F2 y N2F2 comenzaron a las seis (6) semanas de edad. Se observó a los ratones desde el nacimiento por diversos hitos del desarrollo (daño fetal, respiración, anomalías faciales y de las extremidades, color de la piel, postura, corrección y apertura de los ojos) hasta las 6 semanas de edad, cuando se alojaron 2-5 por jaula en 12 horas de luz por día a 20-23 °C, y 40-60 % de humedad para el estudio. Los ratones se alojaron en jaulas de 95,6 x 309,1 x 133,4 mm (Thoren) con lecho a base de mazorca (The Andersons Lab Bedding) y un nido de algodón para enriquecimiento (Ancare). En el alojamiento, los ratones se monitorearon dos veces al día para determinar su estado de salud y tuvieron acceso a alimento concentrado normal (LabDiet) y agua a voluntad. Todos los procedimientos con animales se llevaron a cabo en estricto cumplimiento con las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de los Institutos Nacionales de la Salud. El protocolo se aprobó por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Regeneron Pharmaceuticals (IACUC), y se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento.

Análisis de expresión por TAQMAN®: Los tejidos de ganglios linfáticos axilares, braquiales y cervicales, la almohadilla grasa gonadal, la corteza frontal, el diafragma, la médula espinal, el bazo y el timo se diseccionaron frescos en reactivo de estabilización RNALater (QIAGEN) y se almacenaron a -20 °C. Los tejidos se homogeneizaron en reactivo TRIZOL® y

se separaron en fases con cloroformo. La fase acuosa, que contiene ARN total, se purificó mediante el uso de miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se eliminó el ADN genómico mediante el uso de tampón ADNasa MAGMAX™ TURBO™ y ADNasa TURBO™ (Ambion). El ARNm se transcribió inversamente en ADNc mediante el uso de la mezcla maestra SUPERScript® VILO™ (SuperScript® III RT, RNaseOUT™, inhibidor de ribonucleasa recombinante, proteína auxiliar patentada, cebadores aleatorios, MgCl₂, dNTP; Invitrogen de Life Technologies). El ADNc se amplificó con la mezcla maestra de expresión génica TAQMAN® (Applied Biosystems) mediante el uso del sistema de detección de secuencia ABI 7900HT (Applied Biosystems). La beta-actina se usó como un gen de control interno para normalizar las diferencias de entrada de ADNc. El timo de ratones de tipo silvestre se usó como muestra de referencia para calcular la diferencia en veces de ARNm entre muestras (n=5 hembras por tejido por genotipo). En la Figura 1B se exponen resultados ilustrativos.

Perfil de expresión de LacZ: Los ratones se anestesiaron profundamente mediante inyección IP de ketamina/xilazina (120/5 mg/kg) y se fijaron por perfusión cardíaca mediante el uso de una solución de glutaraldehído al 0,2 %, paraformaldehído al 4 %. Los tejidos del cerebro, la caja torácica, los ganglios linfáticos, las glándulas salivales, el timo, el corazón, los pulmones, el hígado, el bazo, el estómago, el riñón, el intestino, los urogenitales, los músculos y de las extremidades posteriores se diseccionaron, se enjuagaron en PBS y se fijaron por 30 minutos en glutaraldehído al 0,2 %, solución de paraformaldehído al 4. Los tejidos se lavaron y se incubaron en una solución de tinción X-gal (1 mg/ml) durante 1-24 horas a 37 °C. Después de la tinción, los tejidos se lavaron, se fijaron posteriormente en paraformaldehído al 4 % y se aclararon en una serie de glicerol del 50 %, 70 % y 100 %. Las fotografías se tomaron con un microscopio estereoscópico Nikon SMZ1500 y una cámara digital Nikon DS-Ri1 mediante el uso del programa informático de imágenes NIS-Elements D (Nikon).

El perfil de expresión se registró en el día embrionario 12,5 (E12,5), 6 semanas y 28 semanas. Datos representativos del perfil de expresión relativa de β -galactosidasa (*lacZ*) en embriones E12,5 (Tabla 4) y de ratones de 6 y 28 semanas de edad *C9orf72*^{-/-} se proporcionan más abajo (Tabla 5) (- = sin expresión; + = expresión baja; ++ = expresión moderada; +++ = expresión alta; wt = C57BL/6N tipo silvestre; nd = no determinado).

Como se muestra en la Figura 1B, se detectaron altos niveles de expresión de *C9orf72* en la almohadilla grasa gonadal, la corteza frontal y las médulas espinales de tipo silvestre (WT), con niveles más bajos en el timo, el bazo y los ganglios linfáticos. Los ratones *C9orf72*^{+/-} (Het) tenían aproximadamente la mitad del nivel de expresión del tipo silvestre (WT), como se esperaba, y los ratones *C9orf72*^{-/-} (KO) no tenían expresión detectable de *C9orf72*. No se observó diferencia en los niveles de transcripción de los loci cercanos *Mob3b*, *Ak045932*, y *Ifnk* entre los genotipos probados, lo que indica que la inserción de solamente *lacZ* (es decir, ablación de la secuencia codificante) afectó la expresión de *C9orf72*.

Consistente con los datos que se muestran en la Figura 1B, la tinción de *lacZ* en animales *C9orf72*^{-/-} de 6 y 28 semanas reveló actividad enzimática en varias regiones del cerebro y la médula espinal, así como también en el bazo, los testículos y los riñones (Tablas 4 y 5), lo cual es consistente con otros informes (Suzuki, N. y otros, 2013, Nat. Neurosci. 16(12):1725-8; Koppers, M. y otros, 2015, Am. Neurol. 78(3):425-38). Además, se observó una tinción menos prominente en otros tejidos. La actividad del indicador fue más limitada en intensidad y alcance en tejidos *C9orf72*^{-/-}, como se esperaba para un solo alelo de reemplazo *lacZ*.

Tomado en conjunto, este ejemplo demuestra que el *C9orf72* murino se expresa en diversos tejidos del sistema nervioso e inmunitario. Además, este ejemplo demuestra que, al menos en algunos tejidos, la expresión aumenta con la edad del animal y se correlaciona directamente con los fenotipos neurológicos e inmunológicos descritos en los siguientes ejemplos (ver más abajo).

Tabla 4.

Genotipo embrionario	expresión de <i>lacZ</i>
wt	-
<i>C9orf72</i> ^{+/-}	+++
<i>C9orf72</i> ^{-/-}	+++

Tabla 5.

			C9orf72 ^{-/-}	
5	Tejido	wt	macho de 6 semanas	macho de 28 semanas
	Cerebro	-	+++	+++
	Espinal	-	+++	+++
10	Médula			
	Corazón	-	+	+++
	Caja torácica	-	+	+++
15	Extremidad posterior	-	++	+++
	Hígado	-	++	+++
	Pulmón	-	++	+++
	Timo	-	+	++
20	Bazo	-	+	+++

Ejemplo 2. Análisis de comportamiento de animales no humanos que tienen una interrupción en un locus *C9orf72*

25 Este ejemplo demuestra, entre otras cosas, que los animales no humanos (por ejemplo, roedores) descritos en la presente descripción desarrollan síntomas similares a los de la ALS, tales como, por ejemplo, disminución del peso corporal y anomalías motoras significativas como resultado de una interrupción en un locus *C9orf72* de roedor (por ejemplo, ratón) como se describió en el Ejemplo 1.

30 Estudios fenotípicos de ratones que tienen una interrupción en un locus *C9orf72* como se describió anteriormente se realizaron a las 8, 18, 37 (hembras) y 57-60 semanas (machos). El peso corporal se midió cada dos semanas, y la composición corporal se analizó mediante una exploración μ CT (Dynamic 60). Se usó la exploración estándar 24 para visualizar la masa de la región cervical de la columna vertebral. Todos los procedimientos con animales se realizaron de conformidad con los protocolos aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Regeneron Pharmaceuticals.

La evaluación de la función motora general se realizó mediante el uso de ensayos de puntuación subjetiva a ciegas. El análisis del deterioro motor se realizó mediante el uso de pruebas de rotarod, locomoción en campo abierto y pasarela. La puntuación de discapacidad motora se midió mediante el uso del sistema desarrollado por el ALS Therapy Development Institute (ALSTDI, Gill A. y otros, 2009, PLoS One 4:e6489). Durante las pruebas de pasarela, los sujetos caminan a través de una plataforma de vidrio iluminada mientras una cámara de video registra desde abajo. Se informan los parámetros relacionados con la marcha, tales como el patrón de zancada, la velocidad de balanceo de la pata individual, la duración del apoyo y la presión para cada animal. Esta prueba se usa para fenotipar ratones y evaluar nuevas entidades químicas por su efecto sobre el desempeño motor. CatWalk XT es un sistema para la evaluación cuantitativa de pisadas y marcha en ratas y ratones. Se utiliza para evaluar la capacidad locomotora de los roedores en casi cualquier tipo de modelo experimental de anomalías de sistemas nervioso central, nervioso periférico, muscular o esquelético.

Análisis de la marcha por pasarela: Los animales se colocan al comienzo de la pasarela de Noldus CatWalk XT 10, con el extremo abierto frente a ellos. Los ratones corren espontáneamente hasta el final de la pista para intentar escapar. La cámara registra y el programa informático del sistema mide las huellas. Las huellas se analizan para determinar las anomalías en la colocación de las patas.

Prueba de campo abierto: Los ratones se colocan en el sistema de campo abierto de Kinder Scientific y se evalúan durante 60 minutos. El aparato usa rayos infrarrojos y un programa informático de computadora para calcular movimientos finos, deambulación X+Y, distancia recorrida, número de eventos de exploración vertical, tiempo dedicado a la exploración vertical y tiempo de inmovilidad.

Rotarod: La prueba de rotarod (IITC Life Science, Woodland Hills, CA) mide la latencia para que un ratón caiga de un rodillo giratorio. El rotarod se configura en el régimen experimental que comienza a 1 rpm y acelera hasta 15 rpm durante 180 segundos. Después, se registra la latencia de los animales hasta caer después del régimen incremental. Para evaluar la latencia hasta la caída, se usa el promedio y el máximo de las tres duraciones de tiempo más largas que los animales permanecen en el rodillo sin caerse. Los animales que logran permanecer en el rodillo más de 180 segundos se consideran asintomáticos.

65 El deterioro de las neuronas motoras superiores se presenta como espasticidad (es decir, rigidez), aumento de reflejos, temblor, bradicinesia y signos de Babinski. El deterioro de las neuronas motoras inferiores se presenta como debilidad

muscular, desgaste, espasmo, curvatura y arrastre de los pies y fasciculaciones. El deterioro bulbar se presenta como dificultad para tragar, balbucear y fasciculaciones de la lengua. La Tabla 6 expone la metodología de puntuación relacionada con el deterioro motor, el temblor y la rigidez de los animales durante las pruebas. En las Figuras 2A-2H se exponen resultados ilustrativos.

Como se muestra en las Figuras 2A-2H, los ratones *C9orf72*^{-/-} demostraron fenotipos similares a los de la ALS, como, por ejemplo, disminución del peso corporal, inactividad motora y deterioro de la marcha. En particular, la disminución del peso corporal en los ratones *C9orf72*^{-/-} en comparación con los ratones de control de tipo silvestre comenzó aproximadamente a las 30 semanas de edad (Figura 2B). Además, con la excepción del rotarod, se observó un deterioro motor significativo (por ejemplo, debilidad significativa y colapsos de las extremidades posteriores hacia la línea media lateral, así como también temblor leve y músculos rígidos de las extremidades posteriores, $p < 0.0001$) para los ratones *C9orf72*^{-/-} en todos los tipos de pruebas (Figuras 2C-2H) que comienza aproximadamente a las 40 semanas de edad, lo que indica el inicio de la patología de las neuronas motoras superiores e inferiores. No se observaron defectos similares en los animales de tipo silvestre o (*C9orf72*^{+/-}) heterocigotos.

El análisis de rotarod y marcha en pasarela en los ratones *C9orf72*^{-/-} demostró una disminución significativa de los comportamientos locomotores y menos eventos de exploración vertical, lo que indica un deterioro de la extremidad posterior. Los análisis de la marcha por pasarela revelaron signos de deterioro de la coordinación entre las extremidades inferiores y una longitud de zancada reducida, así como también bradicinesia y arrastre de las extremidades posteriores. Estos datos indicaron anomalías significativas en la marcha en comparación con el tipo silvestre. No se observó diferencias entre ratones de tipo silvestre y *C9orf72*^{-/-} con respecto al tiempo máximo en el rotarod. Tan pronto como a las 36 semanas de edad, los ratones *C9orf72*^{-/-} demostraron déficits motores significativos y progresivos.

En otro experimento, la porción lumbar de las médulas espinales de ratones de tipo silvestre y *C9orf72*^{-/-} se recolectaron ($n=5$, 60 semanas de edad) para el análisis histopatológico. No se observó diferencia en el número total de neuronas motoras en las médulas espinales (Figura 2I). Sin embargo, el área media del cuerpo celular de las neuronas motoras *C9orf72*^{-/-} fue significativamente más grande en comparación con el tipo silvestre ($p < 0.0001$). En particular, las neuronas motoras de los ratones *C9orf72*^{-/-} demostraron características hipertróficas evidenciadas por un área media significativamente mayor del cuerpo celular en comparación con el tipo silvestre (Figura 2I). Por lo tanto, estos datos indicaron un posible inicio de la patología de las neuronas motoras inferiores a partir de las 40 semanas de edad.

En un experimento similar, las anomalías motoras se evaluaron en tipo silvestre (*C9orf72*^{+/-}, $n=14$; 11 hembras, 3 machos) y *C9orf72*^{-/-} ($n=17$; 12 hembras, 5 machos) a partir de las 32 semanas hasta las 60 semanas de edad como el por ciento de animales vivos en una semana dada. Los ratones se pesaron semanalmente y la evaluación de la función motora general se realizó mediante el uso de ensayos de puntuación subjetivos a ciegas (como se describió anteriormente). Se realizaron exámenes neurológicos clínicos semanales o bimensuales en los dos grupos de ratones para observar su deterioro motor, temblor y rigidez de los músculos de sus extremidades posteriores. Para el deterioro motor, seguimos una escala de puntuación neurológica a ciegas (descrita anteriormente) de cero (sin síntomas) a cuatro (el ratón no puede enderezarse por sí mismo dentro de los 30 segundos posteriores a colocarse sobre su lado). Para el temblor y la rigidez, creamos un sistema de puntuación con una escala de cero (sin síntomas) a tres (grave). Los datos se informaron como la media $\pm$ SEM. Resultados representativos se exponen en la Figura 2J.

Los comportamientos locomotores se evaluaron durante 60 minutos cada dos semanas mediante el uso del sistema automático de campo abierto (Kinder Scientific), prueba de rotarod (Rota Rod, IITC Life Science, Woodland Hills, CA) y análisis de la marcha (CatWalk XT 10, Noldus) como se describió anteriormente. Los datos se informaron como la media $\pm$ SEM. Resultados representativos se exponen en la Figura 2K.

Mediante el uso de las escalas de puntuación descritas anteriormente, los inventores observaron que alrededor de las 40 semanas de edad, los ratones *C9orf72*^{-/-} comenzaron a mostrar una debilidad significativa y el colapso de sus patas traseras hacia la línea media lateral, así como también un temblor leve y músculos rígidos de las extremidades posteriores ($P < 0.0001$), lo que sugiere el inicio de la patología de las neuronas motoras superiores e inferiores. Además, todos los ratones de tipo silvestre vivieron más de 60 semanas de edad, pero solo el 53 % de los ratones *C9orf72*^{-/-} (9 de 17; 5 hembras, 4 machos) estaban vivos a las 60 semanas de edad (Figura 2J, arriba a la izquierda). Con un inicio alrededor de las 36 semanas de edad, los ratones *C9orf72*^{-/-} dejaron de ganar peso corporal, en contraste con la cohorte de ratones de tipo silvestre.

Del ensayo de campo abierto, los inventores observaron que los ratones *C9orf72*^{-/-} muestran comportamientos locomotores significativamente disminuidos en comparación con sus contrapartes de tipo silvestre ($P = 0.0008$). Estos ratones mostraron, además, comportamientos de exploración vertical significativamente menores ($P=0.0009$), lo que indicó un deterioro de sus extremidades posteriores. No se observó ningún cambio significativo en el tiempo máximo que los ratones permanecían en un rodillo giratorio en ningún momento durante el estudio entre los ratones de tipo silvestre y *C9orf72*^{-/-}. Del análisis de la marcha por pasarela, los inventores observaron que los ratones *C9orf72*^{-/-} tienen deteriorada significativamente la coordinación entre las extremidades inferiores ($P = 0.0005$) y longitud de zancada ($P = 0.0013$), así como también bradicinesia y arrastre de las extremidades posteriores. Estos datos indicaron anomalías significativas en la marcha en los ratones *C9orf72*^{-/-} en comparación con el tipo silvestre. Por lo tanto, el ejemplo demuestra que, con un

inicio alrededor de las 36 semanas de edad, los ratones *C9orf72*^{-/-} muestran déficits motores significativos y progresivos en comparación con el tipo silvestre.

En otro experimento, los ratones (*C9orf72*^{+/-}) heterocigotos y (*C9orf72*^{-/-}) homocigotos se examinaron mediante el uso de una prueba de fuerza de agarre. Brevemente, la fuerza de agarre mide la función neuromuscular como la fuerza muscular máxima de las extremidades anteriores, y se evalúa mediante el agarre aplicado por un ratón en una rejilla que se conecta a un sensor. Se llevaron a cabo tres ensayos en sucesión y se midió solo la resistencia de las extremidades anteriores. Todos los valores de fuerza de agarre obtenidos se normalizaron contra el peso corporal del ratón. La prueba de fuerza de agarre se realizó en trece ratones de tipo silvestre, siete *C9orf72*^{+/-} y dieciocho *C9orf72*^{-/-} a las 20 semanas de edad (antes del inicio de los síntomas motores) y en doce de tipo silvestre, cuatro *C9orf72*^{+/-} y trece *C9orf72*^{-/-} ratones a las 60 semanas de edad. Resultados representativos se exponen en la Figura 2L.

Como se muestra en la Figura 2L, los ratones heterocigotos (*C9orf72*^{+/-}) no mostraron ningún deterioro motor significativo, temblor o rigidez a las 60 semanas. Además, los ratones heterocigotos (*C9orf72*^{+/-}) no mostraron ningún cambio en la fuerza de agarre a las 60 semanas en comparación con el tipo silvestre.

Tomados en conjunto, este ejemplo demuestra que los animales no humanos descritos anteriormente demuestran un fenotipo neurodegenerativo medible y, por lo tanto, proporcionan modelos útiles de esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y/o demencia frontotemporal (FTD), cuyos animales no humanos tienen un genoma que comprende una delección de toda la secuencia codificante (es decir, exones 2-10) de un locus *C9orf72* endógeno resultante de la inserción de un gen indicador (por ejemplo, *lacZ*). Dichos modelos animales proporcionan un sistema *in vivo* útil para el desarrollo y tamizaje de candidatos terapéuticos para el tratamiento de la ALS y/o la FTD.

Tabla 6.

	0	1	2	3
Deterioro motor	sin fenotipo	espasmo	espasmo y arrastre	parálisis
Temblor	ninguno	leve	Moderado	grave
Rigidez	ninguno	leve	Moderado	grave

Ejemplo 3. Análisis inmunofenotípico de animales no humanos que tienen una interrupción en un locus *C9orf72*

Este ejemplo demuestra que los animales no humanos creados de acuerdo con el Ejemplo 1 demuestran un fenotipo inmunológico caracterizado por, en algunas modalidades, esplenomegalia y linfadenopatía resultante de la infiltración de diversas poblaciones de células inmunitarias. Además, este ejemplo demuestra específicamente que dichos animales no humanos desarrollan glomerulonefritis caracterizada por la infiltración de poblaciones de células inmunitarias en el riñón. Sin desear limitarse a ninguna teoría en particular, los presentes inventores proponen que el producto del locus *C9ORF72* juega un papel crítico en la función inmunitaria y que la pérdida del polipéptido C9ORF72 en animales no humanos descritos en la presente descripción no es el mecanismo prominente de la enfermedad ALS y/o FTD. Diversos tejidos se cosecharon de ratones *C9orf72*^{-/-} y de tipo silvestre para análisis (n=4-6 animales por genotipo a las 8, 18 y 37 semanas para las hembras, y 9-10, 18 y 57-60 semanas para los machos).

Preparación de las células y análisis por citometría de flujo: Se recolectó el máximo volumen de sangre en tubos recubiertos con EDTA mediante punción cardíaca inmediatamente después de la eutanasia con CO₂ y aproximadamente 200 µl se transfirieron a tubos recubiertos con heparina para la preparación para FACS. El bazo, la médula ósea y los ganglios linfáticos cervicales se recolectaron, se disociaron en suspensiones de células individuales en PBS IX de Dulbecco con suero bovino fetal al 2 % (Stem Cell Technologies) más EDTA 2 mM (Ambion) y se filtraron mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. La lisis de glóbulos rojos (RBC) se realizó en sangre, bazo y médula ósea mediante el uso de tampón de lisis RBC (eBioscience) o tampón de lisis ACK (Life Technologies). Las células de los ganglios linfáticos, el bazo y la médula ósea se contaron mediante el uso de un contador de viabilidad celular Cellometer Auto T4 (Nexcelom Bioscience) y se colocaron en placas para aproximadamente 10 millones de células por pocillo para el bazo y 1 millón de células por pocillo o volumen máximo para los ganglios linfáticos y la médula ósea. La sangre se colocó en placas al volumen máximo (aproximadamente 250 µl) por pocillo. Las células se trataron con tinción LIVE/DEAD Fixable Aqua (Life Technologies) a temperatura ambiente, se centrifugaron y se resuspendieron en solución de bloqueo (AcM CD16/CD32 anti-ratón purificado, BD Pharmingen, 1:100 en tampón FACS) durante 15 minutos en hielo. Las células se tiñeron con anticuerpos conjugados durante 30 minutos en hielo, se lavaron, se fijaron (kit BD Cytofix/cytoperm) y se lavaron nuevamente. Finalmente, las células se resuspendieron en tampón FACS (PBS IX de Dulbecco con suero bovino fetal al 2 %, Stem Cell Technologies, más EDTA 2 mM, Ambion) y se analizaron en un citómetro de flujo BD FACSCanto II o citómetro de flujo LSRFortessa (BD Biosciences). La tinción de Foxp3 (eBioscience) se realizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

Panel de tinción de células plasmáticas: CD11b (M1/70; Biolegend), CD11c (N418; Biolegend), CD3 (145-2C11; Biolegend), B220 (RA3-6B2; Biolegend), CD19 (1D3; BD Pharmingen), CD138 (281-2; BD Pharmingen) y CD45 (30-F11;

BD Pharmingen). Panel de tinción de células mieloides: F4/80 (BM8; Biolegend), CD115 (AFS98; eBioscience), Ly6G (RB6-8C5; eBioscience), CD11b (M1/70; eBioscience), CD45 (30-F11; BD Biosciences) y Ly6C (AL-21; BD Biosciences). Los anticuerpos contra CD8, CD25, CD62L, CD69, CD127, PD1 (RPMI-30), NKp46 se obtuvieron de BioLegend (San Diego, CA). El anticuerpo Foxp3 se obtuvo de eBioscience (San Diego, CA). El anticuerpo CD49b se obtuvo de BD Biosciences (San José, CA). Los datos se analizaron mediante el uso del programa informático FlowJo (Tree Star). Se realizaron recuentos para el número de células totales y por ciento de positivas para bazo, ganglios linfáticos cervicales, médula ósea y riñón de hembras de 30-35 semanas de edad (tipo silvestre: $n=4$; *C9orf72*^{-/-} $n=4$) en un contador de viabilidad celular Nexelcom Bioscience Cellometer Auto 2000 con colorante de viabilidad AO/PI (naranja de acridina y yoduro de propidio). Los recuentos de células se usaron para determinar el número absoluto de poblaciones de células observadas mediante tinción de superficie y se graficaron en consecuencia.

Histología: Los tejidos se recolectaron en paraformaldehído al 4 % (PFA, Electron Microscopy Sciences) o se recolectaron después de perfusión transcardial con 50 ml de solución salina, 50 ml de PFA al 4 % en tampón de acetato a pH 6,5 y finalmente 50 ml de solución de PFA al 4 % en tampón de borato a pH 9,5. Las médulas espinales se recolectaron en una solución de sacarosa al 15 % seguido de una al 30 % en tampón con colorante hasta que estas cayeron al fondo. Todos los demás tejidos se fijaron posteriormente en PFA al 4 % y se transfirieron a etanol al 70 % después de 24 o 48 horas. La inclusión en parafina, el seccionamiento y la tinción con hematoxilina y eosina (H-E) se realizaron por un laboratorio comercial de histología (Histoserv, Inc.; Germantown, MD). La inmunohistoquímica para IgM, IgG, factor de complemento C3, CD45R, CD3, CD138 y F4/80 se completó por un laboratorio comercial (Histotox Labs; Boulder, CO). El recuento de neuronas motoras y el área del cuerpo celular se cuantificaron mediante el uso de Image J. El recuento de neuronas motoras representa el promedio de tres láminas portaobjetos por animal, ratones $n=5$ y el área del cuerpo celular representa el promedio de tres láminas portaobjetos por animal, 10 neuronas motoras por lámina portaobjetos, ratones $n=5$. El factor de complemento C3 IHC se cuantificó mediante el uso de Halo.

Ensayos de hematología: Se recolectaron muestras de sangre mediante sangrados oculares retroorbitales con anestesia con isoflurano o mediante punción cardíaca después de la eutanasia por inhalación de CO₂ de acuerdo con el protocolo del IACUC de Regeneron. Se realizó un recuento sanguíneo completo (CBC) con diferencial en 20 μ l de sangre completa mediante el uso de Hemavet 950 (Drew Scientific Group) y el análisis de química clínica se realizó en muestras de suero mediante el uso del Sistema de Química ADVIA 1800 (Siemens Medical Solutions EE.UU.). Los ELISA se realizaron en muestras de plasma mediante el uso de lo siguiente: Kit de ELISA de factor reumatoide de IgG de ratón y kit de ELISA de factor reumatoide de IgM de ratón (Shibayagi Co., Ltd.), kit de ELISA de Ig total de ADN anti-ADNbc de ratón, kit de ELISA de Ig total de anticuerpos anti-nucleares de ratón (ANA), kit de ELISA de Ig total de ratón, Anti-Sm de ratón (Antígeno Smith), kit de ELISA de Ig total, kit de ELISA de Ig anti-cardiolipina total de ratón (Alpha Diagnostic Intl.) y kit de ELISA de ratón IgG e IgM (Abcam) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las muestras se leyeron en un lector de microplacas Spectramax M5 a 450 nm (Molecular Devices). Las muestras se analizaron por duplicado y se promediaron para determinar el valor medio. IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 total, IL-17, MCP-1 y TNF- α se midieron en muestras de plasma mediante el uso de un ensayo de detección por electroquimioluminiscencia Multi-Spot® 10-plex (Meso Scale Discovery) de acuerdo con las especificaciones del fabricante y se leyeron en un lector de placas Meso Sector S 600 a 620 nm (Meso Scale Discovery). Las muestras se analizaron por duplicado y se promediaron para determinar el valor medio.

Aislamiento, secuenciación y análisis de ARN: El bazo y los ganglios linfáticos cervicales se diseccionaron frescos en reactivo de estabilización RNALater (Qiagen) y se almacenaron a -20 °C. El ARN total se aisló mediante el uso del kit de aislamiento de ácido nucleico MagMAX™ (Ambion) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El ARN se cuantificó mediante el uso de un espectrofotómetro UV y la integridad del ARN se evaluó por Qiaxcel (Qiagen). El ARNm poliA se purificó a partir de ARN total mediante el uso del kit de ARNm Dynabeads (Invitrogen) y las bibliotecas de Sec-ARN específicas de cadena se prepararon con el kit de preparación de biblioteca RNA-seq ScriptSeq (Illumina). Las bibliotecas de Sec-ARN se secuenciaron a una longitud de 33 pb mediante el uso del secuenciador Hiseq 2000 NGS (Illumina). Los niveles de expresión génica se derivaron de lecturas de secuenciación primarias mediante el uso de Nimbus2, un programa informático de Sec-ARN desarrollado por Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

Método de análisis de orina; las muestras de orina se obtuvieron por medio de recolección al momento y la concentración de albúmina urinaria se determinó con el kit ELISA competitivo indirecto de Albuwell M (Exocell, Philadelphia, PA). La concentración de creatinina en orina se analizó mediante el uso del kit Creatinine Companion (Exocell). Los ensayos se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante y los datos obtenidos se usaron para calcular la relación albúmina/creatinina en orina (ACR).

Análisis estadístico: Los análisis estadísticos y gráficos se realizaron mediante el uso del programa informático GraphPad Prism (versión 3.0). Los datos se analizaron mediante la prueba t no apareada de Student y el análisis de varianza de una vía (ANOVA). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos a valores de $p < 0,05$ (las barras de error representan s.e.m.). En las Figuras 3A-3AL se exponen resultados ilustrativos.

Como se muestra en las Figuras 3A-3D, los ratones *C9orf72*^{-/-} desarrollaron un aumento significativo del bazo en comparación con los ratones de tipo silvestre y *C9orf72*^{+/-}. Además, los ganglios linfáticos cervicales fueron progresivamente más grandes con la edad (Figuras 3A-3D). Por lo tanto, ya a las 8 semanas de edad, los ratones *C9orf72*^{-/-} muestran bazos y ganglios linfáticos cervicales agrandados. Dichos aumentos fueron palpables en las regiones

cervicales de todos los ratones *C9orf72*^{-/-}, pero no en ratones de tipo silvestre o *C9orf72*^{+/-}. Tras una investigación adicional, dichas masas fueron palpables a las 12 semanas de edad en ratones hembras *C9orf72*^{-/-} y en ratones machos y hembras *C9orf72*^{-/-} a las 18 semanas. Después de la disección, se demostró que las masas se originaron en los ganglios linfáticos cervicales, y se observó un aumento tan pronto como a las 8 semanas de edad (Figura 3A). Una disección completa también reveló ganglios linfáticos agrandados adicionales en todo el cuerpo, especialmente los ganglios linfáticos mesentéricos en ratones *C9orf72*^{-/-} más viejos (>35 semanas). Las placas de Peyer también se agrandaron notablemente y la esplenomegalia fue evidente en ratones *C9orf72*^{-/-} a las 8 semanas de edad (Figura 3D, abajo a la izquierda). Solo nueve de 17 ratones *C9orf72*^{-/-} vivieron más de 60 semanas de edad, mientras que todos los ratones de tipo silvestre sometidos a pruebas periódicas de función neurológica sobrevivieron hasta el final del período experimental. Aproximadamente a las 18-24 semanas de edad, la esplenomegalia y la hiperplasia de los ganglios linfáticos cervicales estaban bien establecidas en todos los ratones *C9orf72*^{-/-} y las curvas de peso corporal de *C9orf72*^{-/-} comenzaron a aplanarse en comparación con los ratones de tipo silvestre y *C9orf72*^{+/-} (por ejemplo, Figura 2B).

Los datos de CBC con diferencial de sangre completa muestran que los ratones *C9orf72*^{-/-} desarrollan un aumento significativo en los neutrófilos, eosinófilos y monocitos circulantes en comparación con el tipo silvestre, mientras que demuestran una disminución significativa en los linfocitos circulantes (Figura 3E). Los datos de CBC de los ratones *C9orf72*^{-/-} (por ejemplo, de 34-38 semanas de edad) también demostraron que el diferencial de glóbulos blancos circulante se alteró en comparación con los ratones de tipo silvestre. Los inventores observaron que el aumento significativo en monocitos y neutrófilos, y una disminución de linfocitos en los ratones *C9orf72*^{-/-} en comparación con los ratones de tipo silvestre fueron detectables tan pronto como a las 8 semanas de edad.

La tinción con H-E reveló una población mixta de células con múltiples morfologías en el bazo y los ganglios linfáticos cervicales de ratones *C9orf72*^{-/-} (Figuras 3F, 3G). Específicamente, los ganglios linfáticos cervicales observados a 4x de potencia mostraron una abundancia de células grandes y redondas caracterizadas por bordes celulares variablemente distintos y con características eosinófilas de moderadas a abundantes (Figura 3F). Ocasionalmente, se observó citoplasma espumoso en la población celular expandida. Cuando se observan a una potencia de 60x, las células dentro de los ganglios linfáticos cervicales mostraron una morfología plasmacitoide (flechas azules) entremezcladas con neutrófilos (flechas amarillas) y otros linfocitos maduros (Figura 3G). Las células que parecían ser consistentes con macrófagos (flechas verdes) también estaban presentes, al igual que las células Mott (flecha roja intermitente; células plasmáticas anormales con inmunoglobulinas condensadas), todo lo cual indicó inflamación crónica en los ganglios linfáticos cervicales de ratones *C9orf72*^{-/-} (Figura 3G).

El agrandamiento observado de bazo y ganglios linfáticos en los ratones *C9orf72*^{-/-} indicó un proceso de enfermedad de desregulación inmunitaria o neoplásica, que no se había informado previamente en pacientes con ALS-FTD. El análisis histopatológico en los tejidos linfoides *C9orf72*^{-/-} (es decir, la tinción de secciones de ganglios linfáticos y bazo de ratones de 8-60 semanas de edad con hematoxilina y eosina (H-E)) confirmó que se conservaba la organización celular básica de los ganglios linfáticos agrandados. Además, la tinción por IHC confirmó la presencia de células B (CD45R⁺) en la corteza y células T (CD3⁺) entre los folículos y en la zona de la paracorteza. Sin embargo, hubo una expansión de la arquitectura ganglionar cortical y medular por una población celular que consistía principalmente de células redondas grandes con bordes variablemente distintos, y con un solo núcleo redondo rodeado de citoplasma eosinófilo y espumoso. Un infiltrado celular similar también se presentó en el bazo, ubicado predominantemente dentro de la pulpa roja, lo que expandió la arquitectura esplénica y, como resultado, los pesos esplénicos en ratones *C9orf72*^{-/-}. Además, se observó que se presentó una abundancia de células plasmocitoides que contenían halos perinucleares, consistente con la morfología de las células plasmáticas, junto con células Mott ocasionales. No se observaron infiltrados mixtos similares en ratones de tipo silvestre y *C9orf72*^{+/-} (heterocigotos).

La población de células grandes y redondas no se tiñó consistentemente con CD45R, CD3 o CD138, pero fue fuertemente positiva para F4/80, un marcador del linaje de macrófagos. La señal por IHC fue predominante en la membrana celular pero escasa en el citoplasma debido al citoplasma altamente vacuolado. Por el contrario, la tinción con F4/80 de controles heterocigotos y WT fue característica del patrón de tinción citoplasmática y membranosa esperado para los macrófagos, con una señal general F4/80 más intensa que la observada en ratones *C9orf72*^{-/-} (ver más abajo, por ejemplo, Figura 3P).

Los análisis por H-E e IHC de órganos adicionales de ratones de 8-60 semanas de edad revelaron hiperplasia medular esporádica del timo y fibrosis focal de la médula ósea y/o hiperplasia mieloide en determinados ratones *C9orf72*^{-/-}. Una observación más común fue la presencia de una población prominente de células dendríticas encontradas en el hígado y los riñones de ratones anulados. Estas células de alargadas a angulares eran F4/80⁺ y morfológicamente se parecían a las células dendríticas (DC) típicas, aunque de mayor tamaño y más numerosas. Estas eran más pronunciadas en hígado *C9orf72*^{-/-} tan pronto como a las 8 semanas en comparación con el tipo silvestre, aunque no hubo evidencia de enfermedad hepática asociada. Además, observamos un aumento en células F4/80⁺ en riñón *C9orf72*^{-/-} a las 8 semanas que se volvió más prominente con la edad. Las DC se ubicaron principalmente dentro de la médula externa, donde formaron agregados en la vecindad de la mácula densa y los túbulos adyacentes, junto con manguitos prominentes alrededor de los glomérulos en asociación con linfocitos. Observamos el aumento de infiltrados de leucocitos mixtos en el riñón a medida que los ratones envejecían, acompañados de grados variables de enfermedad glomerular mediada por el sistema inmunitario que estaba bien establecida entre las 35-60 semanas de edad. No se observó evidencia de inflamación en el tejido del cerebro o de la médula espinal en ninguno de los animales examinados. Por lo tanto, el bazo y los ganglios linfáticos fueron los

principales sitios de patología inmunitaria en ratones *C9orf72*^{-/-} con indicaciones de enfermedad glomerular progresiva secundaria en el riñón.

Como se muestra en la Figura 3H, los ratones *C9orf72*^{-/-} machos demuestran un número creciente de células B CD11b⁺CD11c⁺CD3⁺B220⁺CD19⁺ en los ganglios linfáticos cervicales, mientras que muestran porcentajes comparables o disminuidos de estas mismas células B en el bazo, la médula ósea y la sangre en comparación con el tipo silvestre. Las células B que están en transición a células plasmáticas (B220^{medio/bajo}CD19^{medio/bajo}) y células plasmáticas maduras (B220^{bajo/-}CD19^{bajo/-}CD45⁺CD138^{medio/+}) parecieron aumentar con la edad en el bazo, los ganglios linfáticos cervicales y la médula ósea de ratones machos *C9orf72*^{-/-} en comparación con el tipo silvestre (Figura 3I).

El porcentaje de células B (CD45⁺CD19⁺) no se modificó o se redujo en ratones hembras *C9orf72*^{-/-} en comparación con el tipo silvestre, en dependencia del órgano examinado (por ejemplo, ganglios linfáticos cervicales). Los ratones hembras *C9orf72*^{-/-} demuestran porcentajes crecientes de células B en transición a células plasmáticas/blastos plasmáticos (CD45⁺CD19^{int}B220^{int}CD138⁺) y células plasmáticas maduras (CD45⁺CD19⁻B220⁻CD138⁺) en bazo, ganglios linfáticos y médula ósea en comparación con el tipo silvestre (Figuras 3J). No observamos diferencias consistentes entre ratones *C9orf72*^{-/-} y controles en estos tipos de células en la sangre. Tomados en conjunto, estos datos demostraron una respuesta inmunitaria adaptativa avanzada en ratones *C9orf72*^{-/-}.

Como se muestra en las Figuras 3K y 3L, se observaron porcentajes crecientes de neutrófilos (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁺) en el bazo de ratones machos y hembras *C9orf72*^{-/-} a medida que envejecían. Además, se observaron aumentos en los ganglios linfáticos cervicales de ratones machos *C9orf72*^{-/-} entre 9-18 semanas y ratones hembras *C9orf72*^{-/-} en todos los puntos de tiempo examinados. Las poblaciones de granulocitos también aumentaron en la médula ósea y la sangre con una significación variable en la mayoría de los puntos de tiempo. Los monocitos inflamatorios (CD11b⁺, CD115⁺, Ly6G^{bajo/-}, Ly6C^{alto}) se incrementaron significativamente en ratones *C9orf72*^{-/-} en comparación con el tipo silvestre para bazo, ganglios linfáticos cervicales, médula ósea y sangre durante al menos un punto de tiempo de prueba (Figuras 3K y 3L, fila central). Aumentos similares de monocitos residentes (CD11b⁺CD115⁺Ly6G^{bajo/-}Ly6C^{medio/-}) en el tiempo también se observaron en ratones *C9orf72*^{-/-} en bazo, médula ósea y sangre, con disminución observada en los ganglios linfáticos cervicales (Figuras 3K y 3L, fila inferior, respectivamente). Como se muestra en la Figura 3M, se observó el aumento de las poblaciones de macrófagos F4/80⁺ en el bazo, ganglios linfáticos cervicales, riñón y médula ósea en ratones *C9orf72*^{-/-} en comparación con el tipo silvestre.

El análisis histopatológico en el contexto de la expresión de CD45R, CD3 y CD138 se analizó, además, en el bazo y los ganglios linfáticos cervicales de ratones de tipo silvestre y *C9orf72*^{-/-} (Figuras 3N, 3O). Las secciones se observaron a 4x y 60x de potencia. En el bazo, los ratones *C9orf72*^{-/-} demostraron una pérdida de la morfología folicular normal (Figura 3N). Las áreas de pulpa blanca estaban agrandadas y displásicas con bordes mal definidos. Se observó acumulación de células con abundante citoplasma de color rosa claro (células similares a plasma). La tinción con CD138 no difirió marcadamente de los ratones de tipo silvestre y algunas de las células proliferativas en el centro de la pulpa blanca no se tiñeron con CD45R, CD3 o CD138. Los bazos de ratones de tipo silvestre demostraron una morfología esencialmente normal con áreas de pulpa blanca compuestas de células T centrales (IHC anti-CD3) rodeadas por un borde de células B (IHC anti-CD45R), y la tinción para CD138 para células plasmáticas fue mínima (Figura 3N, izquierda).

En los ganglios linfáticos cervicales, los ratones *C9orf72*^{-/-} demostraron islas de tejidos linfoides dispersos entre grandes agregados de células redondas con un solo núcleo y abundante citoplasma eosinófilo (Figura 3O). Estas células reemplazaron la arquitectura normal, pero permanecieron áreas de células B y células T relativamente normales (evidentes en el centro de las secciones teñidas con CD3 y CD45R). Las células anormales se tiñeron intermitentemente con CD3, CD138 (flecha en la imagen inferior derecha de la Figura 3O) y CD45R, pero fueron generalmente negativas para los tres marcadores. Los ratones de tipo silvestre mostraron una morfología normal de los ganglios linfáticos (Figura 3O, derecha). Se encontró inmunotinción con CD45R (célula B) en la periferia alrededor de zonas de células T (CD3) y células teñidas escasamente con CD138 en la médula.

El análisis histopatológico en el contexto de la expresión F4/80 se analizó, además, en el bazo y los ganglios linfáticos cervicales de ratones de tipo silvestre y *C9orf72*^{-/-} (Figura 3P). Las secciones se observaron a 4x y 60x de potencia. Los datos demostraron tinción F4/80 positiva (macrófagos) en ratones *C9orf72*^{-/-}, que se correlaciona con el gran infiltrado celular espumoso observado en la tinción con H-E (descrito anteriormente). Además, se observó tinción extracelular F4/80 en la pulpa roja del bazo en ratones *C9orf72*^{-/-}. El número de células F4/80⁺ aumentó con la edad de 8-58 semanas en ratones *C9orf72*^{-/-}, y se incrementó en ganglios linfáticos *C9orf72*^{-/-} en comparación con los ganglios linfáticos de tipo silvestre.

Los recuentos de células totales CD45⁺ (antígeno leucocitario común) aumentaron en todos los tejidos examinados de ratones *C9orf72*^{-/-}, lo que fue consistente con la infiltración inmunitaria observada. Sin embargo, los porcentajes CD45⁺ en comparación con las poblaciones de células totales analizadas no cambiaron o se redujeron en comparación con el tipo silvestre (Figura 3S). Se emplearon paneles de anticuerpos específicos para determinar si se alteró la homeostasis dentro de los subconjuntos de leucocitos. Los porcentajes de neutrófilos (CD45⁺CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{int}CD115⁻) y monocitos totales (CD45⁺CD11b⁺CD115⁺) aumentaron de forma variable en los ganglios linfáticos, el bazo y la médula ósea de ratones *C9orf72*^{-/-} en comparación con el tipo silvestre (Figura 3K y 3L). Se observó además aumento en macrófagos F4/80⁺ (CD45⁺CD11b⁺F4/80⁺Ly6G⁻) en el bazo, ganglios linfáticos, riñones y sangre (Figura 3M). Curiosamente, aunque

más células se tiñeron positivamente con F4/80 en tejidos de ratones *C9orf72*^{-/-}, la señal general fue menos intensa que la observada en ratones de tipo silvestre, lo que indica un perfil de IHC F4/80 más extendido, pero menos concentrado (Figura 3P). La tinción de Ly6G y Ly6C reveló un mayor porcentaje de monocitos inflamatorios (CD45⁺CD11b⁺CD115⁺Ly6G⁺Ly6C^{hi}) en bazo, ganglio linfático, riñón y sangre de ratones *C9orf72*^{-/-}.

Se realizó un análisis FACS adicional en hembras de 30-35 semanas de edad, un punto temporal de interés específico ya que la mayoría de los ratones anulados han desarrollado patología renal, pero permanecieron viables. Como se muestra en la Figura 3Q, el recuento de células totales realizado en tejido total demostró un aumento significativo en el recuento absoluto de células por citometría de flujo para diversos compartimentos en ratones *C9orf72*^{-/-}. La identidad de dichos aumentos se determinó mediante el uso de citometría de flujo al emplear diversos marcadores para células dendríticas mieloides, células NK y células T (Figuras 3R-3AC). Las células dendríticas mieloides (CD45⁺CD11b⁺CD11c⁺MHCII⁺) se incrementaron en por ciento y recuento de células totales en ratones *C9orf72*^{-/-} en comparación con el tipo silvestre, mientras que la fracción de células NK (NKp46⁺CD49b⁺) disminuyó (Figura 3R). El por ciento de células CD45⁺ (antígeno leucocitario común; tiñe todos los glóbulos blancos) es comparable entre tejidos de ratones de tipo silvestre y *C9orf72*^{-/-}, sin embargo, los recuentos de células totales aumentaron significativamente, lo que indica una infiltración significativa de células inmunitarias (Figura 3S). La tinción con marcadores específicos de células T CD4⁺ (población de células T auxiliares) y CD8⁺ (población de células T citotóxicas) demostró porcentajes disminuidos de poblaciones de células T (Figuras 3T-3AC). Como lo muestra la IHC, el perfil molecular y los resultados de CBC, las disminuciones observadas en las poblaciones de linfocitos pueden reflejar el aumento en la proporción de células mieloides.

Como se muestra anteriormente, los porcentajes de células CD45⁺CD8⁺ y CD45⁺CD4⁺ se redujeron en general en ratones *C9orf72*^{-/-} en comparación con los ratones de tipo silvestre, lo que probablemente fue una consecuencia del aumento en la proporción de células mieloides consistente con los datos de la firma genética. Por el contrario, el recuento de células totales para estas poblaciones de células T aumentó en ratones *C9orf72*^{-/-}. Esto reflejaba la gran expansión de tejido linfoide y la infiltración inmunitaria manifiesta observada. Las poblaciones de células T CD8⁺ y CD4⁺ se subdividieron adicionalmente en función de la expresión de marcadores de activación de superficie adicionales (Figuras 3V-3AC). Para las células T CD8⁺, un porcentaje significativamente mayor de los marcadores de activación temprana y memoria efectora de células T CD69 y CD44, respectivamente, se observó en ratones *C9orf72*^{-/-} en comparación con el tipo silvestre (Figuras 3V y 3X). Además, se observó un aumento en el porcentaje de células T que expresan PD-1, un receptor coinhibidor que se regula positivamente en las células activadas y juega un papel importante en la regulación negativa del sistema inmunitario, en ratones *C9orf72*^{-/-} en comparación con el tipo silvestre (Figura 3Z). Los ganglios linfáticos cervicales demostraron una mayor expresión de CD44 y PD-1, aunque la expresión de CD69 disminuyó (Figuras 3V-3AA). Para las células T CD4⁺, se observaron aumentos significativos en el porcentaje de CD44 y PD1 en bazo, ganglios linfáticos, riñones y sangre en ratones *C9orf72*^{-/-} en comparación con el tipo silvestre, con valores comparables al tipo silvestre en la médula ósea (Figuras 3U, 3W, 3AA). El porcentaje de expresión de CD69 aumentó en el bazo, los ganglios linfáticos cervicales y el riñón con una significación variable (Figura 3Y). Concomitante con el aumento de células T activadas, se observaron mayores porcentajes de células T reguladoras CD4⁺FoxP3⁺ en bazos y ganglios linfáticos en ratones *C9orf72*^{-/-} en comparación con el tipo silvestre (Figura 3AB). Además, el compartimento esplénico demostró una expresión reducida de CD62L y CD127 (Figura 3AC), que se expresan en células T vírgenes o de memoria central y se regulan negativamente una vez que se activan las células T. Las mediciones del recuento de células también demostraron aumentos significativos en ratones *C9orf72*^{-/-} con significación variable.

Los datos de los paneles de citocinas (Figuras 3AD, 3AE y 3AF) demostraron citocinas elevadas en el suero de ratones *C9orf72*^{-/-} de 8-58 semanas de edad. En particular, a las 18 semanas de edad, los niveles de IL-17, IL-10, TNF- α e IL-12 (total) aumentaron significativamente en el suero de ratones machos *C9orf72*^{-/-} en comparación con el tipo silvestre (Figura 3AD). Para estas mismas citocinas, se observaron niveles elevados significativos en ratones *C9orf72*^{-/-} en comparación con los ratones *C9orf72*^{+/+}. Estos datos indicaron la activación sistémica de macrófagos en estos ratones. En todos los ratones machos analizados (8-58 semanas de edad), los ratones *C9orf72*^{-/-} demuestran un aumento significativo en los niveles circulantes de IFN- γ , IL-10, IL-12 (total), IL-17 y TNF- α en comparación con los ratones de tipo silvestre. En ratones hembras *C9orf72*^{-/-} de 8-38 semanas de edad, se observó un aumento significativo en los niveles circulantes de IL-10, IL-12 (total), IL-17, TNF- α y MCP-1, así como también una tendencia creciente de IFN- γ , en comparación con los ratones de tipo silvestre. La IL-12 (total) se incrementó aproximadamente 6 veces en ratones *C9orf72*^{-/-} en comparación con los ratones de tipo silvestre. La IL-10, la IL-17a y el TNF- α también se elevaron, aunque en menor medida. No se observaron cambios en los niveles de IL-1 β , IL-2 o IL-4, y aunque hubo un aumento de IL-6 en algunos ratones *C9orf72*^{-/-} en comparación con el tipo silvestre, esta diferencia no alcanzó significación. Los niveles de la quimocina MCP-1 aumentaron significativamente en hembras, pero no en ratones machos *C9orf72*^{-/-} (Figuras 3AE y 3AF), e IFN- γ aumentó significativamente en los machos y algunas hembras demostraron un ligero aumento (Figuras 3AE y 3AF). Por lo tanto, el aumento general de los niveles de citocinas proinflamatorias se observó tan temprano como a las 8 semanas en ratones *C9orf72*^{-/-} con significación variable en comparación con los ratones de tipo silvestre.

Como se muestra en las Figuras 3AG-3AK, los ratones *C9orf72*^{-/-} en envejecimiento desarrollan una mayor gravedad de la glomerulonefritis. Este resultado se confirmó en la tinción de H-E e IHC con F4/80 en hígado y riñón (Figura 3AK). Por ejemplo, el aumento de la tinción F4/80 por IHC en hígado *C9orf72*^{-/-} de 8 semanas de edad demostró una mayor infiltración de macrófagos, mientras que se observó una gran infiltración de células macrófagos F4/80⁺ en el riñón de ratones hembras de 38 semanas de edad (Figura 3AK). El aumento del nitrógeno ureico en sangre por la química sérica

se correlacionó con la enfermedad renal en ratones *C9orf72*^{-/-}, mientras que el aumento en el contenido de globulina sérica indicó una condición inflamatoria. El nitrógeno ureico en sangre normal en ratones varía de 8-33 mg/dl, mientras que los niveles de globulina varían normalmente de 1-4 g/dl (ver, por ejemplo, Zaias, J. y otros, 2009, J. Am. Assoc. Lab. Animal Sci. 48(4):387-390).

Un análisis posterior de los riñones reveló células mononucleares grandes F4/80⁺ que tenían características de células dendríticas presentes en grandes cantidades orientadas alrededor de los glomérulos de ratones *C9orf72*^{-/-} de 35-41 semanas de edad (Figura 3AK). Se observaron grados leves a moderados de glomerulonefritis en riñones de ratones *C9orf72*^{-/-} de 35-60 semanas de edad mediante tinción con H-E (Figura 3AK). En los animales más gravemente afectados, los glomérulos estaban agrandados, hiper celulares y mostraban proliferación mesangial e infiltración leucocítica. La manifestación de la enfermedad inmunomediada fue diversa con el engrosamiento observado de las paredes capilares y la proliferación del epitelio parietal en algunos glomérulos, mientras que otros mostraron expansión del mesangio con un material hialino eosinofílico acelular, consistente con glomerulosclerosis y un grado variable de fibrosis periglomerular. Curiosamente, estas áreas no resultaron positivas para la deposición amiloide tras la tinción con rojo Congo. Los cambios tubulares incluyeron dilatación tubular cortical y medular y la presencia de cilindros proteicos hialinos y basofilia tubular con degeneración/regeneración. Dichos cambios no se observaron en ratones de tipo silvestre. Un panel de química sérica que reveló niveles elevados de nitrógeno ureico en sangre (por ejemplo, Figura 3AG) y disminución de la albúmina sérica fue consistente con una filtración glomerular alterada que se correlacionó con los hallazgos histológicos renales en ratones *C9orf72*^{-/-} en comparación con los ratones de tipo silvestre.

Para medir más profundamente la gravedad de la enfermedad renal observada en ratones anulados, las secciones de riñón teñidas con H-E se puntuaron a ciegas para determinar glomerulonefritis membranoproliferativa, inflamación mononuclear intersticial, formación de cilindros hialinos, glomerulosclerosis y túbulos basófilos; categorías de enfermedad renal asociadas con glomerulonefropatía mediada por el sistema inmunitario. Como se muestra en la Figura 9A, los gráficos ponderados de los resultados de la puntuación histopatológica demuestran que los cambios renales más significativos observados en ratones anulados se asocian con la glomerulonefritis membranoproliferativa. Las puntuaciones individuales de histopatología se representan (Figura 9B) para mostrar que todos los ratones anulados muestran glomerulonefritis membranoproliferativa mínima a severa con evidencia ocasional de categorías de enfermedades adicionales en animales más gravemente afectados. Puntuación de 0=ninguno, 1=mínimo, 2=leve, 3=moderado y 4=severo. Las mediciones de ACR en orina analizadas en los puntos de tiempo de 14 semanas (Figura 9C, arriba) y 24 semanas (Figura 9C, abajo) de la misma cohorte de ratones indican la aparición de albuminuria en ratones *C9orf72*^{-/-} con la edad. Los ratones heterocigotos mostraron valores comparables a los WT consistentes con la ausencia de un fenotipo observado.

Además, los ratones *C9orf72*^{-/-} demostraron niveles aumentados de autoanticuerpos IgG e IgM totales por ELISA en comparación con los ratones de tipo silvestre, lo que indicó una enfermedad autoinmunitaria (Figura 3AI) y corresponde a niveles aumentados de globulina en suero observados por la química sérica (Figura 3AG, panel superior). Además, el ELISA en suero de los ratones *C9orf72*^{-/-} indicó niveles significativamente elevados de anticuerpos de ADN bicatenario (ADNbc), anticuerpos antinucleares (ANA), anticuerpos anti-Smith (anti-Sm) y anticuerpos anti-cardiolipina circulantes en comparación con los ratones de tipo silvestre. Los ANA son autoanticuerpos que se unen al contenido del núcleo celular. Los anticuerpos anti-ADNbc son un tipo de anticuerpo ANA que se une específicamente al ADN bicatenario y los anticuerpos anti-cardiolipina se dirigen contra los componentes fosfolípidos de la membrana mitocondrial.

Además, los ratones *C9orf72*^{-/-} demostraron un aumento significativo en los anticuerpos contra el factor reumatoide (RF) circulantes a las 8 semanas de edad (Figura 3AH). El aumento en el contenido de globulina sérica y autoanticuerpos puede indicar una cualquiera de diversas enfermedades y afecciones, por ejemplo, trastorno de la médula ósea, enfermedad autoinmunitaria, afección(es) inflamatoria(s) crónica(s), enfermedad hepática, enfermedad renal, infecciones, etcétera. Para dar solo un ejemplo, el lupus eritematoso sistémico (SLE) se caracteriza por altos títulos de autoanticuerpos contra muchas membranas celulares y antígenos intracelulares. Por ejemplo, los anticuerpos anti-Sm, que se dirigen contra unidades centrales de ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (RNPpn), son un marcador específico para el SLE.

El aumento de los títulos de autoanticuerpos en pacientes con lupus se correlaciona positivamente con una mayor frecuencia de células T foliculares auxiliares circulantes (Tfh) (Xu, H. y otros, Cell Immunol 295, 46-51 (2015)). La examinación de esta población celular específica (CD4 + CXCR5 + CD44 + ICOS + PD-1 + Bcl-6 +) en bazo, ganglios linfáticos cervicales, ganglios linfáticos mesentéricos y sangre por análisis FACS reveló un aumento significativo de las poblaciones de células Tfh en tejidos *C9orf72*^{-/-} en comparación con los controles (Figura 10). Además, se observaron células Tfh elevadas en médula ósea *C9orf72*^{-/-} que no alcanzó significación (Figura 10). Colectivamente, estas observaciones respaldan la noción de que se produce una respuesta inmunitaria similar al SLE humano en ausencia de expresión de *C9orf72*.

Las expansiones en células plasmáticas y las células B/plasmablastos en transición pueden asociarse con neoplasias específicas, tales como mieloma múltiple y plasmacitoma, así como también con afecciones autoinmunitarias. El bazo y el ganglio linfático de ratones *C9orf72*^{-/-} se agrandaron y un infiltrado inmunitario fue notablemente obvio, sin embargo, las células infiltrantes fueron negativas para los marcadores de células B (CD45R) y fueron F4/80⁺ con características de macrófagos espumosos. Si bien la población de estas células era grande, ocupaban áreas regionales de estos tejidos considerados apropiados para el linaje, y no destruían la arquitectura básica de estos tejidos. Además, el índice mitótico

era bajo, con solo escasas mitosis observadas. Por lo tanto, la neoplasia parecía poco probable. Existió, sin embargo, una población de células plasmáticas y células Mott ocasionales presentes en estos tejidos, y evidencia de glomerulonefritis, lo que indicó autoinmunidad en ratones *C9orf72*^{-/-}. Como se muestra anteriormente, los títulos anti-RF de tipo IgG e IgM se elevaron significativamente en ratones *C9orf72*^{-/-} en comparación con el tipo silvestre y ratones *C9orf72*^{+/-} (heterocigotos) (Figura 3AH). Además, los niveles séricos totales de IgG e IgM se elevaron significativamente en ratones *C9orf72*^{-/-} a partir de las 8 semanas de edad (Figuras 3AG y 3AI) lo que fue consistente con los paneles de química sérica que mostraban globulina elevada en ratones *C9orf72*^{-/-}.

Se ha informado que los autoanticuerpos contra la membrana basal glomerular, o la deposición de complejos inmunitarios solubles dentro de los capilares glomerulares, seguido por fijación del complemento e inflamación, provocan enfermedad renal (glomerulonefritis inmunomediada). Para determinar si el aumento observado en los niveles de inmunoglobulina total y autoanticuerpos contribuía a la glomerulonefritis, se realizó IHC en cortes de riñón de ratones *C9orf72*^{-/-} y de tipo silvestre de 8-63 semanas de edad para IgG e IgM totales (Figura 3AL). Como se describe en la presente descripción, los ratones *C9orf72*^{-/-} demuestran una clara evidencia de glomerulonefritis tanto a nivel sérico como histológico. En particular, los riñones de los ratones *C9orf72*^{-/-} demostraron un aumento de la inmunotinción de IgG en comparación con los ratones de tipo silvestre en todos los puntos de tiempo examinados. Además, a las 8 semanas, los riñones *C9orf72*^{-/-} mostraron una señal por IHC difusa e intensa en la vasculatura y el epitelio tubular de la médula y la corteza. Correlacionado con el inicio de la patología de la glomerulonefritis, se observó un marcado aumento en la tinción glomerular de IgG e IgM a las 38 semanas. La tinción para IgG e IgM también se asoció con frecuencia con la capa parietal de la cápsula de Bowman. Se observó ocasionalmente tinción para IgG en el espacio urinario y/o dentro de los túbulos renales proximales, lo que indica una función de filtración glomerular alterada (es decir, una filtración que excede la capacidad de resorción). La tinción intensa con IgG estaba presente en las células epiteliales de los túbulos en animales con enfermedad grave, consistente con la reabsorción de IgG abundante. Se observó una tinción similar pero menos intensa para IgM con menos frecuencia. La tinción en los glomérulos escleróticos disminuyó en comparación con el tipo silvestre, lo que fue consistente con el flujo sanguíneo deteriorado a estas unidades (es decir, los bucles vasculares se habían reemplazado por matriz o células mesangiales). Sin embargo, los glomérulos que mantuvieron los bucles vasculares claros tendieron a aumentar la IgG en comparación con el tipo silvestre. Los depósitos granulares finos y/o la tinción lineal de IgG e IgM asociados con las membranas vasculares se observaron con frecuencia con gran aumento y sugieren un depósito de inmunocomplejos.

El depósito del factor C3 del complemento se asocia comúnmente con depósitos de inmunoglobulina en las membranas basales del riñón. La IHC para el factor C3 del complemento reveló un aumento de la tinción en mechones glomerulares de ratones *C9orf72*^{-/-} en comparación con el tipo silvestre (Figura 3AL). La tinción granular y lineal fue más prominente en las membranas de la capa visceral de la cápsula glomerular, lo que delineó prominentemente los bucles capilares y los podocitos.

Datos de firma genética a partir de perfiles moleculares en bazo y ganglios linfáticos cervicales (ratones de tipo silvestre y *C9orf72*^{-/-} de 8-10 y 35 semanas) indicaron infiltración de poblaciones celulares de macrófagos, monocitos y granulocitos. Además, se observó el agotamiento de las células T y B, lo que puede reflejar el aumento en la proporción de células mieloides presentes. Los análisis jerárquicos globales separaron principalmente las muestras de cerebro por género y edad, en lugar de por genotipo, lo que indica que las diferencias de perfil en este tejido se debieron a la biología básica de las muestras y el genotipo. Solamente la expresión de *C9orf72* fue consistentemente diferente en el tejido cerebral de todas las edades y géneros. Por el contrario, las muestras de bazo y ganglios linfáticos se agruparon según el genotipo, con la edad y el sexo solo secundarios, lo que indicó que las diferencias de transcriptoma en estos órganos fueron el resultado de cambios en la expresión de *C9orf72*. Además, más de 100 loci asociados con la función inmunitaria demostraron diferencias de expresión significativas en ratones *C9orf72*^{-/-} en comparación con el tipo silvestre para machos y hembras en los puntos de tiempo temprano y tardío. Las firmas genéticas de bazo y ganglios linfáticos en los ratones *C9orf72*^{-/-} indicaron infiltración mieloide con una disminución simultánea en la huella linfocítica, consistente con los datos de CBC (ver anteriormente) que demuestran recuentos de leucocitos totales comparables entre cepas debido a un equilibrio entre las células mieloides elevadas y la disminución de linfocitos. En una comparación de los bioconjuntos, las coincidencias de perfil más fuertes fueron a firmas de respuesta inmunitaria, modelos de ratones de diversas afecciones inflamatorias y enfermedades infecciosas humanas. Como se muestra en este ejemplo, los datos de inmunofenotipaje demostraron que los ratones que tienen una interrupción en un locus *C9orf72* (*C9orf72*^{-/-}) desarrollan esplenomegalia y linfadenopatía a las 8 semanas de edad. En particular, los datos de CBC mostraron un aumento en monocitos, neutrófilos y eosinófilos circulantes en ratones *C9orf72*^{-/-}, así como también disminución de linfocitos en la sangre a partir de las 8 semanas. Además, los ganglios linfáticos cervicales aumentan progresivamente con la edad en ratones machos (58 semanas) y hembras (37 semanas) *C9orf72*^{-/-}. Este ejemplo demuestra específicamente, además, que los ratones *C9orf72*^{-/-} desarrollan glomerulonefritis (es decir, infiltración de macrófagos F4/80⁺ en el riñón) y enfermedad autoinmunitaria (es decir, niveles elevados significativos de autoanticuerpos IgM e IgG) a medida que envejecen. Por lo tanto, este ejemplo describe específicamente que los roedores que tienen una interrupción en un locus *C9orf72* como se describe en el Ejemplo 1 demuestran anomalías detectables en la periferia y la circulación tan pronto como a las 8 semanas de edad. En particular, la ablación de *C9orf72* conduce a una respuesta inmunitaria sistémica crónica que produce citocinas inflamatorias elevadas y expansión mieloide en varios compartimentos.

Ejemplo 4. Administración de neurotoxinas a animales no humanos que tienen una interrupción en un locus *C9orf72*

Este experimento demuestra que la administración de diversas toxinas a animales no humanos descritos en la presente descripción puede exacerbar aspectos del fenotipo similar a la ALS observado. En particular, este ejemplo demuestra específicamente que la administración de diversas toxinas a ratones *C9orf72*^{-/-} exacerba levemente el fenotipo motor similar a la ALS y aumenta el estrés oxidativo en las neuronas motoras, pero no afecta el aumento de la inactividad y las anomalías de la marcha en estos ratones. Este ejemplo demuestra, además, que las neuronas motoras de los ratones *C9orf72*^{-/-} desarrollan disfunción mitocondrial significativa.

Brevemente, las células madre embrionarias de ratón se cultivan y diferencian en neuronas motoras, durante un período de ocho días. El primer día, las células madre embrionarias de ratón previamente congeladas se descongelan y se añaden a un tubo falcon de 15 ml con cinco ml de medio de células madre embrionarias (medio ES: DMEM con 15 % de FBS, 1 % de pen./estrp., 1 % de glutamina, 1 % de aminoácidos no esenciales, 1 % de nucleósidos, 0,1 % de β-mercaptoetanol, 1 % de piruvato de sodio y LIF a 10 000 unidades/ml). A continuación, el tubo se centrifuga durante cinco minutos a 800 rpm. El sobrenadante se aspira y las células se suspenden en 10 ml de medio ES. Después, las células se colocan en un matraz T75 que se recubre con 10 ml de gelatina al 0,1 % y se incuban durante 30 minutos a 37 °C para facilitar la unión al fondo del matraz. A continuación, las células se incuban durante la noche. Al día siguiente, el medio se intercambia con medio fresco para sobrevivir.

Al día siguiente, el medio se aspira del matraz. El matraz se lava con 10 ml de PBS y después se añaden 5 ml de tripsina para separar las células del fondo del matraz. Las células se incuban durante cinco minutos a 37 °C. El desprendimiento se confirma mediante la comprobación del matraz con un microscopio. Se añade al matraz medio de diferenciación (10 ml de medio DFNK: 44 % de DMEM/F12 avanzado, 44 % de neurobasal, 1 % de pen./estrp., 1 % de glutamina, 0,1 % de β-mercaptoetanol, 10 % de reemplazo de suero con genes anulados) para detener la reacción con tripsina. La solución del matraz se recolecta en un tubo falcon y se centrifuga durante cinco minutos a 800 rpm. Se aspira el sobrenadante y las células se suspenden en 12 ml de medio DFNK. A continuación, las células se colocan en placas de cultivo celular y se ponen en una incubadora durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, la solución con las células se transfiere a un tubo falcon y se centrifuga durante dos minutos a 500 rpm. Se aspira el sobrenadante y las células se suspenden en 12 ml de medio DFNK. A continuación, las células se colocan en placas de cultivo celular nuevo y se ponen en una incubadora durante la noche. Al día siguiente, se recolecta el medio del plato y se transfiere a un tubo falcon. Después el tubo se centrifuga durante dos minutos a 500 rpm y a continuación se aspira el sobrenadante. Las células se suspenden en 36 ml de medio DFNK, con ácido retinoico a 1 μM y antagonista suavizado a una concentración final de 0,25 μM, para la diferenciación de neuronas motoras. El medio se divide en 12 ml por plato en los tres platos.

Después de tres días, los cuerpos embrioides (EB) que se forman se disocian. Primero, los EB se recolectan y se transfieren a un tubo falcon. Después se centrifugan las células durante dos minutos a 500 rpm y se aspira el sobrenadante. Las células se lavan después con 4 ml de PBS-glucosa. A continuación, se añaden 4 ml de tripsina a las células para la disociación química y se incuban durante cinco minutos. A continuación, se añade 1 ml de suero de caballo para detener la reacción con tripsina. Los EB se asientan durante cinco minutos y se aspira el sobrenadante. Se añaden 2 ml de PBS-glucosa-ADNasa y las células se disocian mecánicamente diez veces. Las células se asientan durante 5 minutos y las células disociadas se transfieren a un tubo separado. Se añaden 2 ml de PBS-glucosa-ADNasa a las células no disociadas y se repite la disociación mecánica. Las células se asientan durante cinco minutos y después las células disociadas se transfieren a un tubo separado. Las células disociadas se centrifugan durante cinco minutos a 800 rpm y después se aspira el sobrenadante. Las células disociadas se suspenden en 5 ml de medio de neuronas motoras de células madre embrionarias (medio ESMN: neurobasal, 2 % de B27, 2 % de suero de caballo, 1 % de pen./estrp., 0,25 % de glutamina, 0,01 % de β-mercaptoetanol, BDNF 10 ng/ml, CNTF 10 ng/ml, GDNF 10 ng/ml). Las células se centrifugan durante cinco minutos a 800 rpm. Se aspira el sobrenadante y las células se suspenden en medio ESMN. Después, se cuentan las células mediante el uso de un contador automático de células Countess (Life Technologies) y se colocan en placa de 0,5 a 1 millón de células con 2 ml de medio ESMN por pocillo en cada placa de seis pocillos. Las células permanecen ya sea en ESMN (control) o ESMN con BMAA a concentraciones de 0,1-100 μM. Los recuentos de células se tomaron mediante el uso de azul tripán al 0,4 % mediante el uso de un ajuste de diámetro celular promedio de >20 μm (neuronas motoras). En la Figura 4 se exponen resultados ilustrativos.

En otro experimento, a los ratones de tipo silvestre se les administraron inyecciones i.p. semanales de BMAA (500 mg/kg) o PBS (control) durante seis semanas a partir de la semana 1 (Figura 5A, arriba). Las mediciones de peso corporal se registraron cada semana hasta las 6 semanas, en la semana 14 y en la semana 18. El análisis del deterioro motor a través de rotarod, locomoción en campo abierto y pruebas de pasarela (como se describió anteriormente) se registraron al comienzo del experimento (semana 0, 10 semanas de edad), cada dos semanas hasta 6 semanas, en la semana 14 y en la semana 18. En las Figuras 5A-5D se exponen resultados ilustrativos.

Para ratones de tipo silvestre, los datos demostraron que BMAA mata neuronas motoras de tipo silvestre cultivadas de una manera dependiente de la dosis a través de la vía mediada por el receptor AMPA/kainita. Además, las inyecciones semanales (i.p.) de BMAA no indujeron un fenotipo similar a la ALS en ratones de tipo silvestre (Figuras 5A-5D). Se observaron resultados similares al usar 100 mg/kg de BMAA.

En otro experimento, a ratones de tipo silvestre y *C9orf72*^{-/-} envejecidos (es decir, 32 semanas) se les administraron inyecciones i.p. semanales de BMAA (500 mg/kg) o PBS (control) durante seis semanas. Las mediciones de peso corporal se registraron cada semana hasta 38 semanas a partir del día cero (es decir, 32 semanas). El análisis del deterioro motor

a través de pruebas de rotarod, locomoción en campo abierto y de pasarela (como se describió anteriormente) también se registraron al comienzo del experimento (semana 0, 10 semanas de edad) y cada dos semanas hasta 38 semanas. La Tabla 6 expone la metodología de puntuación relacionada con el deterioro motor, el temblor y la rigidez de los animales durante las pruebas. En las Figuras 6A-6E se exponen resultados ilustrativos. Los datos demostraron que la administración de BMAA a ratones *C9orf72*^{-/-} exacerba levemente el fenotipo motor similar a la ALS, pero no afecta el aumento de la inactividad y las anomalías de la marcha de estos ratones.

En otro experimento, las neuronas motoras de ratones *C9orf72*^{-/-} se cultivaron como se describió anteriormente (ver también la Figura 7) y se trataron con oligonucleótidos antisentido que se dirigen selectivamente a los ARN que contienen repeticiones de cadena sentido y reducen los focos de ARN orientado en sentido sin afectar la expresión general de *C9orf72*. El tratamiento se siguió por la adición de BMAA 100 mM. La supervivencia y el estrés oxidativo de las neuronas motoras cultivadas se midieron en los días 1 y 7. Brevemente, se evaluó el estrés oxidativo de las neuronas motoras derivadas de células madre embrionarias colocadas en placa (descritas anteriormente) mediante la medición de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células mediante el uso del reactivo CellROX Oxidative Stress Green de Life Technologies a una concentración final de 5 μ M e incubación durante 30 minutos a 37 °C. Después de la incubación, las células se lavaron tres veces con PBS y se midió la fluorescencia mediante el uso de una fluorometría de microplaca estándar. En la Figura 7 se exponen resultados ilustrativos. Los datos demostraron que la exposición de las neuronas motoras *C9orf72*^{-/-} a BMAA aumenta el estrés oxidativo.

En otro experimento, la función mitocondrial se determinó en ratones de tipo silvestre y *C9orf72*^{-/-}. Brevemente, la proporción de ADN mitocondrial con respecto a nuclear de neuronas motoras derivadas de células madre embrionarias (descrita anteriormente) se midió por aislamiento de ADN mediante el uso del reactivo ADNzol (Invitrogen). La pureza y la cantidad de ADN se evaluaron mediante el uso del espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) y el kit de relación mitocondrial con respecto a nuclear de ratón NovaQUANT (Novagen) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. El analizador Seahorse Bioscience XFe96 se usó para evaluar la respiración mitocondrial de las neuronas motoras derivadas de células madre embrionarias. El por ciento de la tasa de consumo de oxígeno para la primera medición de ratones de tipo silvestre se registró para 12 mediciones mediante el uso del analizador de flujo extracelular XFe96. La media de las primeras tres mediciones representó la respiración basal, las siguientes tres después de la adición de oligomicina (1 μ M) representaron la fuga de protones, la diferencia entre la respiración basal y la fuga de protones representó la producción de ATP, las siguientes tres mediciones después de la adición de FCCP (1 μ M) representaron la respiración máxima, la diferencia entre la respiración máxima y la respiración basal representaron la capacidad respiratoria de reserva y las tres últimas después de la adición de rotenona/antimicina A (0,5 μ M) representaron la respiración no mitocondrial. Todos los datos se recolectaron de al menos tres experimentos independientes y se informan como media $\pm$ SEM. La prueba t de Student se realizó para el análisis estadístico al comparar valores de ratones de tipo silvestre con ratones *C9orf72*^{-/-} con * para $P \leq 0,05$, ** para $P \leq 0,01$ y *** para $P \leq 0,001$. En la Figura 8 se exponen resultados ilustrativos.

Informes anteriores han demostrado que el agotamiento de ATP produce acumulación intracelular de Na⁺, lo que conduce a hipertrofia celular patológica (Liang D. y otros, 2007, Neurosurg. Focus 22(5):E2). Como se muestra en la Figura 8, el uso de neuronas motoras diferenciadas a partir de células madre de ratones de tipo silvestre y *C9orf72*^{-/-} (descritos anteriormente; ver también Wichterle H. y otros, 2002, Cell 110(3):385-97), los ratones *C9orf72*^{-/-} demostraron una falla en la bomba de Na-K ATPasa debido a la falta de ATP y/o el compromiso de la membrana celular. Por el contrario, no se observaron diferencias en la supervivencia y el estrés oxidativo en las neuronas de tipo silvestre o *C9orf72*^{-/-} (Figura 8, arriba). Curiosamente, se observó una mayor cantidad de ADN mitocondrial con respecto al nuclear en las neuronas motoras de ratones *C9orf72*^{-/-} (Figura 8, arriba a la derecha), así como también una tasa de respiración mitocondrial significativamente más baja ($P < 0,0001$) en comparación con las neuronas motoras de tipo silvestre (Figura 8, abajo a la izquierda). Además, la respiración basal, la producción de ATP, la respiración máxima, la fuga de protones y la capacidad respiratoria de reserva fueron significativamente menores en neuronas motoras *C9orf72*^{-/-} en comparación con las de tipo silvestre (Figura 8, abajo a la derecha). Por lo tanto, las neuronas motoras de los ratones *C9orf72*^{-/-} demuestran una disfunción mitocondrial significativa que probablemente conduce a daño celular e hipertrofia.

El presente ejemplo demuestra específicamente que los ratones *C9orf72*^{-/-} muestran déficits motores similares a la ALS. Además, este ejemplo resalta que mientras BMAA mata las neuronas motoras en una vía de excitotoxicidad de glutamato mediada por AMPA/kainato, la exposición a BMAA no es suficiente para inducir la enfermedad *in vivo*. Además, la exposición a BMAA solo exacerba levemente el fenotipo de la enfermedad de ALS en ratones *C9orf72*^{-/-}. Por lo tanto, los datos presentados en la presente descripción sugieren que, al menos en algunas modalidades, la pérdida de la proteína *C9orf72* en ratones *C9orf72*^{-/-} no es el mecanismo prominente de la enfermedad ALS-FTD.

Tomados en conjunto, la presente descripción demuestra específicamente que los ratones *C9orf72*^{-/-} creados de acuerdo con el Ejemplo 1 demuestran la ablación completa del locus *C9orf72*. Además, como se describe en la presente descripción, los ratones *C9orf72*^{-/-} desarrollan varios fenotipos distintos a lo largo del desarrollo caracterizados por, por ejemplo, déficits motores significativos y una interrupción en el sistema inmunitario y la función mitocondrial. Por ejemplo, los ratones *C9orf72*^{-/-} desarrollan un fenotipo autoinmunitario caracterizado por un aumento significativo en la concentración de autoanticuerpos en suero y la infiltración de diversas células inmunitarias en el bazo, los ganglios linfáticos, la médula ósea, los riñones y la sangre. Curiosamente, los datos de inmunofenotipado descritos en la presente descripción ilustran que el producto génico *C9orf72* desempeña un papel fundamental en la homeostasis del sistema

inmunitario y la salud neuronal. En particular, la esplenomegalia y la linfadenopatía en los ratones *C9orf72*^{-/-} son el resultado de la infiltración de varias poblaciones celulares, lo que incluye las células plasmáticas, monocitos, granulocitos y, más notablemente, macrófagos F4/80⁺ desde las 8 semanas de edad y progresivamente hasta las 60 semanas de edad. El panel de citocinas y los datos de perfiles moleculares sugieren fuertemente una vía de activación de Th1/macrófagos aumentada en ratones *C9orf72*^{-/-}. Por lo tanto, la presente descripción demuestra específicamente que la haploinsuficiencia es poco probable que sea la causa principal de la patología ALS-FTD en el contexto de *C9orf72* y proporciona un papel novedoso para *C9orf72* en la función inmunitaria y la homeostasis en un análisis fenotípico integral de un animal no humano con ablación de *C9orf72*.

El uso de términos habituales tales como "primero," "segundo," "tercero," etc., en las reivindicaciones para modificar un elemento de reivindicación no implica por sí mismo cualquier prioridad, precedencia, u orden de un elemento de reivindicación sobre otro o el orden temporal en el cual los actos de un método se realizan, pero se usan principalmente como etiquetas para distinguir un elemento de reivindicación que tiene un nombre determinado de otro elemento que tiene un mismo nombre (pero para el uso del término habitual) para distinguir los elementos de reivindicación.

Los artículos "un" y "una" como se usan en la descripción y en las reivindicaciones, deben entenderse como que incluyen los referentes plurales, a menos que se indique claramente lo contrario. Las reivindicaciones o descripciones que incluyen "o" entre uno o más miembros de un grupo se consideran satisfechos si uno, más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean, o son relevantes de cualquier otra manera en un determinado producto o proceso a menos que se indique lo contrario o sea evidente de cualquier otra manera a partir del contexto. La invención incluye modalidades en las que exactamente un miembro del grupo está presente, se emplea, o es relevante de cualquier otra manera en un determinado producto o proceso. La invención incluye, además, modalidades en las que más de uno, o todos los miembros del grupo están presentes, se emplean, o son relevantes de cualquier otra manera en un determinado producto o proceso. Además, debe entenderse que la invención abarca todas las variaciones, combinaciones y permutaciones en las que una o más limitaciones, elementos, cláusulas, términos descriptivos, etcétera, de una o más de las reivindicaciones enumeradas se introducen en otra reivindicación dependiente de la misma reivindicación base (o, según sea relevante, cualquier otra reivindicación) a menos que se indique de cualquier otra manera o a menos que sea evidente para un experto en la técnica que surja una contradicción o inconsistencia. Cuando los elementos se presentan como listas, (por ejemplo, en un grupo Markush o formato similar) debe entenderse que cada subgrupo de los elementos también se describe, y cualquier elemento(s) puede eliminarse del grupo. Debe entenderse que, en general, cuando la invención, o aspectos de la invención, se denomina(n) como que comprenden elementos, características particulares, etcétera, determinadas modalidades de la invención o aspectos de la invención consisten, o consisten esencialmente en, tales elementos, características, etcétera. Con fines de simplicidad esas modalidades no se han expuesto específicamente de manera detallada en todos los casos en la presente descripción.

Los expertos en la técnica apreciarán estándares de desviación o error típicos atribuibles a valores obtenidos en ensayos u otros procesos descritos en la presente descripción.

Listado de secuencias

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
 <120> ANIMALES NO HUMANOS QUE TIENEN UNA INTERRUPCIÓN EN UN LOCUS C9ORF72
 <130> 32698 (10152-US01)
 <150> 62/168,171
 <151> 2015-05-29
 <150> 62/232,658
 <151> 2015-09-25
 <150> 62/245,382
 <151> 2015-10-23
 <160> 9
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 3198
 <212> ADN
 <213> Mus musculus
 <400> 1

ES 2 784 360 T3

	gtgtccgggg cggggcggtc ccggggcggg gcccgggagcg ggctgcgggt gcggtcacctg	60
	cgccggcggt gaaggcgag cagcggcgag tggctattgc aagcggtcgg ataatgtgag	120
5	acctggaatg cagtgcagacc tgggatgcag ggatgtcgac tatctgcccc ccaccatctc	180
	ctgctgttgc caagacagag attgctttaa gtggtgaatc acccttggtg gcggctacct	240
	ttgcttactg ggataatatt cttggctcta gagtaaggca tatttgggct ccaaagacag	300
10	accaagtgc tctcagtgat ggagaaataa cttttcttgc caaccacact ctaaattggag	360
	aaattcttcg aaatgcagag agtggggcta tagatgtaa attttttgc ttatctgaaa	420
15	aaggggtaat tattgtttca ttaattctcg acggaaactg gaatggagat cggagcactt	480
	atggactatc aattatactg ccgcagacag agctgagctt ctacctccca cttcacagag	540
	tgtgtgttga caggctaaca cacattattc gaaaaggaag aatatggatg cataaggaaa	600
20	gacaagaaaa tgtccagaaa attgtcttgg aaggcacaga gaggatggaa gatcagggtc	660
	agagtatcat tcccatgctt actggggaag tcattcctgt aatggagctg cttgcatcta	720
	tgaaatccca cagtgttcct gaagacattg atatagctga tacagtgtc aatgatgatg	780
25	acattgggtga cagctgtcac gaaggctttc ttctcaatgc catcagctca cacctgcaga	840
	cctgtggctg ttccgttgta gttggcagca gtgcagagaa agtaaataag atagtaagaa	900
	cgctgtgcct ttttctgaca ccagcagaga ggaaatgtc caggctgtgt gaagcagaat	960
30	cgtcctttta gtacgaatcg ggactctttg tgcaaggctt gctaaaggat gcaacaggca	1020
	gttttgcct acccttcg cgcaagttatgt atgccccgta cccaccacg cacattgatg	1080

ES 2 784 360 T3

	tggatgtcaa cactgtcaag cagatgccac cgtgtcatga acatatttat aatcaacgca	1140
	gatacatgag gtcagagctg acagccttct ggagggaac ttcagaagag gacatggcgc	1200
5	aggacaccat catctacaca gatgagagct tcactcctga tttgaatatt ttccaagatg	1260
	tcttacacag agacactcta gtgaaagcct tcctggatca ggtcttccat ttgaagcctg	1320
	gcctgtctct caggagtact ttccttgcac agttcctcct cattcttcac agaaaagcct	1380
10	tgacactaat caagtacatc gaggatgata cgcagaaggg gaaaaagccc tttaaagtctc	1440
	ttcggaaacct gaagatagat cttgatttaa cagcagaggg cgatcttaac ataataatgg	1500
	ctctagctga gaaaattaag ccaggcctac actctttcat ctttgggaga cctttctaca	1560
15	ctagtgtaca agaacgtgat gttctaataga ccttttgacc gtgtggtttg ctgtgtctgt	1620
	ctcttcacag tcacacctgc tgttacagtg tctcagcagt gtgtgggcac atccttcctc	1680
	ccgagtcctg ctgcaggaca gggtacacta cacttgtcag tagaagtctg tacctgatgt	1740
20	cagggtgcac gttacagtga atgactcttc ctagaataga tgtactcttt tagggcctta	1800
	tgtttacaat taccctaagt actattgctg tcttttaaag atatgaatga tggaatatac	1860
	acttgacct aactgctgat tgggtttttg ttttgtttg tttgttttct tggaaactta	1920
25	tgattcctgg tttacatgta ccacactgaa accctcgta gctttacaga taaagtgtga	1980
	gttgacttcc tgcccctctg tgttctgtgg tatgtccgat tacttctgcc acagctaaac	2040
	attagagcat ttaaagtttg cagttcctca gaaaggaact tagtctgact acagattagt	2100
30	tcttgagaga agacactgat agggcagagc tgtaggtgaa atcagttgtt agcccttctc	2160
	ttatagacgt agtccttcag attcggctctg tacagaaatg ccgaggggtc atgcatgggc	2220
	cctgagtatc gtgacctgtg acaagttttt tgttggttta ttgtagttct gtcaaagaaa	2280
35	gtggcatttg tttttataat tgttgccaac ttttaaggtt aattttcatt atttttgagc	2340
	cgaattaaaa tgccgcacctc ctgtgccttt cccaatcttg gaaaatataa tttcttgga	2400
	gagggtcaga tttcagggcc cagtcacttt catctgacca ccctttgcac ggctgccgtg	2460
40	tgcctggcct agattagaag tccttggtta gtatgtcaga gtacattcgc tgataagatc	2520
	tttgaagagc agggaagcgt cttgcctctt tcctttggtt tctgcctgta ctctggtgtt	2580
45	tcccgtgtca cctgcatcat aggaacagca gagaaatctg acccagtgct atttttctag	2640
	gtgctactat ggcaaactca agtggctctgt ttctgttcct gtaacgttcg actatctcgc	2700
	tagctgtgaa gtactgatta gtggagtctt gtgcaacagc agtgtaggag tatacacaaa	2760
50	cacaaatatg tgtttctatt taaaactgtg gacttagcat aaaaaggag aatatattta	2820
	ttttttacaa aagggataaa aatgggcccc gttcctcacc caccagattt agcgagaaaa	2880
	agctttctat tctgaaaggc cacgggtggt ttggcattac aaatcagaac aacacacact	2940
55	gaccatgatg gcttgtgaac taactgcaag gcaactccgtc atggtaagcg agtaggtccc	3000

ES 2 784 360 T3

acctcctagtggtgccgctcattgctttacacagtagaatcttatttgagtgctaattgtt3060

gtcttttgctgctttactgtgtgttatagaaatgtaagctgtacagtgaataagttatt3120

5 gaagcatgtgtaaacactgttatatatcttttctcctaga tggggaattt tgaataaaat3180

acctttgaaa ttctgtgt3198

<210> 2

10 <211> 481

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

15 Met Ser Thr Ile Cys Pro Pro Pro Ser Pro Ala Val Ala Lys Thr Glu
1 5 10 15

Ile Ala Leu Ser Gly Glu Ser Pro Leu Leu Ala Ala Thr Phe Ala Tyr
20 20 25 30

Trp Asp Asn Ile Leu Gly Pro Arg Val Arg His Ile Trp Ala Pro Lys
35 40 45

25 Thr Asp Gln Val Leu Leu Ser Asp Gly Glu Ile Thr Phe Leu Ala Asn
50 55 60

30 His Thr Leu Asn Gly Glu Ile Leu Arg Asn Ala Glu Ser Gly Ala Ile
65 70 75 80

Asp Val Lys Phe Phe Val Leu Ser Glu Lys Gly Val Ile Ile Val Ser
35 85 90 95

Leu Ile Phe Asp Gly Asn Trp Asn Gly Asp Arg Ser Thr Tyr Gly Leu
100 105 110

40 Ser Ile Ile Leu Pro Gln Thr Glu Leu Ser Phe Tyr Leu Pro Leu His
115 120 125

45 Arg Val Cys Val Asp Arg Leu Thr His Ile Ile Arg Lys Gly Arg Ile
130 135 140

Trp Met His Lys Glu Arg Gln Glu Asn Val Gln Lys Ile Val Leu Glu
145 150 155 160

50 Gly Thr Glu Arg Met Glu Asp Gln Gly Gln Ser Ile Ile Pro Met Leu
165 170 175

55 Thr Gly Glu Val Ile Pro Val Met Glu Leu Leu Ala Ser Met Lys Ser
180 185 190

ES 2 784 360 T3

	His	Ser	Val	Pro	Glu	Asp	Ile	Asp	Ile	Ala	Asp	Thr	Val	Leu	Asn	Asp	
			195					200					205				
5	Asp	Asp	Ile	Gly	Asp	Ser	Cys	His	Glu	Gly	Phe	Leu	Leu	Asn	Ala	Ile	
	210						215					220					
10	Ser	Ser	His	Leu	Gln	Thr	Cys	Gly	Cys	Ser	Val	Val	Val	Gly	Ser	Ser	
	225					230					235					240	
15	Ala	Glu	Lys	Val	Asn	Lys	Ile	Val	Arg	Thr	Leu	Cys	Leu	Phe	Leu	Thr	
					245					250					255		
20	Pro	Ala	Glu	Arg	Lys	Cys	Ser	Arg	Leu	Cys	Glu	Ala	Glu	Ser	Ser	Phe	
				260					265					270			
25	Lys	Tyr	Glu	Ser	Gly	Leu	Phe	Val	Gln	Gly	Leu	Leu	Lys	Asp	Ala	Thr	
		275						280					285				
30	Gly	Ser	Phe	Val	Leu	Pro	Phe	Arg	Gln	Val	Met	Tyr	Ala	Pro	Tyr	Pro	
	290						295					300					
35	Thr	Thr	His	Ile	Asp	Val	Asp	Val	Asn	Thr	Val	Lys	Gln	Met	Pro	Pro	
	305					310					315					320	
40	Cys	His	Glu	His	Ile	Tyr	Asn	Gln	Arg	Arg	Tyr	Met	Arg	Ser	Glu	Leu	
					325					330					335		
45	Thr	Ala	Phe	Trp	Arg	Ala	Thr	Ser	Glu	Glu	Asp	Met	Ala	Gln	Asp	Thr	
				340					345					350			
50	Ile	Ile	Tyr	Thr	Asp	Glu	Ser	Phe	Thr	Pro	Asp	Leu	Asn	Ile	Phe	Gln	
		355						360					365				
55	Asp	Val	Leu	His	Arg	Asp	Thr	Leu	Val	Lys	Ala	Phe	Leu	Asp	Gln	Val	
	370						375					380					
60	Phe	His	Leu	Lys	Pro	Gly	Leu	Ser	Leu	Arg	Ser	Thr	Phe	Leu	Ala	Gln	
	385					390					395					400	
65	Phe	Leu	Leu	Ile	Leu	His	Arg	Lys	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile	Lys	Tyr	Ile	
				405						410					415		
70	Glu	Asp	Asp	Thr	Gln	Lys	Gly	Lys	Lys	Pro	Phe	Lys	Ser	Leu	Arg	Asn	
				420					425					430			
75	Leu	Lys	Ile	Asp	Leu	Asp	Leu	Thr	Ala	Glu	Gly	Asp	Leu	Asn	Ile	Ile	

ES 2 784 360 T3

		435		440		445										
5	Met	Ala	Leu	Ala	Glu	Lys	Ile	Lys	Pro	Gly	Leu	His	Ser	Phe	Ile	Phe
		450					455					460				
10	Gly	Arg	Pro	Phe	Tyr	Thr	Ser	Val	Gln	Glu	Arg	Asp	Val	Leu	Met	Thr
	465					470					475					480
15	Phe															
	<210> 3															
	<211> 3435															
	<212> ADN															
	<213> Rattus norvegicus															
	<400> 3															

ES 2 784 360 T3

	cgtttgtagt gtcagccatc ccaattgcct gttccttctc tgtgggagtg gtgtctagac	60
	agtcaggga gggatgcta ggcagggtgcg ttttggttgc ctgagatcgc aacttgactc	120
5	cataacggtg accaaagaca aaagaaggaa accagattaa aaagaaccgg acacagaccc	180
	ctgcagaatc tggagcggcc gtggttgggg gcggggctac gacggggcgg actcgggggc	240
10	gtgggagggc ggggccgggg cggggcccgg agccggctgc ggttgcggtc cctgcgccgg	300
	cggatgaaggc gcagcggcgg cgagtggcta ttgcaagcgt ttggataatg tgagacctgg	360
	gatgcaggga tgtcgactat ctgccccca ccatctcctg ctgttgccaa gacagagatt	420
15	gctttaagtg gtgaatcacc cttggtggcg gctacctttg cttactggga taatattctt	480
	ggtcctagag taaggcacat ttgggctcca aagacagacc aagtactcct cagtgatgga	540
20	gaaatcactt ttcttgccaa ccacactctg aatggagaaa ttcttcggaa tgcggagagt	600
	ggggcaatag atgtaaagtt ttttgtctta tctgaaaagg gcgtcattat tgtttcatta	660
	atcttcgacg ggaactggaa cggagatcgg agcacttacg gactatcaat tatactgccg	720
25	cagacggagc tgagtttcta cctccactg cacagagtgt gtgttgacag gctaacgcac	780
	atcattcgaa aaggaaggat atggatgcac aaggaaagac aagaaaatgt ccagaaaatt	840
30	gtcttggaag gcaccgagag gatggaagat cagggtcaga gtatcatccc tatgcttact	900
	ggggaggtca tccctgtgat ggagctgctt gcgtctatga gatcacacag tgttcctgaa	960
	gacctcgata tagctgatac agtactcaat gatgatgaca ttggtgacag ctgtcatgaa	1020
35	ggctttcttc tcaatgccat cagctcacat ctgcagacct gcggctgttc tgtggtggta	1080
	ggcagcagtg cagagaaagt aaataagata gtaagaacac tgtgcctttt tctgacacca	1140
	gcagagagga agtgctccag gctgtgtgaa gccgaatcgt cctttaaata cgaatctgga	1200
40	ctctttgtac aaggcttgct aaaggatgcg actggcagtt ttgtactacc tttccggcaa	1260

ES 2 784 360 T3

	gttatgtatg	ccccttatcc	caccacacac	atcgatgtgg	atgtcaacac	tgtcaagcag	1320
	atgccaccgt	gtcatgaaca	tatttataat	caacgcagat	acatgaggtc	agagctgaca	1380
5	gccttctgga	gggcaacttc	agaagaggac	atggctcagg	acaccatcat	ctacacagat	1440
	gagagcttca	ctcctgattt	gaatatcttc	caagatgtct	tacacagaga	cactctagt	1500
	aaagcctttc	tggatcaggt	cttccatttg	aagcctggcc	tgtctctcag	gagtactttc	1560
10	cttgccacagt	tcctcctcat	tcttcacaga	aaagccttga	cactaatcaa	gtacatagag	1620
	gatgacacgc	agaaggggaa	aaagcccttt	aagtctcttc	ggaacctgaa	gatagatctt	1680
15	gatttaacag	cagagggcga	ccttaacata	ataatggctc	tagctgagaa	aattaagcca	1740
	ggcctacact	ctttcatctt	cgggagacct	ttctacacta	gtgtccaaga	acgtgatgtt	1800
	ctaagtactt	tttaaactgt	tggtttgctc	cgtgtgtctc	atgacagtca	cacttgctgt	1860
20	tacagtgtct	cagcgctttg	gacacatcct	tcctccaggg	tcctgccgca	ggacacgtta	1920
	cactacactt	gtcagtagag	gtctgtacca	gatgtcaggt	acatcgttgt	agtgaatgtc	1980
	tcttttccta	gactagatgt	accctcgtag	ggacttatgt	ttacaaccct	cctaagtact	2040
25	agtgtgtct	tgttaaggata	cgaatgaagg	gatgtaaact	tcaccacaac	tgttggttgg	2100
	ttttgttgtt	tttgtttttt	gaaacttata	attcatgggt	tacatgcata	acactgaaac	2160
30	cctagttagc	tttttacagg	taagctgtga	gttgactgcc	tgtccctgtg	ttctctggcc	2220
	tgtacgatct	gtggcgtgta	ggatcacttt	tgcacaact	aaaaactaaa	gcactttgtt	2280
	tgcagttcta	cagaaagcaa	cttagtctgt	ctgcagattc	gtttttgaaa	gaagacatga	2340
35	gaaagcggag	tttttaggtga	agtcagttgt	tggatcttcc	tttatagact	tagtccttta	2400
	gatgtggct	gtatagacat	gccaaccat	catgcaggg	cactgaatat	cgtgaactgt	2460
40	ggtatgcttt	ttgttggttt	attgtacttc	tgtcaaagaa	agtggcattg	gtttttataa	2520
	ttgttgccaa	gttttaaggt	taattttcat	tatttttgag	ccaaattaaa	atgtgcacct	2580
	cctgtgcctt	tccaatctt	ggaaaatata	atttcttggc	agaaggtcag	atttcagggc	2640
45	ccagtcactt	tcgtctgact	tccttttgca	cagtcgcga	tgggcctggc	ttagaagttc	2700
	ttgtaaacta	tgccagagag	tacattcgct	gataaaatct	tctttgcaga	gcaggagagc	2760
	ttcttgccct	tttcctttca	ttctgcctg	gactttggtg	ttctccacgt	tcctgcatac	2820
50	ctaaggacag	caggagaact	ctgacccag	tgtatcttct	ctaggtgcta	ttgtggcaaa	2880
	ctcaagcggg	ccgtctctgt	ccctgtaacg	ttcgtacctt	gctggctgtg	aagtactgac	2940
55	tggtaaagct	ccgtgctaca	gcagtgtagg	gtatacacia	acacaagtaa	gtgttttatt	3000
	taaaactgtg	gacttagcat	aaaaaggag	actatattta	ttttttacaa	aagggataaa	3060
	aatggaaccc	tttctcacc	caccagattt	agtcagaaaa	aaacattcta	ttctgaaagg	3120
60	tcacagtggg	tttgacatga	cacatcagaa	caacgcacac	tgtccatgat	ggcttatgaa	3180

ES 2 784 360 T3

```

ctccaagtca ctccatcatg gtaaattgggt agatccctcc ttctagtgtg ccacaccatt      3240
gcttcccaca gtagaatctt atttaagtgc taagtgttgt ctctgctggg ttactctgtt      3300
5  gtttttagaga atgtaagttg tatagtgaat aagttattga agcatgtgta aacactgtta      3360
tacatctttt ctccatgatg gggaatttgg aataaaatac ctttaaaatt caaaaaaaaaa      3420
10  aaaaaaaaaa aaaaaa                                                    3435
<210> 4
<211> 481
<212> PRT
15  <213> Rattus norvegicus
    <400> 4

    Met Ser Thr Ile Cys Pro Pro Pro Ser Pro Ala Val Ala Lys Thr Glu
    1          5          10          15

20  Ile Ala Leu Ser Gly Glu Ser Pro Leu Leu Ala Ala Thr Phe Ala Tyr
    20          25          30

25  Trp Asp Asn Ile Leu Gly Pro Arg Val Arg His Ile Trp Ala Pro Lys
    35          40          45

30  Thr Asp Gln Val Leu Leu Ser Asp Gly Glu Ile Thr Phe Leu Ala Asn
    50          55          60

35  His Thr Leu Asn Gly Glu Ile Leu Arg Asn Ala Glu Ser Gly Ala Ile
    65          70          75          80

    Asp Val Lys Phe Phe Val Leu Ser Glu Lys Gly Val Ile Ile Val Ser
    85          90          95

40  Leu Ile Phe Asp Gly Asn Trp Asn Gly Asp Arg Ser Thr Tyr Gly Leu
    100          105          110

45  Ser Ile Ile Leu Pro Gln Thr Glu Leu Ser Phe Tyr Leu Pro Leu His
    115          120          125

50  Arg Val Cys Val Asp Arg Leu Thr His Ile Ile Arg Lys Gly Arg Ile
    130          135          140

55  Trp Met His Lys Glu Arg Gln Glu Asn Val Gln Lys Ile Val Leu Glu
    145          150          155          160

    Gly Thr Glu Arg Met Glu Asp Gln Gly Gln Ser Ile Ile Pro Met Leu
    165          170          175

60

```

ES 2 784 360 T3

	Thr	Gly	Glu	Val	Ile	Pro	Val	Met	Glu	Leu	Leu	Ala	Ser	Met	Arg	Ser	
				180					185					190			
5	His	Ser	Val	Pro	Glu	Asp	Leu	Asp	Ile	Ala	Asp	Thr	Val	Leu	Asn	Asp	
			195					200					205				
10	Asp	Asp	Ile	Gly	Asp	Ser	Cys	His	Glu	Gly	Phe	Leu	Leu	Asn	Ala	Ile	
		210					215					220					
15	Ser	Ser	His	Leu	Gln	Thr	Cys	Gly	Cys	Ser	Val	Val	Val	Gly	Ser	Ser	
	225					230					235					240	
20	Ala	Glu	Lys	Val	Asn	Lys	Ile	Val	Arg	Thr	Leu	Cys	Leu	Phe	Leu	Thr	
					245					250					255		
25	Pro	Ala	Glu	Arg	Lys	Cys	Ser	Arg	Leu	Cys	Glu	Ala	Glu	Ser	Ser	Phe	
				260					265					270			
30	Lys	Tyr	Glu	Ser	Gly	Leu	Phe	Val	Gln	Gly	Leu	Leu	Lys	Asp	Ala	Thr	
			275					280					285				
35	Gly	Ser	Phe	Val	Leu	Pro	Phe	Arg	Gln	Val	Met	Tyr	Ala	Pro	Tyr	Pro	
		290					295					300					
40	Thr	Thr	His	Ile	Asp	Val	Asp	Val	Asn	Thr	Val	Lys	Gln	Met	Pro	Pro	
	305					310					315					320	
45	Cys	His	Glu	His	Ile	Tyr	Asn	Gln	Arg	Arg	Tyr	Met	Arg	Ser	Glu	Leu	
					325					330					335		
50	Thr	Ala	Phe	Trp	Arg	Ala	Thr	Ser	Glu	Glu	Asp	Met	Ala	Gln	Asp	Thr	
				340					345					350			
55	Ile	Ile	Tyr	Thr	Asp	Glu	Ser	Phe	Thr	Pro	Asp	Leu	Asn	Ile	Phe	Gln	
			355					360					365				
60	Asp	Val	Leu	His	Arg	Asp	Thr	Leu	Val	Lys	Ala	Phe	Leu	Asp	Gln	Val	
		370					375					380					
65	Phe	His	Leu	Lys	Pro	Gly	Leu	Ser	Leu	Arg	Ser	Thr	Phe	Leu	Ala	Gln	
	385					390					395					400	
70	Phe	Leu	Leu	Ile	Leu	His	Arg	Lys	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile	Lys	Tyr	Ile	
				405						410					415		
75	Glu	Asp	Asp	Thr	Gln	Lys	Gly	Lys	Lys	Pro	Phe	Lys	Ser	Leu	Arg	Asn	
				420					425					430			

ES 2 784 360 T3

	Leu Lys Ile Asp Leu Asp Leu Thr Ala Glu Gly Asp Leu Asn Ile Ile	
	435 440 445	
5	Met Ala Leu Ala Glu Lys Ile Lys Pro Gly Leu His Ser Phe Ile Phe	
	450 455 460	
10	Gly Arg Pro Phe Tyr Thr Ser Val Gln Glu Arg Asp Val Leu Met Thr	
	465 470 475 480	
	Phe	
15	<210> 5 <211> 680 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Promotor sintético de polinucleótidos-prot	
20	<400> 5	
	ccagtagcag caccacgctc caccttctgt ctagtaatgt ccaacacctc cctcagtcca	60
25	aacactgctc tgcattccatg tggctcccat ttatacctga agcacttgat ggggcctcaa	120
	tgttttacta gagcccaccc ccctgcaact ctgagaccct ctggatttgt ctgtcagtgc	180
	ctcactgggg cgttggataa tttcttaaaa ggtcaagttc cctcagcagc attctctgag	240
30	cagtctgaag atgtgtgctt ttcacagttc aaatccatgt ggctgtttca cccacctgcc	300
	tggccttggg ttatctatca ggacctagcc tagaagcagg tgtgtggcac ttaaacaccta	360
35	agctgagtga ctaactgaac actcaagtgg atgccatctt tgtcacttct tgactgtgac	420
	acaagcaact cctgatgcc aagccctgcc caccctctc atgccatat ttggacatgg	480
	tacaggctct cactggccat ggtctgtgag gtccctggctc tctttgactt cataattcct	540
40	agggggcact agtatctata agaggaagag ggtgctggct ccagggccac agcccacaaa	600
	attccacctg ctacaggtt ggctggctcg acccaggtgg tgtcccctgc tctgagccag	660
	ctcccgcca agccagcacc	680
45	<210> 6 <211> 1052 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Promotor sintético de polinucleótido-Blimpl 1 kb	
50	<400> 6	

ES 2 784 360 T3

	tgccatcatc acaggatgtc cttccttctc cagaagacag actggggctg aaggaaaagc	60
	cggccaggct cagaacgagc cccactaatt actgcctcca acagctttcc actcactgcc	120
5	cccagcccaa catccccttt ttaactggga agcattccta ctctccattg tacgcacacg	180
	ctcgggaagcc tggctgtggg tttgggcatg agaggcaggg acaacaaaac cagtatatat	240
	gattataact ttttcctgtt tccctatttc caaatggtcg aaaggaggaa gttaggtcta	300
10	cctaagctga atgtattcag ttagcaggag aaatgaaatc ctatacgttt aatactagag	360
	gagaaccgcc ttagaatatt tatttcattg gcaatgactc caggactaca cagcgaaatt	420
	gtattgcatg tgctgccaaa atacttttagc tctttccttc gaagtacgtc ggatcctgta	480
15	attgagacac cgagtttagg tgactagggg tttcttttga ggaggagtcc cccaccccg	540
	cccgcctctgc cgcgacagga agctagcgat ccggaggact tagaatacaa tcgtagtgtg	600
20	ggtaaacaatg gagggcaagc gcctgcaaag ggaagtaaga agattcccag tccttgttga	660
	aatccatttg caaacagagg aagctgccgc gggtcgcagt cgggtggggg aagccctgaa	720
	ccccacgctg cacggctggg ctggccaggt gcggccacgc ccccatcgcg gcggtggta	780
25	ggagtgaatc agaccgtcag tattggtaaa gaagtctgcg gcagggcagg gagggggaag	840
	agtagtcagt cgctcgctca ctcgctcgct cgcacagaca ctgctgcagt gacactcggc	900
	cctccagtgt cgcggagacg caagagcagc gcgcagcacc tgtccgcccg gagcgagccc	960
30	ggcccgcggc cgtagaaaag gagggaccgc cgaggtgctg gtcagtactg ctcagcccgg	1020
	cagggacgcg ggaggatgtg gactgggtgg ac	1052
35	<210> 7	
	<211> 2008	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Promotor sintético de polinucleótido-Blimpl 2 kb	
	<400> 7	

ES 2 784 360 T3

	gtggtgctga ctcagcatcg gtttaataaac cctctgcagg aggctggatt tcttttgttt	60
	aattatcact tggacctttc tgagaactct taagaattgt tcattcgggt ttttttgttt	120
5	tgttttggtt tgggtttttt ggggtttttt tttttttttt ttttttggtt ttggagacag	180
	ggtttctctg tatatagccc tggcacaaga gcaagctaac agcctgtttc ttcttggtgc	240
	tagcgcccc tctggcagaa aatgaataaa cagggtggacc tacaaccccc ccccccccc	300
10	ccagtgtatt ctactcttgt ccccggtata aatttgattg ttccgaacta cataaattgt	360
	agaaggattt tttagatgca catatcattt tctgtgatac cttccacaca cccctcccc	420
15	ccaaaaaat ttttctggga aagtttcttg aaaggaaaac agaagaacaa gcctgtcttt	480
	atgattgagt tgggcttttg ttttgctgtg ttccatttct tcctgtaaac aaataactcaa	540
	atgtccactt cattgtatga ctaagttggt atcattaggt tgggtctggg tgtgtgaatg	600

ES 2 784 360 T3

	tgggtgtgga tctggatgtg ggtgggtgtg tatgccccgt gtgttttagaa tactagaaaa	660
	gataccacat cgtaaaacttt tgggagagat gattttttaa aatgggggtg ggggtgaggg	720
5	gaacctgcga tgaggcaagc aagataaggg gaagacttga gtttctgtga tctaaaaagt	780
	cgctgtgatg ggatgctggc tataaatggg cccttagcag cattgtttct gtgaattgga	840
	ggatccctgc tgaaggcaaa agaccattga aggaagtacc gcatctggtt tgttttgtaa	900
10	tgagaagcag gaatgcaagg tccacgctct taataataaa caaacaggac attgtatgcc	960
	atcatcacag gatgtccttc cttctccaga agacagactg gggctgaagg aaaagccggc	1020
15	caggctcaga acgagcccca ctaattactg cctccaacag ctttccactc actgccccca	1080
	gcccacatc cccttttttaa ctgggaagca ttcctactct ccattgtacg cacacgctcg	1140
	gaagcctggc tgtgggtttg ggcatgagag gcagggacaa caaaaccagt atatatgatt	1200
20	ataacttttt cctgtttccc tatttccaaa tggtcgaaag gaggaagtta ggtctacct	1260
	agctgaatgt attcagttag caggagaaat gaaatcctat acgtttaata ctagaggaga	1320
	accgccttag aatattttatt tcattggcaa tgactccagg actacacagc gaaattgtat	1380
25	tgcatgtgct gccaaaatac tttagctctt tccttcgaag tacgtcggat cctgtaattg	1440
	agacaccgag tttaggtgac tagggttttc ttttgaggag gagtcccca ccccgccccg	1500
	ctctgccgag acaggaagct agcgatccgg aggacttaga atacaatcgt agtgtgggta	1560
30	aacatggagg gcaagcgcct gcaaagggaa gtaagaagat tcccagtcct tgttgaaatc	1620
	catttgcaaa cagaggaagc tgccgcgggt cgcagtcggt ggggggaagc cctgaacccc	1680
35	acgtgcacg gctgggctgg ccaggtgcgg ccacgcccc atcgcgcgcg ctggtaggag	1740
	tgaatcagac cgtcagtatt ggtaaagaag tctgcggcag ggcagggagg gggaagagta	1800
	gtcagtcgct cgctcactcg ctgcctcgca cagacactgc tgcagtgaca ctcgccctc	1860
40	cagtgtcgcg gagacgcaag agcagcgcg agcacctgtc cgcccgagc gagcccgcc	1920
	cgcgccgta gaaaaggagg gaccgcccag gtgcgcgtca gtactgtca gcccggcagg	1980
	gacgcgggag gatgtggact ggggtggac	2008
45	<210> 8	
	<211> 8388	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> Secuencia de polinucleótidos de un locus C9ORF72 modificado desde lacZ hasta el sitio loxP en dirección 3'	
	<400> 8	
55	ggtaccgatt taaatgatcc agtggctctg cagaggagag attgggagaa tcccgggtgtg	60
	acacagctga acagactagc cgcccaccct ccctttgctt cttggagaaa cagtgaggaa	120

ES 2 784 360 T3

	gctaggacag acagaccaag ccagcaactc agatctttga acggggagtg gagatttgcc	180
	tggtttcogg caccagaagc ggtgccgga agctggctgg agtgcgatct tcctgagggc	240
5	gatactgtcg tcgtcccctc aaactggcag atgcacgggt acgatgcgcc catctacacc	300
	aacgtgaact atcccattac ggtcaatccg ccgtttgttc ccacggagaa tccgacgggt	360
	tgttactcgc tcacatttaa tgttgatgaa agctggctac aggaaggcca gacgcgaatt	420
10	atttttgatg gcgttaactc ggcgtttcat ctgtggtgca acgggcgctg ggtcggttac	480
	ggccaggaca gtogtttgcc gtctgaattt gacctgagcg cttttttacg cgccggagaa	540
	aaccgcctcg cggtgatggt gctgcgctgg agtgacggca gttatctgga agatcaggat	600
15	atgtggcgga tgagcgcat tttccgtgac gtctcggtgc tgcataaacc gactacacaa	660
	atcagcgatt tccatgttgc cactcgcttt aatgatgatt tcagccgcgc tgtactggag	720
	gctgaagttc agatgtgcgg cgagttgctg gactacctac gggtaacagt ttctttatgg	780
20	cagggtgaaa cgcaggtcgc cagcggcacc gcgcctttcg gcggtgaaat tatcgatgag	840
	cgtggtggtt atgccgatcg cgtcacacta cgtctgaacg tcgaaaaccg gaaactgtgg	900
	agcgcggaat tcccgaatct ctatcgctgc gtggttgaac tgcacaccgc cgacggcacg	960
25	ctgattgaag cagaagcctg cgatgtcggg ttccgcgagg tgcggattga aaatggtctg	1020
	ctgctgctga acggcaagcc gttgctgatt cgaggcggtt accgtcacga gcatcatcct	1080
	ctgcatggtc aggtcatgga tgagcagacg atggtgcagg atatcctgct gatgaagcag	1140
30	aacaacttta acgccgtcgc ctgttcgcat tatccgaacc atccgctgtg gtacacgctg	1200
	tgcgaccgct acggcctgta tgtggtggat gaagccaata ttgaaacca cggcatggtg	1260
	ccaatgaatc gtctgaccga tgatccgcgc tggtatccgg cgatgagcga acgcgtaacg	1320
35	cgaatggtgc agcgcgatcg taatcaccgc agtgtgatca tctggtcgct ggggaatgaa	1380
	tcaggccacg gcgctaata caacgcgctg tatcgctgga tcaaactctgt cgatccttcc	1440
	cgcccggtgc agtatgaagg cggcggagcc gacaccacgg ccaccgatat tatttgcccg	1500
40	atgtacgogc gcgtggatga agaccagccc ttcccggtcg tgccgaaatg gtccatcaaa	1560
	aaatggcttt cgctacctgg agagacgcgc ccgctgatcc tttgcgaata cggccacgcg	1620
45	atgggtaaca gtcttgccgg tttcgctaaa tactggcagg cgtttcgtca gtatccccgt	1680
	ttacagggcg gcttcgtctg ggactgggtg gatcagtcgc tgattaaata tgatgaaaac	1740
	ggcaaccogt ggtcggctta cggcgggtgat tttggcgata cgccgaacga tcgccagttc	1800
50	tgtatgaacg gtctggtctt tgccgaccgc acgccgcac cagcgtgac ggaagcaaaa	1860
	caccagcagc agtttttcca gttccgttta tccgggcaaa ccacgaagt gaccagcgaa	1920
	tacctgttcc gtcatacgca taacgagctc ctgcactgga tgggtggcgct ggatggtaag	1980
55	ccgctggcaa gcggtgaagt gcctctggat gtcgctccac aaggtaaaca gttgattgaa	2040

ES 2 784 360 T3

	ctgcctgaac taccgcagcc ggagagcgcc gggcaactct ggctcacagt acgcgtagtg	2100
	caaccgaacg cgaccgcatg gtcagaagcc gggcacatca gcgcctggca gcagtggcgt	2160
5	ctggcggaac acctcagtgt gacgctcccc gccgcgtccc acgccatccc gcatctgacc	2220
	accagcgaaa tggatttttg catcgagctg ggtaataagc gttggcaatt taaccgccag	2280
	tcaggctttc tttcacagat gtggattggc gataaaaaac aactgctgac gccgctgccc	2340
10	gatcagttca cccgtgcacc gctggataac gacattggcg taagtgaagc gaccgcatt	2400
	gaccctaacg cctgggtcga acgctggaag gcggcgggcc attaccaggc cgaagcagcg	2460
	ttgttgagct gcacggcaga tacacttgct gatgcggtgc tgattacgac cgctcacgcg	2520
15	tggcagcatc aggggaaaac cttatttatc agccggaaaa cctaccggat tgatggtagt	2580
	gggtcaaatg cgattaccgt tgatgttgaa gtggcgagcg atacaccgca tccggcgcg	2640
20	attggcctga actgccagct ggcgcaggtg gcagagcggtg taaactggct cggattagg	2700
	ccgcaagaaa actatcccga ccgccttact gccgcctgtt ttgaccgctg ggatctgcca	2760
	ttgtcagaca tgtatacccc gtacgtcttc ccgagcgaaa acggtctgcg ctgccccgac	2820
25	cggaattga attatggccc acaccagtgg cgcggcgact tccagttcaa catcagccgc	2880
	tacagtcaac agcaactgat ggaaaccagc catcgccatc tgctgcacgc ggaagaaggc	2940
	acatggctga atatcgacgg tttccatatg gggattgggt gcgacgactc ctggagcccc	3000
30	tcagtatcgg cggaattcca gctgagcgcc ggtcgctacc attaccagtt ggtctggtgt	3060
	caaaaataat aataaccggg caggggggat ctaagctcta gataagtaat gatcataatc	3120
	agccatatca catctgtaga ggttttactt gctttaaaaa acctcccaca cctccccctg	3180
35	aacctgaaac ataaaatgaa tgcaattgtt gttgttaact tgtttattgc agcttataat	3240
	ggttacaaat aaagcaatag catcacaat ttcacaaata aagcattttt ttcactgcat	3300
40	tctagtgtg gtttgtccaa actcatcaat gtatcttatc atgtctggat ccccggtta	3360
	gagtttaaac actagaacta gtggatcccc gggctcgata actataacgg tcctaaggta	3420
	gcgactcgag ataaacttctg ataattgtatg ctatacgaag ttatatgcat ggcctccg	3480
45	ccgggttttg gcgcctcccg cgggcgcccc cctcctcacg gcgagcgctg ccacgtcaga	3540
	cgaaggcgcg agcgagcgtc ctgatccttc cggccggacg ctcaggacag cggcccgctg	3600
	ctcataagac tcggccttag aaccccagta tcagcagaag gacatttttag gacgggactt	3660
50	gggtgactct agggcactgg ttttctttcc agagagcgga acaggcgagg aaaagtagtc	3720
	ccttctcggc gattctgctg agggatctcc gtggggcggt gaacgcccgt gattatataa	3780
	ggacgcgccg ggtgtggcac agctagtctc gtcgcagccg ggatttgggt cgcggttctt	3840
55	gtttgtggat cgctgtgatc gtcacttggt gagtagcggt ctgctgggct ggcgggggct	3900

ES 2 784 360 T3

	ttcgtggccg ccggggccgct cgggtgggacg gaagcgtgtg gagagaccgc caagggtgt	3960
	agtctgggtc cgcgagcaag gttgccctga actgggggtt ggggggagcg cagcaaatg	4020
5	gcggtctgtc ccgagtcttg aatggaagac gcttgtgagg cgggctgtga ggtcgttgaa	4080
	acaaggtggg gggcatggtg ggcggcaaga acccaagtc ttgaggcctt cgctaagcg	4140
	ggaaagctct tattcgggtg agatgggctg gggcaccatc tggggaccct gacgtgaagt	4200
10	ttgtcactga ctggagaact cggtttgtcg tctgttcgcg gggcggcagt tatggcggtg	4260
	cogttgggca gtgcaccogt acctttggga gcgcgcgccc tcgtcgtgtc gtgacgtcac	4320
	cogttctgtt ggcttataat gcagggtggg gccacctgcc ggtaggtgtg cggtaggcctt	4380
15	ttctccgtcg caggacgcag ggttcgggcc tagggtaggc tctcctgaat cgacaggcgc	4440
	cggacctctg gtgaggggag ggataagtga ggcgtcagtt tctttggtcg gttttatgta	4500
	cctatcttct taagtagctg aagctccggt tttgaactat gcgctcgggg ttggcgagtg	4560
20	tgttttgtga agtttttttag gcaccttttg aaatgtaatc atttgggtca atatgtaatt	4620
	ttcagtgtta gactagtaaa ttgtccgcta aattctggcc gtttttggct tttttgttag	4680
	acgtgttgac aattaatcat cggcatagta taccggcata gtataatacg acaaggtgag	4740
25	gaactaaacc atgggatcgg ccattgaaca agatggattg caccgaggtt ctccggccgc	4800
	ttgggtggag aggcctattcg gctatgactg ggcacaacag acaatcggct gctctgatgc	4860
	cgccgtgttc cggctgtcag cgcaggggcg cccggttctt tttgtcaaga ccgacctgtc	4920
30	cgggtgccctg aatgaactgc aggcagaggc agcgcggcta tcgtggctgg ccacgacggg	4980
	cgttccttgc gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggact ggctgctatt	5040
	gggcgaagtg ccggggcagg atctcctgtc atctcacctt gctcctgccg agaaagtatc	5100
35	catcatggct gatgcaatgc ggcggctgca tacgcttgat ccggctacct gccattcga	5160
	ccaccaagcg aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcgg atggaagccg gtcttgtcga	5220
40	tcaggatgat ctggacgaag agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt tcgccaggct	5280
	caaggcgogc atgcccagcg gcgatgatct cgtcgtgacc catggcgatg cctgcttgcc	5340
	gaatatcatg gtggaaaatg gccgcttttc tggattcatc gactgtggcc ggctgggtgt	5400
45	ggcggaccgc tatcaggaca tagcgttggc taccgctgat attgctgaag agcttggcgg	5460
	cgaatgggct gaccgcttcc tcgtgcttta cggtatcgcc gctcccgatt cgcagcgcat	5520
	cgccttctat cgccttcttg acgagttctt ctgaggggat ccgctgtaag tctgcagaaa	5580
50	ttgatgatct attaaacaat aaagatgtcc actaaaatgg aagtttttcc tgtcatactt	5640
	tgttaagaag ggtgagaaca gactacctac attttgaatg gaaggattgg agctacgggg	5700
	gtgggggtgg ggtgggatta gataaatgcc tgccttttac tgaaggctct ttactattgc	5760
55	tttatgataa tgtttcatag ttggatatca taatttaaac aagcaaaacc aaattaaggg	5820

ES 2 784 360 T3

	ccagctcatt cctcccactc atgatctata gatctataga tctctcgtgg gatcattgtt	5880
	tttctcttga ttcccacttt gtggttctaa gtactgtggt ttccaaatgt gtcagtttca	5940
5	tagcctgaag aacgagatca gcagcctctg ttccacatac acttcattct cagtattgtt	6000
	ttgccaaagt ctaattccat cagacctcga cctgcagccc ctagtcgagc gccagtagca	6060
	gcacccacgt ccaccttctg tctagtaatg tccaacacct ccctcagtcc aaacactgct	6120
10	ctgcatccat gtggctccca ttatatacctg aagcacttga tggggcctca atgttttact	6180
	agagcccacc ccctgcaac tctgagaccc tctggatttg tctgtcagtg cctcactggg	6240
	gcgttgata atttcttaaa aggtcaagtt ccctcagcag cattctctga gcagtctgaa	6300
15	gatgtgtgct ttccacagtt caaatccatg tggtgtgttc acccacctgc ctggccttg	6360
	gttatctatc aggacctagc ctagaagcag gtgtgtggca cttaacacct aagctgagt	6420
	actaactgaa cactcaagtg gatgccatct ttgtcacttc ttgactgtga cacaagcaac	6480
20	tcctgatgcc aaagccctgc ccacccctct catgccata tttggacatg gtacaggtcc	6540
	tcactggcca tggctctgtga ggtcctggtc ctctttgact tcataattcc taggggccac	6600
25	tagtatctat aagaggaaga ggggtgctggc tcccaggcca cagcccacaa aattccacct	6660
	gctcacaggt tggtctggtc gaccaggtg gtgtcccctg ctctgagcca gctccggcc	6720
	aagccagcac catgggaacc cccaagaaga agaggaaggt gcgtaccgat ttaaattcca	6780
30	atttactgac cgtacaccaa aatttgctg cattaccggt cgatgcaacg agtgatgagg	6840
	ttcgcaagaa cctgatggac atgttcaggg atcgccaggc gttttctgag catacctgga	6900
	aaatgcttct gtccgtttgc cggctcgtggg cggcatggtg caagttgaat aaccggaaat	6960
35	ggtttccgc agaacctgaa gatgttcgag attatcttct atatcttcag gcgcgcggtc	7020
	tggcagtaaa aactatccag caacatttg gccagctaaa catgcttcat cgtcgggtccg	7080
	ggctgccacg accaagtgac agcaatgctg ttctactggt tatgcggcgg atccgaaaag	7140
40	aaaacgttga tgccggtgaa cgtgcaaaac aggtcttagc gttcgaacgc actgatttgc	7200
	accaggttgc ttactcatg gaaaatagcg atcgctgcca ggatatacgt aatctggcat	7260
45	ttctggggat tgcttataac accctgttac gtatagccga aattgccagg atcagggtta	7320
	aagatatctc acgtactgac ggtgggagaa tgtaaatcca tattggcaga acgaaaacgc	7380
	tggttagcac cgaggtgta gagaaggcac ttagcctggg ggtaactaaa ctggtcgagc	7440
50	gatggatttc cgtctctggt gtagctgatg atccgaataa ctacctgttt tgccgggtca	7500
	gaaaaaatgg tgttgccgcg ccactctgcca ccagccagct atcaactcgc gccctggaag	7560
	ggatttttga agcaactcat cgattgattt acggcgctaa ggtaaatata aaatttttaa	7620
55	gtgtataatg tgtaaaacta ctgattctaa ttgtttgtgt attttaggat gactctggtc	7680

ES 2 784 360 T3

	agagatacct ggctgtgtct ggacacagtg cccgtgtcgg agccgcgcga gatatggccc	7740
	gcgctggagt ttcaataaccg gagatcatgc aagctggtgg ctggaccaat gtaaatattg	7800
5	tcatgaacta tatccgtaac ctggatagtg aacaggggc aatggtgcgc ctgctggaag	7860
	atggcgattg atctagataa gtaatgatca taatcagcca tatcacatct gtagaggttt	7920
	tacttgcttt aaaaaacctc ccacacctcc ccctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa	7980
10	ttgttgttgt taaacctgcc ctagtgcgg ccaattccag ctgagcgtga gctcaccatt	8040
	accagttggt ctggtgtcaa aaataataat aaccgggcag gggggatcta agctctagat	8100
15	aagtaatgat cataatcagc catatcacat ctgtagaggt ttacttgct ttaaaaaacc	8160
	tcccacacct cccctgaac ctgaaacata aaatgaatgc aattgttggt gttaacttgt	8220
	ttattgcagc ttataatggt taaaaataaa gcaatagcat cacaatttc acaataaag	8280
20	catttttttc actgcattct agttgtggtt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg	8340
	tctggatcct cgacataact tcgtataatg tatgctatac gaagttat	8388
25	<210> 9	
	<211> 17210	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencia de polinucleótidos de un locus C9ORF72 modificado desde el Exón 1a hasta la UTR 3'	
	<400> 9	

ES 2 784 360 T3

	cgtttgtagt gacagccatc ccaattgccc tttccttcta ggtggaaaagt ggtgtctaga	60
	cagtccaggg aggggtgtgcg agggaggtgc gttttggttg cctcagctcg caacttaact	120
5	ccacaacggt gaccaaggac aaaagaagga aacaagactg cagagatccg caccggggag	180
	ccctgcagat tctgggtctg ctgtggactg ggggcgggac tgcgactggg cgggcctggg	240
	ggcgtgtccg gggcggggcg gtcccggggc ggggcccgga gcgggctgcg gttgcggtcc	300
10	ctgcgccggc ggtgaaggcg cagcagcggc gagtgggtga gtgagacgcg cgggcggagg	360
	ggggctgctg ccacggtcg ctcgcgggccc ggccggctcc gggtagcagc ggggtttttt	420
	tctccttcga ggtgaactcc tccctgtccc ccgggcgaaa gagcccttg ccttgcagga	480
15	gttgcggggg ccgcggcggt gcggagggga tggggatggg cctcatcttt gctgtccgcc	540
	cgcgctcccc gatcccgacc cggagcgtct ccggggccct tgagggaacc ctccgggagt	600
20	acggcgagcg cggcccccac cgccacaagc ctggggcccca ggggcctggc ccggcgacag	660
	ctggtgggtc ctgcgaccca gtcaggtctc ccgaggggtcc ccgcccggga ggagaaagcg	720
	ccggtgggat ggagtaagga cggacagaac aacacgcagg caggatttcg cagaagtttg	780
25	caaggagtgc ggatgcccac ttacatgggc tgctactctt accaggttgt tccccagttc	840

ES 2 784 360 T3

	tgtgggaagt gacctggttg cctcacagct ccgcggttgt acagacttat taaaggaagt	900
	gaccattgtg acttgggcat cacttgactg atggtaatca gttgcagaga gagaagtga	960
5	ctgattaagt ctgtccacac agggctctgtc tggccaggag tgcatttgcc tgggagggat	1020
	tgggtgcgct ttctggtgtg gggactatta ggctcttgta gagttttgtc ccggcagatg	1080
	gataaatttc ttgttacct gttcccgttc gtcaccagtt gagaaaaacg ggtacacagt	1140
10	ctgtctcagt agtactttta ctttatatta agggcccaa agggactgga aaatacttta	1200
	agatagaatc gttagtccac ttggaaaact taaaatatga gagagagagg ggggggggag	1260
	agagagagag agagagagag agaaaggaag gaagaaggag gaagaggagg aggaaagaga	1320
15	ttgagattat gttaataata tggaatcaga atatttgaaa tatagtaagc gtcccctcag	1380
	ttaaagagga cattccagga ggcctccagt atagcctgaa atctcaggaa acgcctacat	1440
	acaccatcg tgtggatata ggtgttttcc cttcattaca ttccatacac agatgttaaa	1500
20	gtttagaaag taggcacaat aagagattac aaataactga taataaagtc gagccattgc	1560
	agctgctctg taaaagtcct gtgaatgtga tcgctttgtg tttcaaagta acttactgta	1620
	cttcaccctt gttaagcaaa acaagattca cctgaacgca ggcaccttg taccttggca	1680
25	gacaccagat ctgataacca agaggatgga gaagtagtgg cagacagtgt ggagagcatg	1740
	aatatgctag acaaaagggt gaatcataac ctaggagcag aaagcaggta tttcatcatc	1800
	ctccacagta aaacctatg tcacgtaaaa aacctacaag tagtttttct tttactcttt	1860
30	ttgaatgaaa gcttgctaca ggcactgaaa gttaaaataa tctgtggatc aggaggaaca	1920
	ggggttttct gtctgagtca ctgctgacta gcacctcagt gaccattggc actgtgggaa	1980
35	acccagagtg cagttggaaa cttcgaaaact aaagggtgac gtgttcttat ttcatagaac	2040
	acaaaaata agaggggtta cagcctgctg tgcagactgg acattcaaca agcatttaaa	2100
	tttctgggag acaaatgtaa atataacttt aaaagttggt aaaatactct gtttggctat	2160
40	gttggccatc caatgtttgc ttttagaaaa tgactgaatg gataaaacgt ctatcttttg	2220
	agcctgcct agaccccat gttgagtga tactgtccaa gtgttaggtt agccggcctg	2280
	agaaacttgg atctaggcaa gatggcacag tcctggtgtc atgagtatgc atgtgagttt	2340
45	tggctgaaat tgaacatttg tagagaatga caaaggctgg tctggcaagt agtccactgt	2400
	ctttacagtg gtcttggtta gttcctgttt ggctgagagg gctggttgat ggctgtcctg	2460
	cccctcttc cacaagtgga agccttatgg tataattctt gatcacagta gcagtaggca	2520
50	aatgaacttc ctcaaagcag cctggaaaagc tgattttttt ttctttcttt ctcttttttt	2580
	tttttttttc acaaggttaa agaaaaaaca aagggttca aatgtgccag tctgctaaca	2640
	gtgttaacat gtttattaac ataaataaac tttattagtt tttggaagta ttggttaagc	2700
55	cctcgtgacc cctgaactcg gtttatagag tgatgagtcg tagcctcact ctggtttgga	2760

ES 2 784 360 T3

	ctctggcttc tctcagaaga ctctgtggct aatgttaacc ttctgaagta gccagaaaac	2820
	atataagcaa aagtctgtga ggttgaaatg aatTTTTTtg ccacatttgt atatgggttc	2880
5	ccaccaatgc taacttcagg tgtagtaat atcagactca cagcttcctt gattacactt	2940
	cgctataaga ctttattttt taggtcatag gaatttcccc tttttcatga ttcctaaatc	3000
	atgaaataac atagtctaaa aatacggat tcttgaaata aacaatttct aagttttaag	3060
10	ctgcgtgcta ttctgaacag tctgatgccc tctttagctt tttactgtgt cctaccccgg	3120
	gcatgggtga ttcctttgtc caaacatctg tctgttgtat ccacactgga ttgcaccacc	3180
	tgcgtgctag tcagtcactc agacatttta gttataaggt agcttatatt tactccttat	3240
15	tttatttaat aatggcctca tagcaaggcg gtaatgatac tggtaatttg ggtttgctta	3300
	agaggagcca tgaagtagtt ttaaataaaa aggtgaaaat tcccactata gtttgagggg	3360
	ggaggctata ctggtactac tacgattcac ggtaagacta aatcttctgt gaaattatga	3420
20	aggagaaaaa gttacactgg tctggctctg ctgttggtat aattttatag ttataaccac	3480
	tgtacatgat aaataaccct aaaacaatga atttgtaggt ggatggcata atctgaaaac	3540
25	catgttctga gcagttgatg gcagcaggct gtgctggaag tgtaggcat atttatagat	3600
	ttcagcccaa gttctgaaga ggctggagag atggctcagt ggttaagagt gcttgctatt	3660
	gcagaggacc taggttcctc tacaggcacc aggcaagcgt gggacacact gagatacata	3720
30	cagacaaaac ataaaattaa ataaattgtg cataataata ctagtaatat atgagtaaaa	3780
	taaggataaa tacacatcat aattaaata ataaattgta aagttcccta gaagtgaggg	3840
	tcaccaagcc attcacaaga tggctgcgct gatgcaggga tatatgtgaa ctagaaaaag	3900
35	gtcaaactta acagagaagt tccaaggcat gctactgcag gcttggttag catgcttgac	3960
	ctgcagaaat gctgacggcc actgggaggt ttccacaaat gaggaattag aagaactttt	4020
	tttactaatc tccagaaaaa aaaaaggga gaagaaactg aagcagcctg tgatgtggac	4080
40	cagaaacgca gtgacagtaa catgtgtgac attgcaaagg catgaaagga cagagctgtg	4140
	gaatacagac ctcaggtgga gctcagcata gagtcattcg gggattatgc ctgctgcagc	4200
45	aacaaaagga tgagctcaaa agagacaccg acttctgaat gcagtggttg tttgttttgt	4260
	tttgtttcaa atgaattggg cagaaaactt tccagctgtg gaagcttctg aaccgtccct	4320
	tgctgctgac atctaagcgt ccgctgtgtc ccagctcagt gatctagggt cttccaaaca	4380
50	gatggccggg tgctgagcac tttgaatctc aatcctgagt ttctaccacg cctttggcca	4440
	tttaattccc agataaaaaga cacatacaac ctttatattt ataataaacc ttagtcagca	4500
	caagagctga gcaaatatct gtcctctatg ctattatatc tattaccacg ccaataaccc	4560
55	cattctataa tttgctgtgc ttcactctggg ctgctcttaa cttcagtcag ccagcccacg	4620

ES 2 784 360 T3

	tggccattat	tttaagattt	ttttacccca	tagtgtcttc	tcactttact	ttacattttt	4680
	ctctctctcc	tcatggttct	cctctgacct	caagcctagg	aaccctaaac	cccacccatg	4740
5	tctcttctgc	ccatctattg	gctgtaggca	tctttattca	ccaatcagga	taacttggag	4800
	gcaaggttaa	gtagtctcct	gggtctaggt	gctgtctctg	ggagcaacca	gtatttagca	4860
10	tagcaaaaga	ccagacctcc	acaatgatca	ctctgacct	cggggcagaa	ggcacctact	4920
	agcctgtgcc	actcacctca	ctttgttgaa	tcacatctta	tcctgtagtg	tgtatcactg	4980
	cctgttatca	caggaaaaag	tgagtcccat	caaataagat	gtttcagaaa	gagaccatgt	5040
15	tcataataatt	atcattctgg	taagctttta	atggttatat	tttgttatta	atctctttgt	5100
	tcctattttg	caaattatac	cttacagtaa	atatatatgc	atccaatggg	gtctttgaat	5160
	tcctccccgg	ggagtaggag	gactctttga	ggatgggctg	cattttaaagc	taaacaacgc	5220
20	aacatgacct	ttagtcctta	tagatagcct	agagatgaga	ctaaataaaa	gaaatggtat	5280
	ataatgcttt	aagtttccca	atcagcttaa	aagcttttcc	tataaatctt	taagattatg	5340
25	ctctggggct	caatactgct	tcaagaaggg	cttttctttt	gtatttagaa	ttattcacct	5400
	ttttaaacia	aaggagaaaa	tggaatagaa	atatgtttgc	aacataattt	tatgactatg	5460
	tgtttatctc	gcgtgttctg	tgggcctgca	gtttgctgct	gttaatgagg	acaacagtgg	5520
30	caccaataca	gtttccactc	agattacatt	ctctgttccc	tttctgaaag	ctgccctctc	5580
	cactgggccc	aaaagagtca	gtatcttaaa	caagctgtac	aacttagata	accatggtct	5640
	cttcagacta	gttaattgac	atatattaaa	aagtaaatag	taccaaagtg	aatttctgaa	5700
35	attaaaaatg	aacatttaaa	aactctaggt	aaactattcc	ttagagttaa	gtgttttgcc	5760
	aagttctgta	atcataatat	gatagaaacg	ctcactcagc	attctaaata	tagaagttac	5820
40	tccttcgcat	gacactctaa	ttcttgataa	ggtggagaaa	gagagagaga	gagggggaga	5880
	gacagaaaat	atggtgggtc	aaggaccatt	tgagggaatt	agttatgttc	ttccgtcctc	5940
	tgtggatctt	aggggttgaa	tacagtcatt	gagctcgggt	gatggctgtc	ctgttgaaag	6000
45	gtctgcccag	cagagcaaat	agactttttt	atttacatgg	acatccgttt	gtgactaatc	6060
	taatgttcac	tcccaaagta	atcacacaga	cagagaggta	gcttccttca	gtactcttac	6120
	cttacatgaa	tcctaccatt	ttgttatctt	ttttccactt	taaatctttg	attatgtgtt	6180
50	tttaattaga	aaatttgcat	acaaatttcc	atacagtatg	tagaattgac	tgtgtttgaa	6240
	tgggtgaaga	tccacatgtg	taaccctagc	tctggactgg	ctctgagctt	gtttgctctt	6300
55	ctcttttctg	ttctgagtaa	ctgaaactct	ttcatcttag	cagcttagta	tgcgccttcc	6360
	acattgctgt	gctgcctgct	gcactaacat	tactcctttg	cttatgttcc	ccttcctgat	6420
	tcagtgtcat	tttaagcagt	agtactggac	ctcagtacct	tagccggagc	tcactgaggt	6480
60	gacagggctg	aggctctgct	gctgtctttt	gagcttacct	ctttttaatg	ttttatggta	6540

ES 2 784 360 T3

	tttctgctgc caggtttggg ggttttgttt tgttttgttt tttgtttttt gtttttttta	6600
	atcttctagc aacacctaga aaacacaaac taggaaactt aaaagagcag cgtcttgctc	6660
5	cctgcgttct agaaagtcca agcctaatac cagtgtcatg gttgtcagga acatgagcct	6720
	ctgaaggctt cttgggaaac ctttcttgct tcaacacctc tgggtgcaag cagtagtcca	6780
	tggtagctct tctgtccacg gtcagcatcc cagtccctgc cctttatctt tgtgcagccg	6840
10	accagctttg ctttagtctg tctccttctc aggtctcctt ccccgctcct cttaagcaca	6900
	gcagtcattg gattagagcc catccttccc tcggatggcc catttgacct aattttacgt	6960
	atctgtaact aaggctccat ttacttacac agggccctcc ccttcctggt ttgttcttta	7020
15	gctgaaatgg tttggagacc aaatatccaa tcattacaat tgtgcacaag ctatgttcat	7080
	ttggaggtaa taaaggctca ttctttgctt ctattggtat gtgacatttt tctaagtcac	7140
20	ttgggggttg atagatatct ttaaattggt gaacctgatc actgttcttt tgtatgtccc	7200
	tgttttagcta ttgcaagcgt tcggataatg tgagacctgg aatgcagtga gacctgggat	7260
	gcaggggatg gtaccgattt aaatgatcca gtggctcctg agaggagaga ttgggagaat	7320
25	cccggtgtga cacagctgaa cagactagcc gccaccctc cctttgcttc ttggagaaac	7380
	agttaggaag ctaggacaga cagaccaagc cagcaactca gatctttgaa cggggagtgg	7440
	agatttgcct ggtttccggc accagaagcg gtgccggaaa gctggctgga gtgcgatctt	7500
30	cctgaggccg atactgtcgt cgtccctcca aactggcaga tgcacggtta cgatgcgcc	7560
	atctacacca acgtgacctt tccattacg gtcaatccgc cgtttgttcc cacggagaat	7620
	ccgacgggtt gttactcgtt cacatttaat gttgatgaaa gctggctaca ggaaggccag	7680
35	acgcgaatta tttttgatgg cgttaactcg gcgtttcatc tgtggtgcaa cgggcgctgg	7740
	gtcggttacg gccaggacag tcgtttgccg tctgaatttg acctgagcgc atttttacgc	7800
40	gccggagaaa accgcctcgc ggtgatggtg ctgcgctgga gtgacggcag ttatctggaa	7860
	gatcaggata tgtggcggat gagcggcatt ttccgtgacg tctcgttgct gcataaacgc	7920
	actacacaaa tcagcgattt ccatgttgcc actcgttcta atgatgattt cagccgcgct	7980
45	gtactggagg ctgaagttca gatgtgcggc gagttgctg actacctacg ggtaacagtt	8040
	tctttatggc agggtgaaac gcaggtcgcc agcggcaccg cgcctttcgg cggtgaaatt	8100
	atcgatgagc gtggtggtta tgccgatcgc gtcacactac gtctgaacgt cgaaaaccgc	8160
50	aaactgtgga gcgcgaaat cccgaatctc tatcgtgcgg tggttgaact gcacaccgcc	8220
	gacggcacgc tgattgaagc agaagcctgc gatgtcgggt tccgcgaggt gcggattgaa	8280
	aatggtctgc tgctgctgaa cggcaagccg ttgctgattc gaggcgttaa ccgtcacgag	8340
55	catcatcctc tgcatggtca ggtcatggat gacgagacga tgggtgcagga tatcctgctg	8400

ES 2 784 360 T3

	atgaagcaga acaactttaa cgcctgtcgc tgttcgcatt atccgaacca tccgctgtgg	8460
	tacacgctgt gcgaccgcta cggcctgtat gtggtggatg aagccaatat tgaaacccac	8520
5	ggcatggtgc caatgaatcg tctgaccgat gatccgcgct ggctaccggc gatgagcgaa	8580
	cgcgtaacgc gaatggtgca gcgcatcgt aatcaccgga gtgtgatcat ctggtcgctg	8640
	gggaatgaat caggccacgg cgctaatacac gacgcgctgt atcgctggat caaatctgtc	8700
10	gatccttccc gcccggtgca gtatgaaggc ggcggagccg acaccacggc caccgatatt	8760
	atttgccoga tgtacgcgog cgtggatgaa gaccagccct tcccggctgt gccgaaatgg	8820
	tocatcaaaa aatggctttc gtacactgga gagacgcgcc cgctgatcct ttgcgaatac	8880
15	gccacgcoga tgggtaacag tcttggcggg ttcgctaaat actggcaggc gtttcgtcag	8940
	tatccccgtt tacagggcgg cttcgtctgg gactgggtgg atcagtcgct gattaaatat	9000
	gatgaaaacg gcaaccctgt gtcggcttac ggcggtgatt ttggcgatac gccgaacgat	9060
20	cgccagtctt gtatgaacgg tctggtcttt gccgaccgca cgccgcaccc agcgtgacg	9120
	gaagcaaaac accagcagca gtttttccag ttccgtttat ccgggcaaac catcgaagtg	9180
	accagcgaat acctgttccg tcatagcgat aacgagctcc tgcaactggat ggtggcgctg	9240
25	gatggtaagc cgctggcaag cgggtgaagtg cctctggatg tcgctccaca aggtaaacag	9300
	ttgattgaac tgccctgaact accgcagccg gagagcgccg ggcaactctg gctcacagta	9360
	cgcgtagtgc aaccgaacgc gaccgcatgg tcagaagccg ggcacatcag cgctggcag	9420
30	cagtggcgtc tggcggaata cctcagtgtg acgctccccg ccgctgccca cgccatcccg	9480
	catctgacca ccagcgaat ggatttttgc atcgagctgg gtaataagcg ttggcaattt	9540
	aaccgccagt caggctttct ttacagatg tggattggcg ataaaaaca actgctgacg	9600
35	ccgctgcgcg atcagttcac ccgtgcaccg ctggataacg acattggcgt aagtgaagcg	9660
	acccgcattg accctaacgc ctgggtcgaa cgctggaagg cggcgggcca ttaccaggcc	9720
	gaagcagcgt tgttgacgtg cacggcagat acacttgctg atgcggtgct gattacgacc	9780
40	gctcacgcgt ggcagcatca ggggaaaacc ttatttatca gccggaaaac ctaccggatt	9840
	gatggtagtg gtcaaattggc gattaccgtt gatgttgaag tggcgagcga tacaccgcat	9900
45	ccggcgcgga ttggcctgaa ctgccagctg gcgcaggtag cagagcgggt aaactggctc	9960
	ggattagggc cgcaagaaaa ctatcccgcg cgccttactg ccgcctgttt tgaccgctgg	10020
	gatctgccat tgtcagacat gtataccccg tacgtcttcc cgagcgaaaa cggctctgcg	10080
50	tgcgggacgc gcgaattgaa ttatggccca caccagtggc gcggcgactt ccagttaac	10140
	atcagccgct acagtcaaca gcaactgatg gaaaccagcc atcgccatct gctgcacgcg	10200
	gaagaaggca catggctgaa tatcgacggt ttccatatgg ggattggtgg cgacgactcc	10260
55	tggagccogt cagtatcggc ggaattccag ctgagcgccg gtcgctacca ttaccagttg	10320

ES 2 784 360 T3

	gtctggtgtc	aaaaataata	ataaccgggc	aggggggatc	taagctctag	ataagtaatg	10380
	atcataatca	gccatatcac	atctgtagag	gttttacttg	ctttaaaaaa	cctcccacac	10440
5	ctccccctga	acctgaaaca	taaaatgaat	gcaattgttg	ttgttaactt	gtttattgca	10500
	gcttataatg	gttacaaata	aagcaatagc	atcacaaatt	tcacaaataa	agcatttttt	10560
	tcactgcatt	ctagtgtgtg	tttgtccaaa	ctcatcaatg	tatcttatca	tgtctggatc	10620
10	ccccggctag	agtttaaaca	ctagaactag	tggatccccg	ggctcgataa	ctataacggt	10680
	cctaaggtag	cgactcgaga	taacttcgta	taatgtatgc	tatacgaagt	tatatgcatg	10740
	gcctccgcgc	cgggttttgg	cgcctccgcg	gggcgcccc	ctcctcacgg	cgagcgctgc	10800
15	cacgtcagac	gaagggcgca	gcgagcgcc	tgatccttcc	gcccggacgc	tcaggacagc	10860
	ggcccgcgtc	tcataagact	cggccttaga	accccagtat	cagcagaagg	acatttttagg	10920
	acgggacttg	ggtgactcta	gggactgggt	tttctttcca	gagagcggaa	caggcgagga	10980
20	aaagtagtcc	cttctcggcg	attctgcgga	gggatctccg	tggggcggtg	aacgccgatg	11040
	attatataag	gacgcgccgg	gtgtggcaca	gctagtcccg	tcgcagccgg	gatttggtgc	11100
25	gcggttcttg	tttgtggatc	gctgtgatcg	tcacttggtg	agtagcgggc	tgtctgggctg	11160
	gccggggcct	tcgtggccgc	cgggcccgtc	ggtgggacgg	aagcgtgtgg	agagaccgcc	11220
	aagggctgta	gtctgggtcc	gcgagcaagg	ttgccctgaa	ctggggggtg	gggggagcgc	11280
30	agcaaaatgg	cggctgttcc	cgagtcttga	atggaagacg	cttgtgaggc	gggctgtgag	11340
	gtcgttgaag	caaggtgggg	ggcatggtgg	gcggcaagaa	cccaaggctc	tgaggccctc	11400
	gctaatacgg	gaaagctctt	attcgggtga	gatgggctgg	ggcaccatct	ggggaccctg	11460
35	acgtgaagtt	tgtcactgac	tggagaactc	ggtttgtcgt	ctgttcgggg	ggcggcagtt	11520
	atggcggtgc	cgttgggcag	tgcacccgta	cctttgggag	cgcgcgccct	cgtcgtgtcg	11580
	tgcagtcacc	cgttctgttg	gcttataatg	cagggtgggg	ccacctgccg	gtaggtgtgc	11640
40	ggtaggcttt	tctccgtcgc	aggacgcagg	gttcgggcct	agggtaggct	ctcctgaatc	11700
	gacaggcgcc	ggacctctgg	tgaggggagg	gataagttag	gcgtcagttt	ctttgggtcgg	11760
45	ttttatgtac	ctatcttctt	aagtagctga	agctccggtt	ttgaactatg	cgctcggggt	11820
	tggcgagtgt	gttttgtgaa	gttttttagg	caccttttga	aatgtaatca	tttgggtcaa	11880
	tatgtaattt	tcagtgttag	actagtaa	tgccgctaa	attctggccg	tttttggtct	11940
50	ttttgttaga	cgtgttgaca	attaatcatc	ggcatagtat	atcggcatag	tataatacga	12000
	caaggtgagg	aactaaacca	tgggatcggc	cattgaacaa	gatggattgc	acgcaggttc	12060
	tccggccgct	tgggtggaga	ggctattcgg	ctatgactgg	gcacaacaga	caatcggctg	12120
55	ctctgatgcc	gccgtgttcc	ggctgtcagc	gcaggggcgc	ccggttcttt	ttgtcaagac	12180

ES 2 784 360 T3

	cgacctgtcc ggtgccctga atgaactgca ggacgaggca gcgcggctat cgtggctggc	12240
	cacgacgggc gttccttgcg cagctgtgct cgacgttgtc actgaagcgg gaagggactg	12300
5	gctgctattg ggogaagtgc cggggcagga tctcctgtca tctcaccttg ctccctgccga	12360
	gaaagtatcc atcatggctg atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc cggctacctg	12420
	cccattcgac caccaagcga aacatcgcat cgagcgagca cgtactcgga tggaaaccgg	12480
10	tcttgctgat caggatgatc tggacgaaga gcatcagggg ctgcgccag ccgaactgtt	12540
	cgccaggctc aaggcgcgca tgcccgacgg cgatgatctc gtcgtgacct atggcgatgc	12600
	ctgcttgccg aatatcatgg tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg	12660
15	gctgggtgtg gcggaccgct atcaggacat agcgttggct acccgtgata ttgctgaaga	12720
	gcttgccggc gaatgggctg accgcttcct cgtgctttac ggtatcgccg ctcccgatcc	12780
	gcagcgcatc gccttctatc gccttcttga cgagttcttc tgaggggatc cgctgtaagt	12840
20	ctgcagaaat tgatgatcta ttaacaata aagatgtcca ctaaaatgga agtttttctc	12900
	gtcatacttt gttaagaagg gtgagaacag agtacctaca ttttgaatgg aaggattgga	12960
	gctacggggg tgggggtggg gtgggattag ataaatgcct gctctttact gaaggctctt	13020
25	tactattgct ttatgataat gtttcatagt tggatatcat aatttaaaca agcaaaacca	13080
	aattaagggc cagctcattc ctccactca tgatctatag atctatagat ctctcgtggg	13140
	atcattgttt ttctcttgat tcccactttg tggttctaag tactgtggtt tccaaatgtg	13200
30	tcagtttcat agcctgaaga acgagatcag cagcctctgt tccacataca cttcattctc	13260
	agtattgttt tgccaagttc taattccatc agacctcgac ctgcagcccc tagtcgagcg	13320
35	ccagtagcag caccacgctc caccttctgt ctagtaaatgt ccaacacctc cctcagtcca	13380
	aacactgctc tgcattcatg tggctcccat ttatacctga agcacttgat ggggcctcaa	13440
	tgttttacta gagccacccc ccctgcaact ctgagaccct ctggatttgt ctgtcagtgc	13500
40	ctcactgggg cgttggataa tttcttaaaa ggtcaagttc cctcagcagc attctctgag	13560
	cagtctgaag atgtgtgctt ttcacagttc aaatccatgt ggctgtttca ccacactgcc	13620
	tggccttggg ttatctatca ggacctagcc tagaagcagg tgtgtggcac ttaacaccta	13680
45	agctgagtga ctaactgaac actcaagtgg atgccatctt tgtcacttct tgactgtgac	13740
	acaagcaact cctgatgcca aagccctgcc caccctctc atgccatat ttggacatgg	13800
	tacaggtcct cactggccat ggtctgtgag gtccctgtcc tctttgactt cataattcct	13860
50	aggggccact agtatctata agaggaagag ggtgctggct ccaggccac agcccacaaa	13920
	attccacctg ctacacaggtt ggctggctcg acccaggtgg tgtcccctgc tctgagccag	13980
	ctcccgcca agccagcacc atgggaaccc ccaagaagaa gaggaaggtg cgtaccgatt	14040
55	taaattccaa tttactgacc gtacaccaa atttgcctgc attaccggtc gatgcaacga	14100

ES 2 784 360 T3

	gtgatgaggt tgcgaagaac ctgatggaca tgttcaggga tcgccaggcg ttttctgagc	14160
	atacctggaa aatgcttctg tccgtttgcc ggtcgtgggc ggcctggtgc aagttgaata	14220
5	accggaaatg gtttcccgca gaacctgaag atgttcgcga ttatcttcta tatcttcagg	14280
	cgcgcggtct ggcagtaaaa actatccagc aacatttggtg ccagctaaac atgcttcata	14340
	gtcgggtccgg gctgccacga ccaagtgaac gcaatgctgt ttcactgggt atgcccggga	14400
10	tccgaaaaga aaacgttgat gccgggtgaac gtgcaaaaca ggctctagcg ttcgaacgca	14460
	ctgatttcga ccagggttcgt tcaactcatgg aaaatagcga tcgctgccag gatataccta	14520
	atctggcatt tctggggatt gcttataaca ccctgttacg tatagccgaa attgccagga	14580
15	tcagggttaa agatatctca cgtactgacg gtgggagaat gttaatccat attggcagaa	14640
	cgaaaacgct ggtagcacc gcagggtgtag agaaggcact tagcctgggg gtaactaaac	14700
	tggctcagcg atggatttcc gtctctggtg tagctgatga tccgaataac tacctgtttt	14760
20	gccgggtcag aaaaaatggt gttgccgcgc catctgccac cagccagcta tcaactcgcg	14820
	ccctggaagg gatttttgaa gcaactcatc gattgattta cggcgctaag gtaaataata	14880
25	aatttttaag tgtataatgt gttaaaactac tgattctaata tgtttgtgta ttttaggatg	14940
	actctggtca gagatacctg gcctggtctg gacacagtgc ccgtgtcgga gccgcgcgag	15000
	atatggcccg cgctggagtt tcaataccgg agatcatgca agctggtggc tggaccaatg	15060
30	taaatattgt catgaactat atccgtaacc tggatagtag aacaggggca atggtgcgcc	15120
	tgctggaaga tggcgattga tctagataag taatgatcat aatcagccat atcacatctg	15180
	tagagggttt acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa	15240
35	tgaatgcaat tgtgtgtgtt aaacctgccc tagttgcggc caattccagc tgagcgtgag	15300
	ctcaccatta ccagttggtc tgggtgtcaaa aataataata accgggcagg ggggatctaa	15360
	gctctagata agtaatgatc ataatacagc atatacacatc tgtagagggt ttacttgctt	15420
40	taaaaaacct cccacacctc cccctgaacc tgaaacataa aatgaatgca attgttgttg	15480
	ttaacttgtt tattgcagct tataatgggt acaataaaag caatagcatc acaaatttca	15540
45	caaataaagc atttttttca ctgcattcta gttgtggttt gtccaaactc atcaatgtat	15600
	cttatcatgt ctggatcctc gacataactt cgtataatgt atgctatacg aagttattgc	15660
	tagcgtgtct cagcagtggtg tgggcacatc cttcctcccg agtcctgctg caggacaggg	15720
50	tacactacac ttgtcagtag aagtctgtac ctgatgtcag gtgcatcggt acagtgaatg	15780
	actcttcta gaatagatgt actcttttag ggccttatgt ttacaattat cctaagtact	15840
	attgctgtct tttaaagata tgaatgatgg aatatacact tgaccataac tgctgattgg	15900
55	ttttttgttt tgttttgttt gttttcttgg aaacttatga ttcctgggtt acatgtacca	15960

ES 2 784 360 T3

	cactgaaacc	ctcgttagct	ttacagataa	agtgtgagtt	gacttcctgc	ccctctgtgt	16020
	tctgtggtat	gtccgattac	ttctgccaca	gctaaacatt	agagcattta	aagtttgcag	16080
5	ttcctcagaa	aggaacttag	tctgactaca	gattagttct	tgagagaaga	cactgatagg	16140
	gcagagctgt	aggtgaaatc	agttgttagc	ccttccttta	tagacgtagt	ccttcagatt	16200
	cggctctgtac	agaaatgccg	aggggtcatg	catgggccct	gagtatcgtg	acctgtgaca	16260
10	agttttttgt	tggtttattg	tagttctgtc	aaagaaagtg	gcatttgttt	ttataattgt	16320
	tgccaacttt	taaggttaat	tttcattatt	tttgagccga	attaaaatgc	gcacctcctg	16380
	tgcctttccc	aatcttgga	aatataat	cttggcagag	ggtcagattt	cagggcccag	16440
15	tcactttcat	ctgaccacc	tttgacggc	tgccgtgtgc	ctggcttaga	ttagaagtcc	16500
	ttgttaagta	tgtcagagta	cattcgctga	taagatcttt	gaagagcagg	gaagcgtctt	16560
20	gcctctttcc	tttggtttct	gcctgtactc	tggtgtttcc	cgtgtcacct	gcatcatagg	16620
	aacagcagag	aaatctgacc	cagtgtctatt	tttctaggtg	ctactatggc	aaactcaagt	16680
	ggtctgtttc	tgttcctgta	acgttcgact	atctcgctag	ctgtgaagta	ctgattagt	16740
25	gagttctgtg	caacagcagt	gtaggagtat	acacaaacac	aaatatgtgt	ttctatttaa	16800
	aactgtggac	ttagcataaa	aagggaaga	atatttattt	tttacaaaag	ggataaaaat	16860
	gggccccgtt	cctcaccac	cagatttagc	gagaaaaagc	tttctattct	gaaaggtcac	16920
30	ggtggctttg	gcattacaaa	tcagaacaac	acacactgac	catgatggct	tgtgaactaa	16980
	ctgcaaggca	ctccgtcatg	gtaagcgagt	aggtcccacc	tcctagtgtg	ccgctcattg	17040
35	ctttacacag	tagaatctta	tttgagtgtc	aattgttgtc	tttgctgctt	tactgtgttg	17100
	ttatagaaaa	tgtaagctgt	acagtgaata	agttattgaa	gcatgtgtaa	acactgttat	17160
	atatcttttc	tcctagatgg	ggaattttga	ataaaatacc	tttgaaattc		17210

REIVINDICACIONES

1. Un roedor que comprende en su genoma una delección de la porción codificante del exón 2 hasta la porción codificante del exón 11 de un locus *C9orf72* endógeno, en donde el roedor desarrolla uno o más síntomas de (i) desregulación o disfunción del sistema inmunitario y/o (ii) anomalías motoras y neurológicas similares a las encontradas en enfermedades de las neuronas motoras humanas.
2. El roedor de conformidad con la reivindicación 1, en donde el locus *C9orf72* comprende un gen indicador.
3. El roedor de conformidad con la reivindicación 2, en donde el gen indicador se une operativamente a un promotor de *C9orf72*, en donde opcionalmente el promotor de *C9orf72* es un promotor endógeno.
4. El roedor de conformidad con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde el gen indicador se une operativamente al exón 1 del locus *C9orf72*.
5. El roedor de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en donde el gen indicador se selecciona del grupo que consiste en *lacZ*, luciferasa, proteína fluorescente verde (GFP), GFP mejorada (eGFP), proteína fluorescente cian (CFP), proteína fluorescente amarilla (YFP), proteína fluorescente amarilla mejorada (eYFP), proteína fluorescente azul (BFP), proteína fluorescente azul mejorada (eBFP), DsRed y MmGFP.
6. El roedor de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el roedor es una rata o un ratón.
7. El roedor de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el roedor desarrolla uno o más síntomas de esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y/o demencia frontotemporal (FTD) durante el desarrollo, opcionalmente después de aproximadamente 36 semanas de edad o después de aproximadamente 40 semanas de edad.
8. El roedor de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el roedor desarrolla déficits motores progresivos después de aproximadamente 36 semanas de edad, desarrolla una patología de las neuronas motoras inferiores después de aproximadamente 40 semanas de edad, y/o desarrolla una disminución en el peso corporal después de aproximadamente 36 semanas de edad.
9. El roedor de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el roedor desarrolla uno o más de las siguientes:
 - (i) disfunción mitocondrial en neuronas motoras, en donde la disfunción mitocondrial se **caracteriza por** una disminución en uno o más de respiración mitocondrial, respiración basal, respiración máxima, capacidad respiratoria de reserva, producción de ATP y fuga de protones; o **caracterizada por** un aumento en la relación de ADN mitocondrial con respecto a nuclear en comparación con la relación de ADN mitocondrial con respecto a nuclear de las neuronas motoras de un roedor control o de referencia;
 - (ii) uno o más síntomas de glomerulonefritis, opcionalmente después de aproximadamente 35 semanas de edad o después de aproximadamente 35-41 semanas de edad inclusive;
 - (iii) esplenomegalia después de aproximadamente 8 semanas de edad;
 - (iv) linfadenopatía después de aproximadamente 8 semanas de edad, en donde opcionalmente la linfadenopatía es palpable después de aproximadamente 12-18 semanas de edad inclusive;
 - (v) una infiltración de uno o más macrófagos, monocitos y granulocitos en el bazo, los ganglios linfáticos cervicales, la médula ósea y/o la sangre; y/o una infiltración de macrófagos F4/80+ en el riñón y/o el hígado, en donde opcionalmente la infiltración es detectable después de aproximadamente 8 semanas de edad y hasta 60 semanas de edad;
 - (vi) una infiltración de macrófagos F4/80+ en el riñón después de aproximadamente 35 semanas de edad;
 - (vii) un mayor nivel de citocinas en suero de una o más de IL-10, IL-12, IL-17, IFN- γ , TNF- α y MCP-1 después de aproximadamente 8 semanas de edad;
 - (viii) un nivel sérico aumentado de IL-12 después de aproximadamente 8 semanas de edad que es aproximadamente 6 veces o más en comparación con un animal no humano de referencia o control;
 - (ix) enfermedad renal **caracterizada por** una membrana basal engrosada, formación de cilindros, deposición del complejo inmunitario, glomerulonefritis membranoproliferativa, inflamación mononuclear intersticial, glomeruloesclerosis, túbulos basófilos, o combinaciones de estos, después de aproximadamente 28-35 semanas de edad, inclusive;
 - (x) un aumento de la población de células dendríticas mieloides en uno o más de bazo, ganglios linfáticos, médula ósea, riñones y sangre después de aproximadamente 28-35 semanas de edad inclusive, en donde opcionalmente la población de células dendríticas mieloides se caracteriza como CD45+CD11b+CD11c+MHCII+;
 - (xi) un nivel sérico aumentado de uno o más autoanticuerpos después de aproximadamente 8 semanas de edad, en donde opcionalmente se seleccionan uno o más autoanticuerpos entre anticuerpos anti-factor reumatoide (anti-RF), anticuerpos anti-ADNbc, anticuerpos antinucleares (ANA), anticuerpos anti-Smith (anti-Sm), anticuerpos anti-cardiolipina y combinaciones de estos;

(xii) un nivel aumentado de macrófagos F4/80+ en uno o más de bazo, ganglios linfáticos, médula ósea, riñón y sangre después de aproximadamente 28-35 semanas de edad inclusive, en donde opcionalmente los macrófagos F4/80+ se caracterizan como CD45+CD11b+F4/80+Ly6G-;

(xiii) un aumento de la población de células T en uno o más de bazo, ganglios linfáticos, médula ósea, riñones y sangre después de aproximadamente 28-35 semanas de edad inclusive, en donde opcionalmente la población de células T se caracteriza como CD8+CD44+, CD8+CD69+, CD8+PD1+, CD4+CD44+, CD4+CD69+ o CD4+PD1+;

(xiv) un aumento de la población de células T reguladoras en el bazo y/o ganglios linfáticos después de aproximadamente 28-35 semanas de edad inclusive, y en donde la población de células T reguladoras se caracteriza como CD4+FoxP3+; o un aumento de las células T foliculares auxiliares (Tfh) en el bazo, los ganglios linfáticos y/o la sangre después de aproximadamente 26 semanas de edad, y en donde la población de células Tfh se caracteriza como CD4+CXCR5+CD44+ICOS+PD-1+Bcl-6+;

(xv) un aumento de la población de células plasmáticas en uno o más de bazo, ganglios linfáticos y médula ósea después de aproximadamente 8-60 semanas inclusive, en donde opcionalmente la población de células plasmáticas se caracteriza como CD45+CD19-B220-CD138+ o CD45+CD19intB220intCD138+;

(xvi) síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (ALPS); o

(xvii) nefritis lúpica.

10. Una célula o tejido de roedor aislado cuyo genoma comprende una delección de la porción codificante del exón 2 hasta la porción codificante del exón 11 de un locus *C9orf72* endógeno.

11. Una línea celular inmortalizada creada a partir de la célula de roedor aislada de conformidad con la reivindicación 10.

12. Una célula madre embrionaria de roedor cuyo genoma comprende una delección de la porción codificante del exón 2 hasta la porción codificante del exón 11 de un locus *C9orf72* endógeno.

13. Un embrión de roedor generado a partir de la célula madre embrionaria de conformidad con la reivindicación 12.

14. Un método para crear un roedor cuyo genoma comprende una delección de la porción codificante del exón 2 hasta la porción codificante del exón 11 de un locus *C9orf72* endógeno, el método comprende: modificar el genoma de un roedor para que comprenda la delección de la porción codificante del exón 2 hasta la porción codificante del exón 11 del locus *C9orf72* endógeno, lo que crea de esta manera dicho roedor, en donde el roedor desarrolla uno o más síntomas de (i) disregulación o disfunción del sistema inmunitario y (ii) anomalías motoras y neurológicas similares a las encontradas en enfermedades de las neuronas motoras humanas.

15. El método de conformidad con la reivindicación 14, en donde la modificación se logra mediante un proceso que comprende:

(a) introducir una secuencia de ácido nucleico en una célula madre embrionaria de roedor para que la porción codificante del exón 2 hasta la porción codificante del exón 11 del locus *C9orf72* endógeno se elimina, cuya secuencia de ácido nucleico comprende un polinucleótido que es homólogo al locus *C9orf72*;

(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 donde opcionalmente la secuencia de ácido nucleico comprende uno o más marcadores de selección y en donde opcionalmente la secuencia de ácido nucleico comprende uno o más sitios de recombinación específica de sitio.

16. El método de conformidad con la reivindicación 15, en donde la secuencia de ácido nucleico comprende un gen de recombinasa y un marcador de selección flanqueado por sitios de reconocimiento de recombinasa, cuyos sitios de reconocimiento de recombinasa se orientan para dirigir una escisión, en donde opcionalmente la secuencia de ácido nucleico comprende además un gen indicador que está opcionalmente aguas abajo del marcador de selección, en donde opcionalmente el gen recombinasa se une operativamente a un promotor que impulsa la expresión del gen de recombinasa en células diferenciadas y no impulsa la expresión del gen recombinasa en células indiferenciadas.

17. El método de conformidad con la reivindicación 16, en donde el gen de recombinasa se une operativamente a un promotor que es transcripcionalmente competente y regulado por el desarrollo, en donde opcionalmente el promotor es o comprende la SEQ ID NO: 5, la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 7.

18. El método de conformidad con la reivindicación 14, en donde el locus *C9orf72* comprende un gen indicador, en donde opcionalmente el gen indicador se une operativamente a un promotor de *C9orf72*, y en donde opcionalmente el promotor de *C9orf72* es un promotor endógeno.

19. El método de conformidad con la reivindicación 18, el gen indicador se une operativamente al exón 1 del locus *C9orf72*.

20. El método de conformidad con la reivindicación 18 o 19, en donde el gen indicador se selecciona del grupo que consiste en *lacZ*, luciferasa, GFP, eGFP, CFP, YFP, eYFP, BFP, eBFP, DsRed y MmGFP.
- 5 21. El método de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 14-20, en donde el roedor es un ratón o una rata.
- 10 22. Un método para identificar un candidato terapéutico para el tratamiento de uno o más síntomas de (i) desregulación o disfunción del sistema inmunitario y (ii) anomalías motoras y neurológicas similares a las encontradas en enfermedades de las neuronas motoras humanas en un roedor, el método comprende
 - (a) administrar un agente candidato a un roedor de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9;
 - (b) realizar uno o más ensayos para determinar si el agente candidato tiene un efecto sobre uno o más síntomas de (i) desregulación o disfunción del sistema inmunitario y (ii) anomalías motoras y neurológicas similares a las encontradas en enfermedades de las neuronas motoras humanas; e
 - 15 (c) identificar el agente candidato que tiene un efecto sobre uno o más síntomas de (i) desregulación o disfunción del sistema inmunitario y (ii) anomalías motoras y neurológicas similares a las encontradas en enfermedades de las neuronas motoras humanas como el candidato terapéutico.
- 20 23. El método de conformidad con la reivindicación 22, en donde el uno o más síntomas de (i) desregulación o disfunción del sistema inmunitario y (ii) anomalías motoras y neurológicas similares a las encontradas en enfermedades de las neuronas motoras humanas se seleccionan del grupo que consiste en una enfermedad o afección neurodegenerativa, una enfermedad o afección inflamatoria, una enfermedad o afección autoinmunitaria, lupus eritematoso sistémico (SLE), síndrome linfoproliferativo autoinmune (ALPS) y nefritis lúpica opcionalmente en donde ALPS se **caracteriza por** un nivel sérico aumentado de IL-10, anticuerpos anti-factor reumatoide (anti-RF), anticuerpos antinucleares (ANA) o combinaciones de estos; en donde la nefritis lúpica se **caracteriza por**
25 proliferación y/o expansión mesangeal, o por una o más anomalías tubulares y en donde opcionalmente la enfermedad o afección neurodegenerativa es esclerosis lateral amiotrófica (ALS) o demencia frontotemporal (FTD), en donde la enfermedad o afección inflamatoria es glomerulonefritis, o en donde la enfermedad o afección autoinmunitaria es la glomerulonefritis.

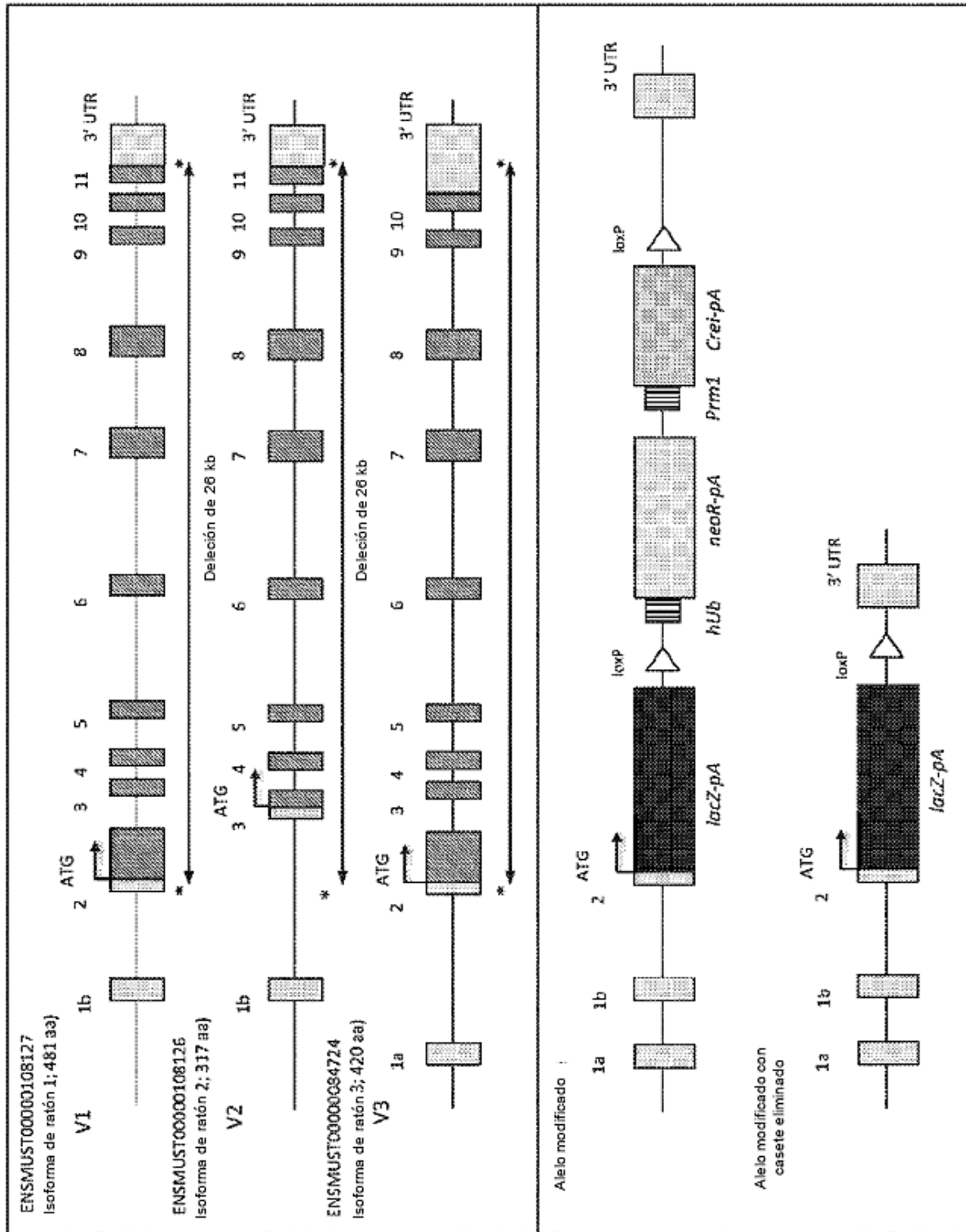


Figura 1A

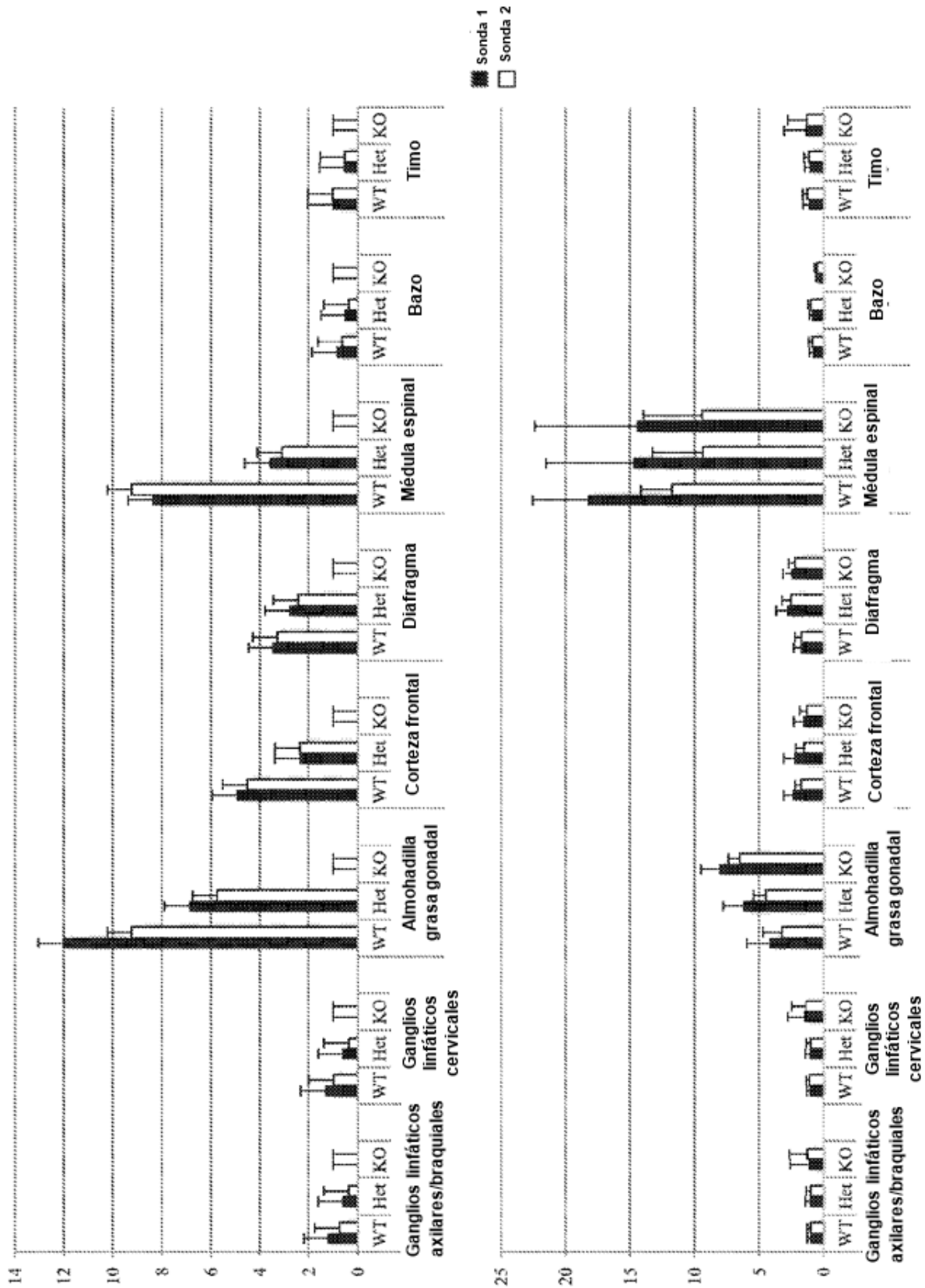


Figura 1B

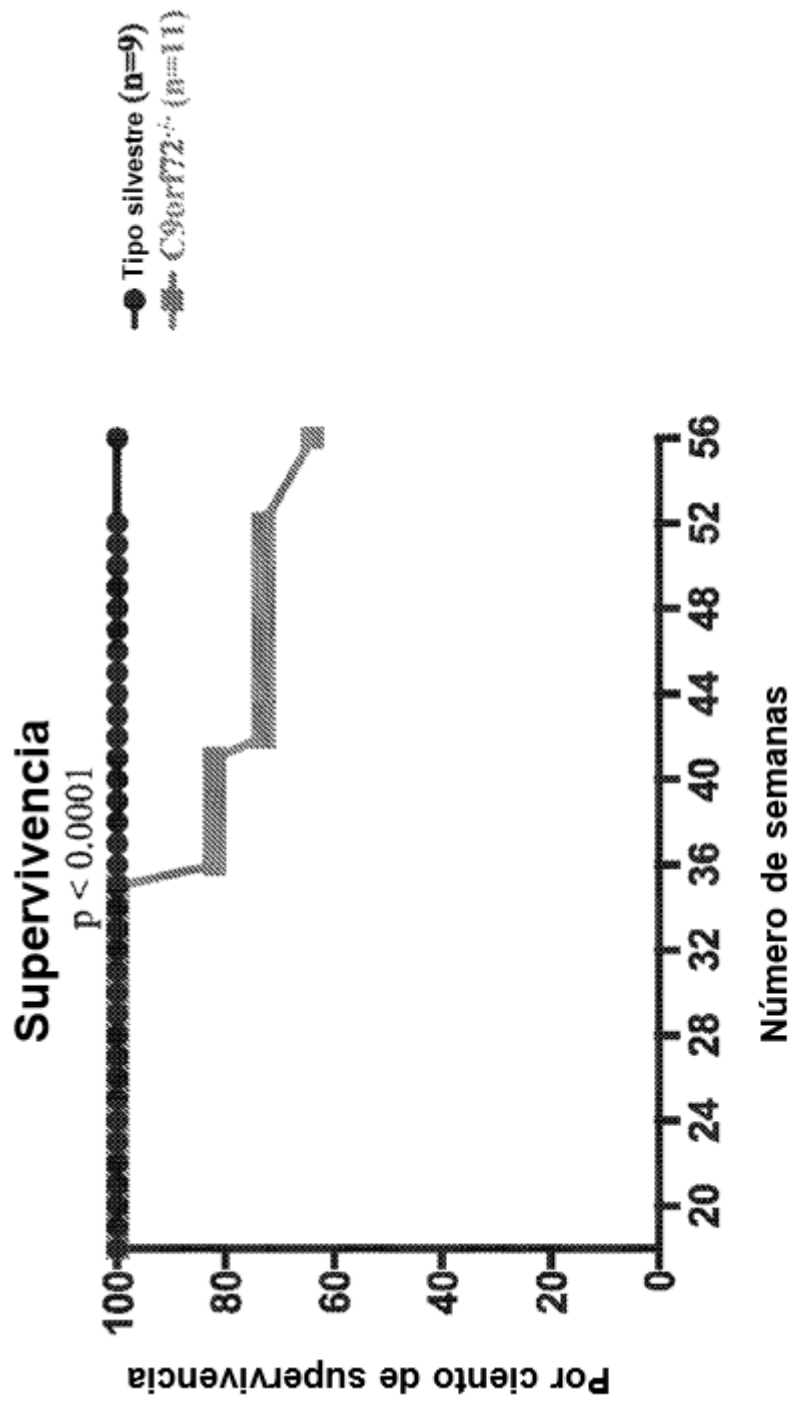


Figura 2A

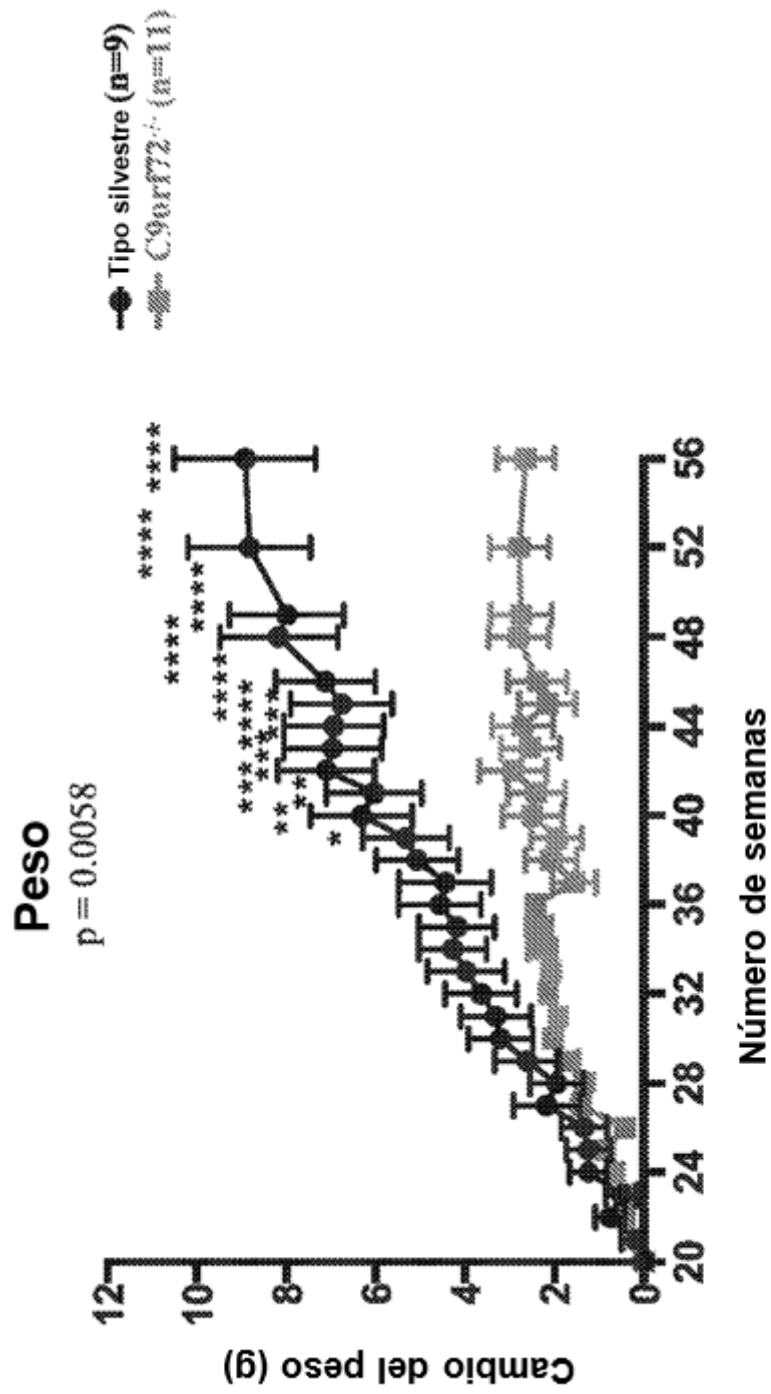


Figura 2B

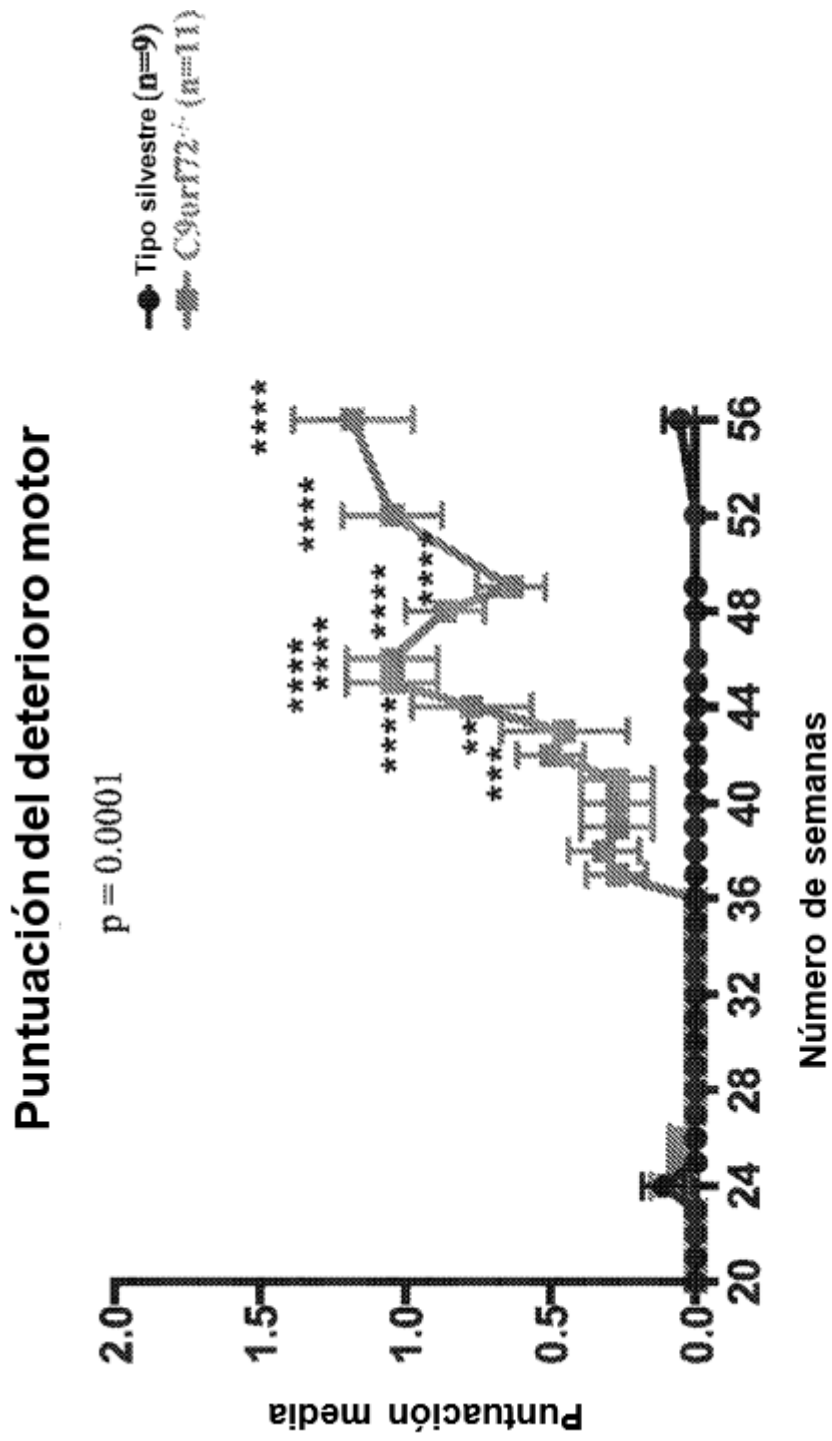


Figura 2C

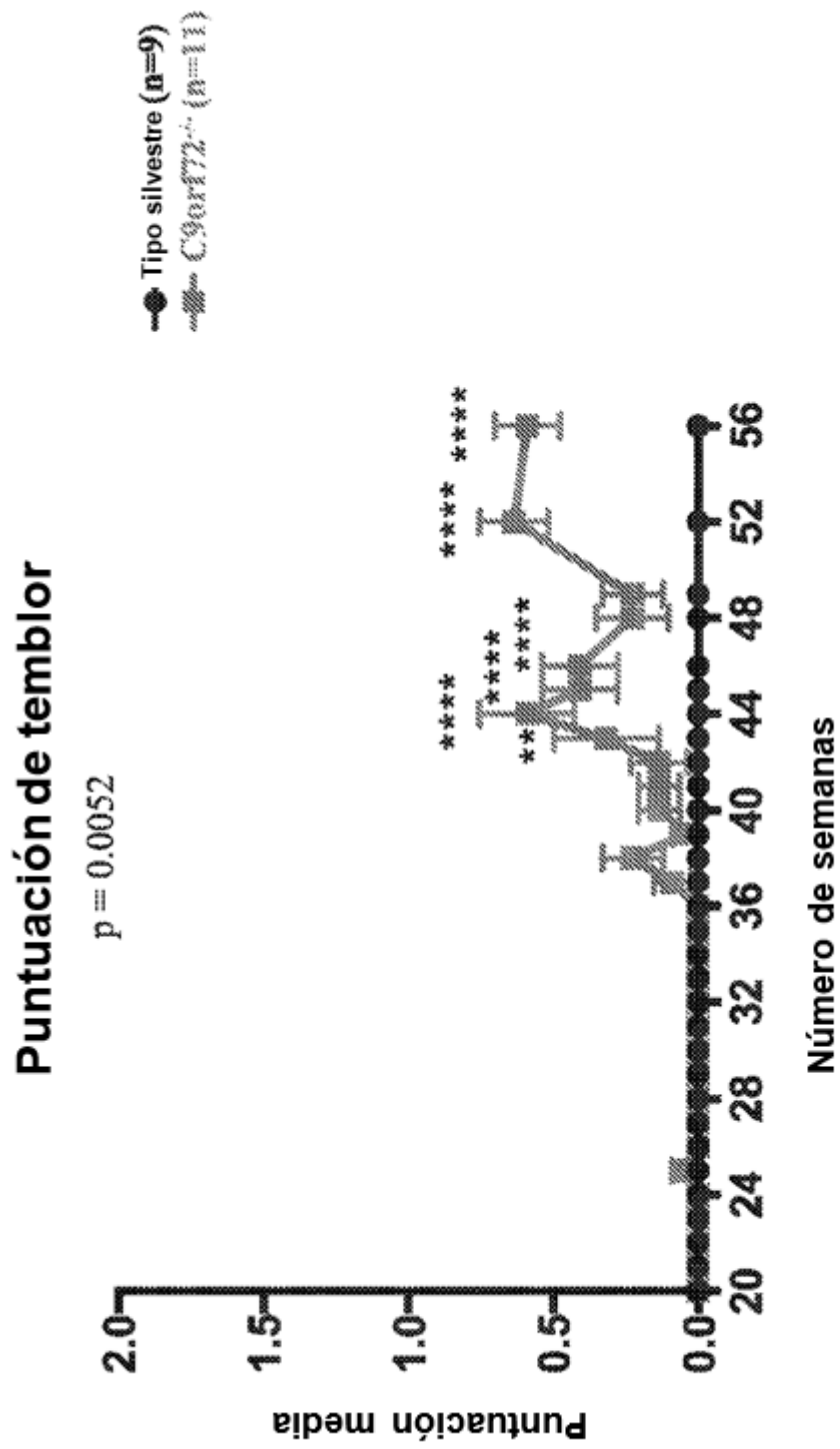


Figura 2D

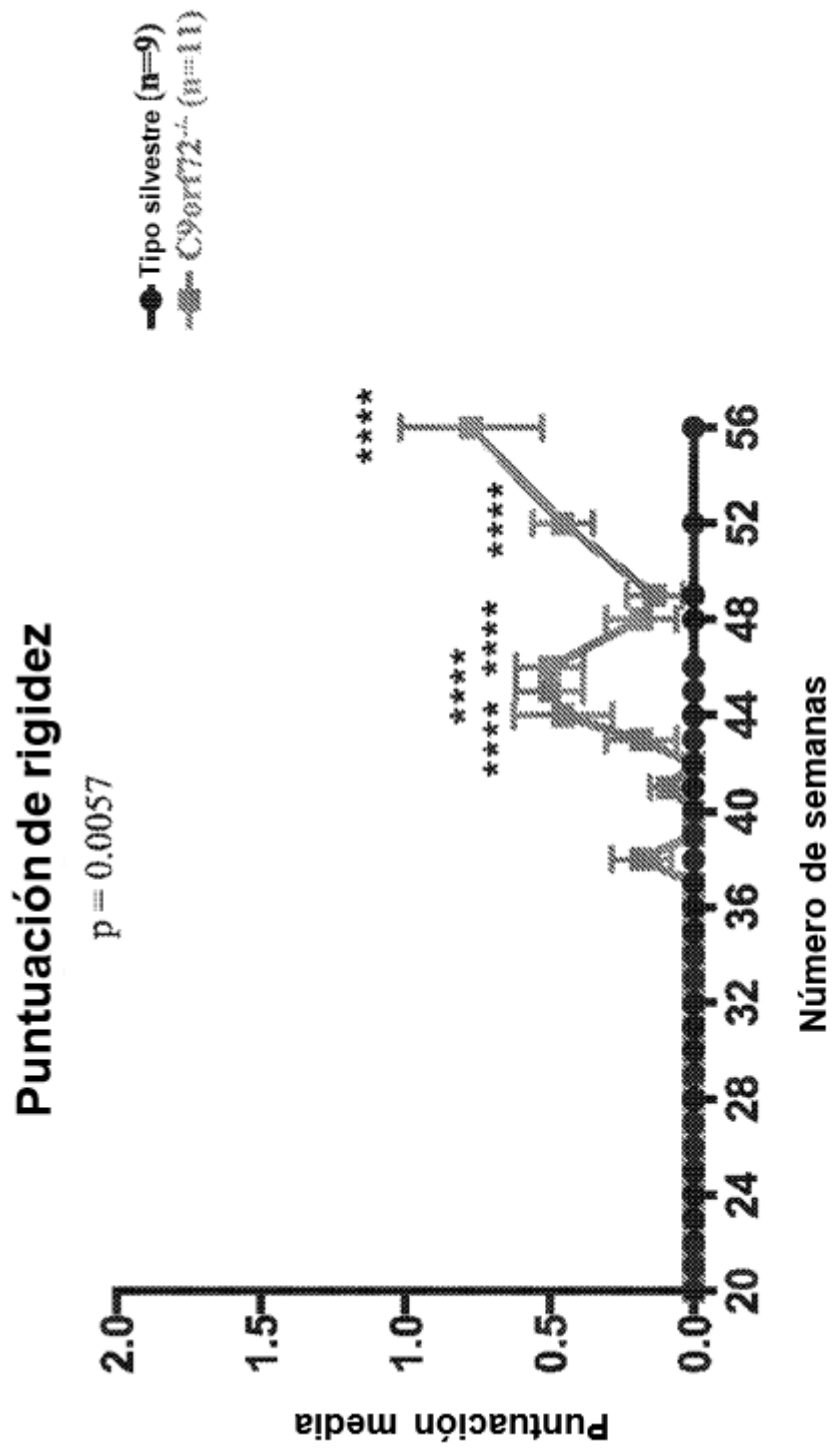


Figura 2E

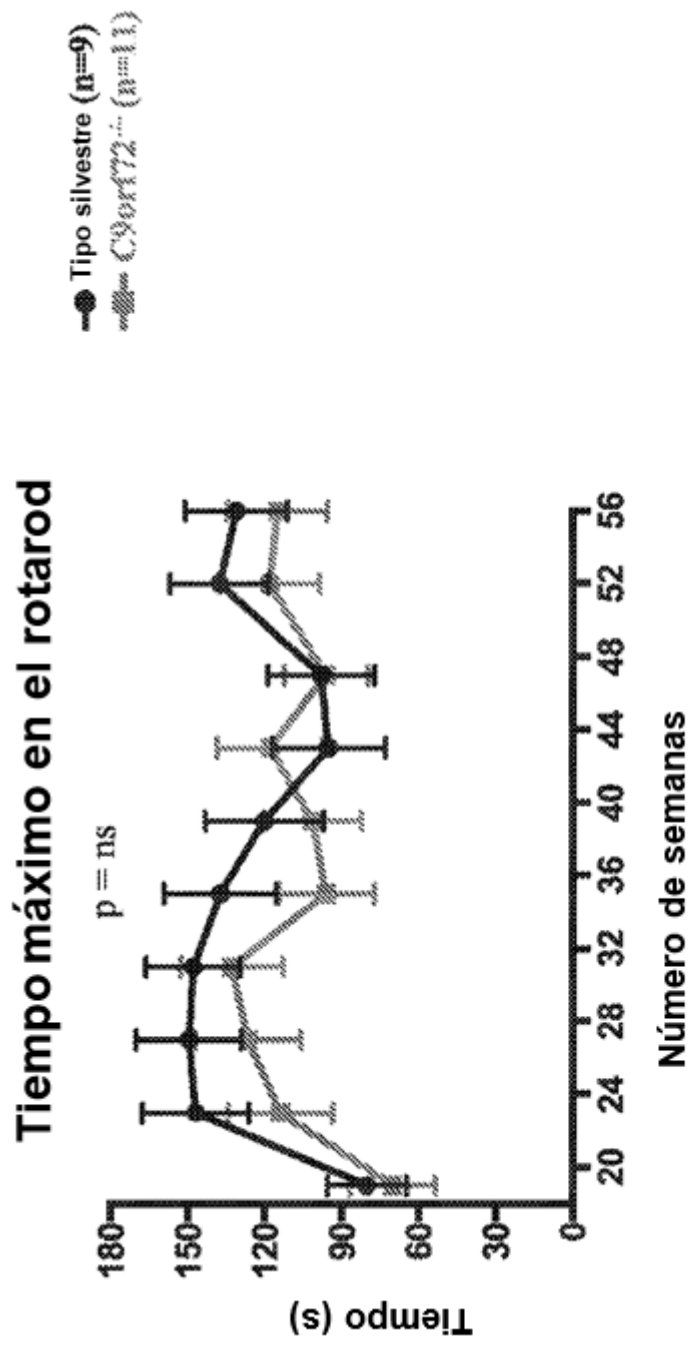


Figura 2F

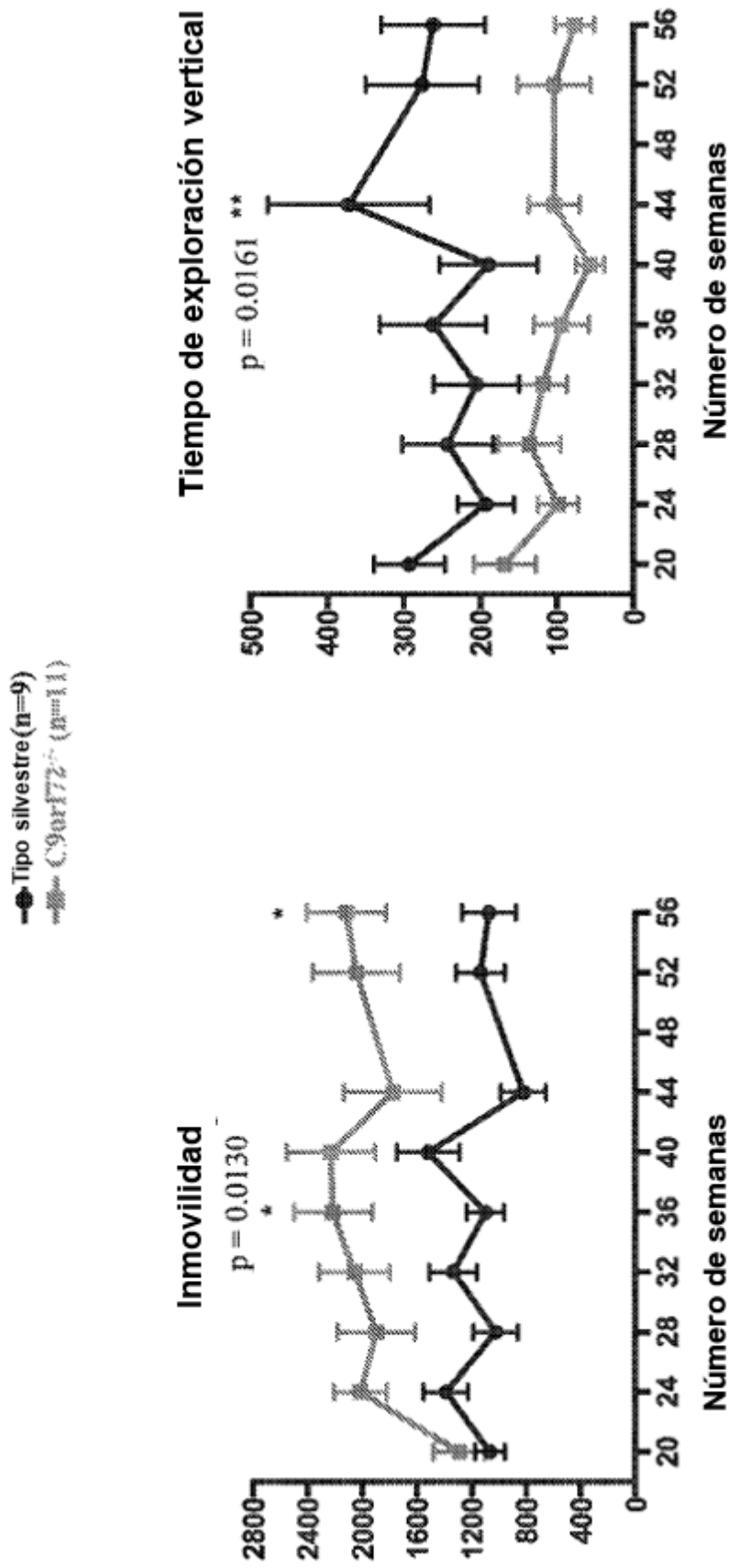


Figura 2G

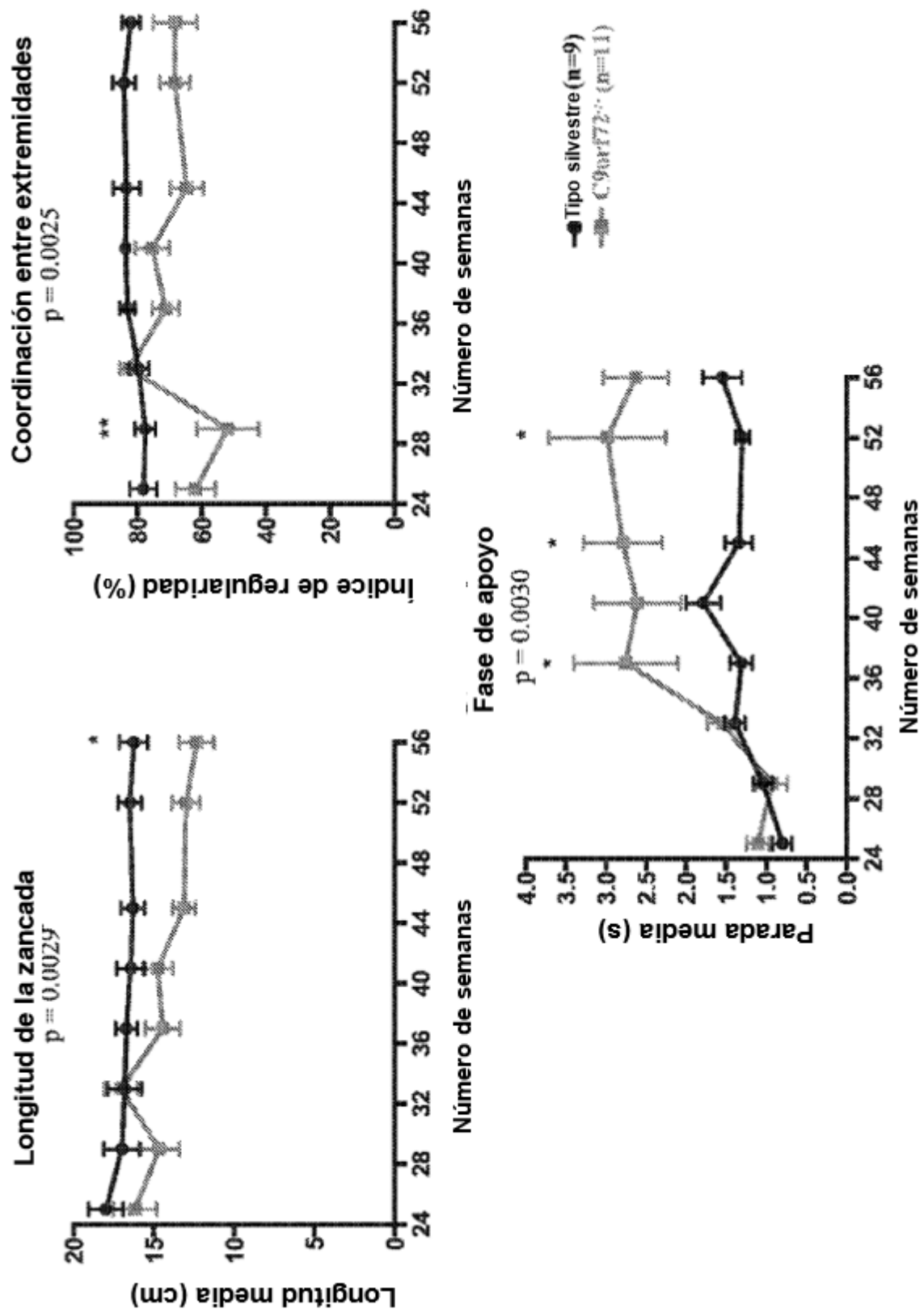


Figura 2H

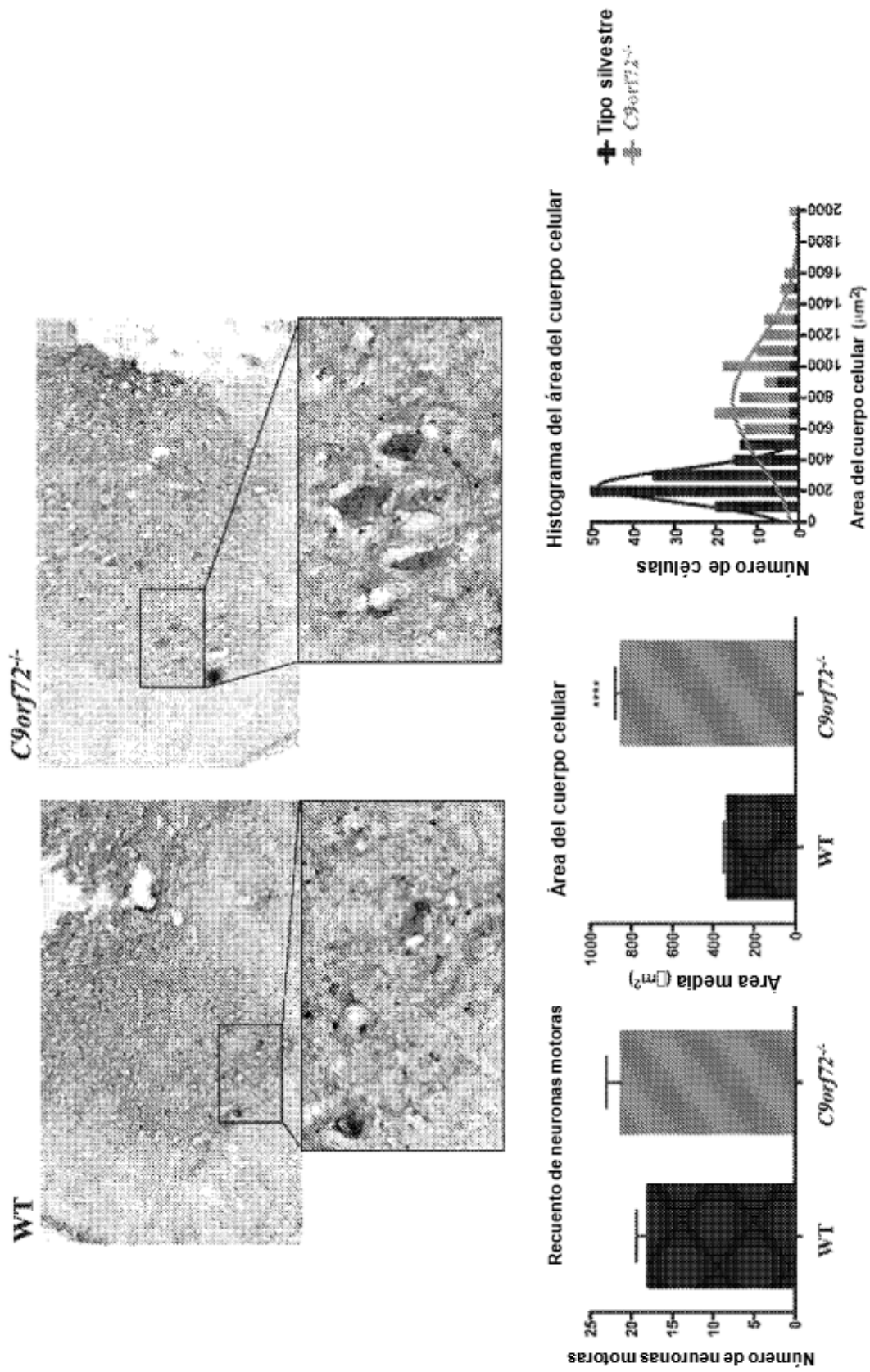


Figura 2I

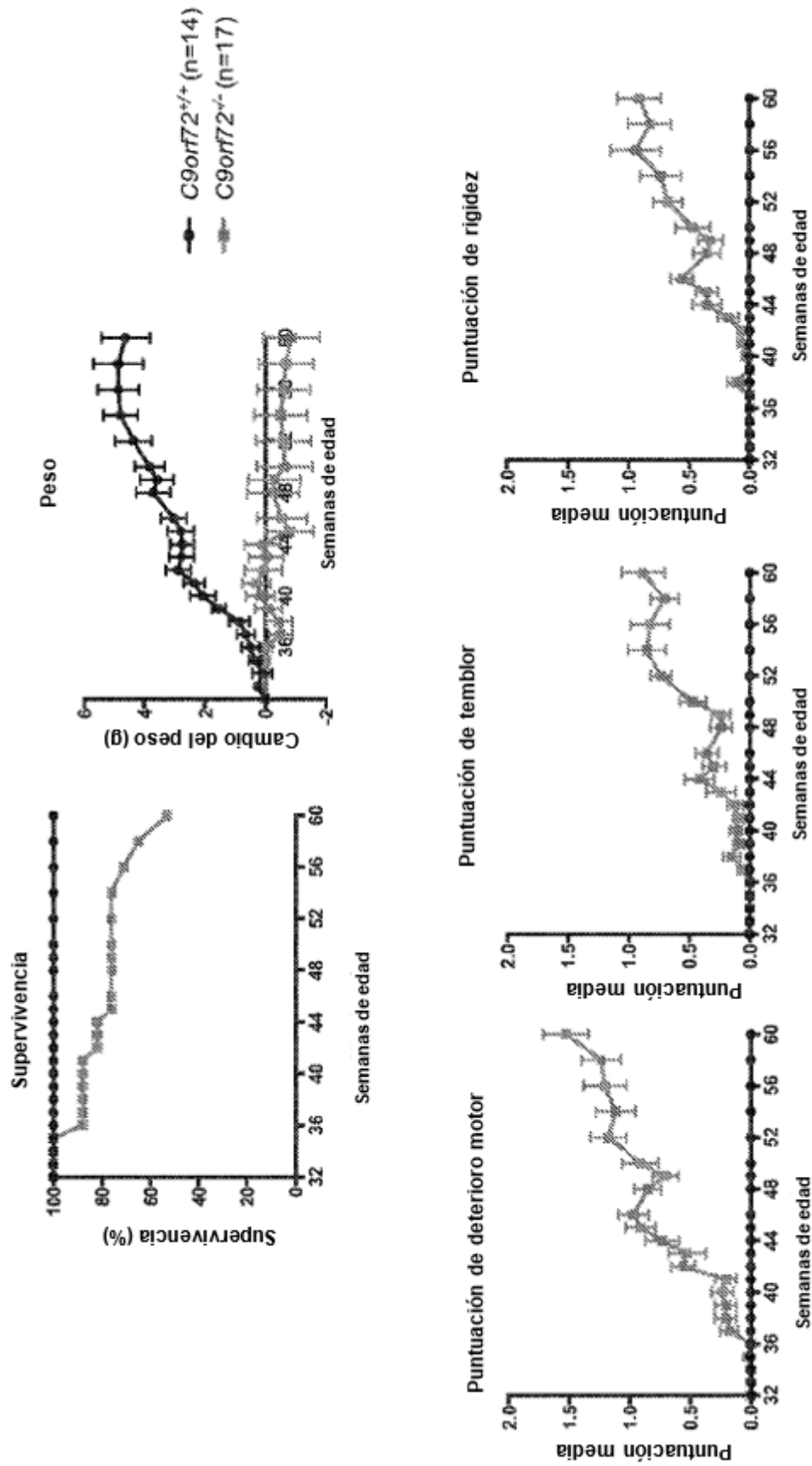


Figura 2J

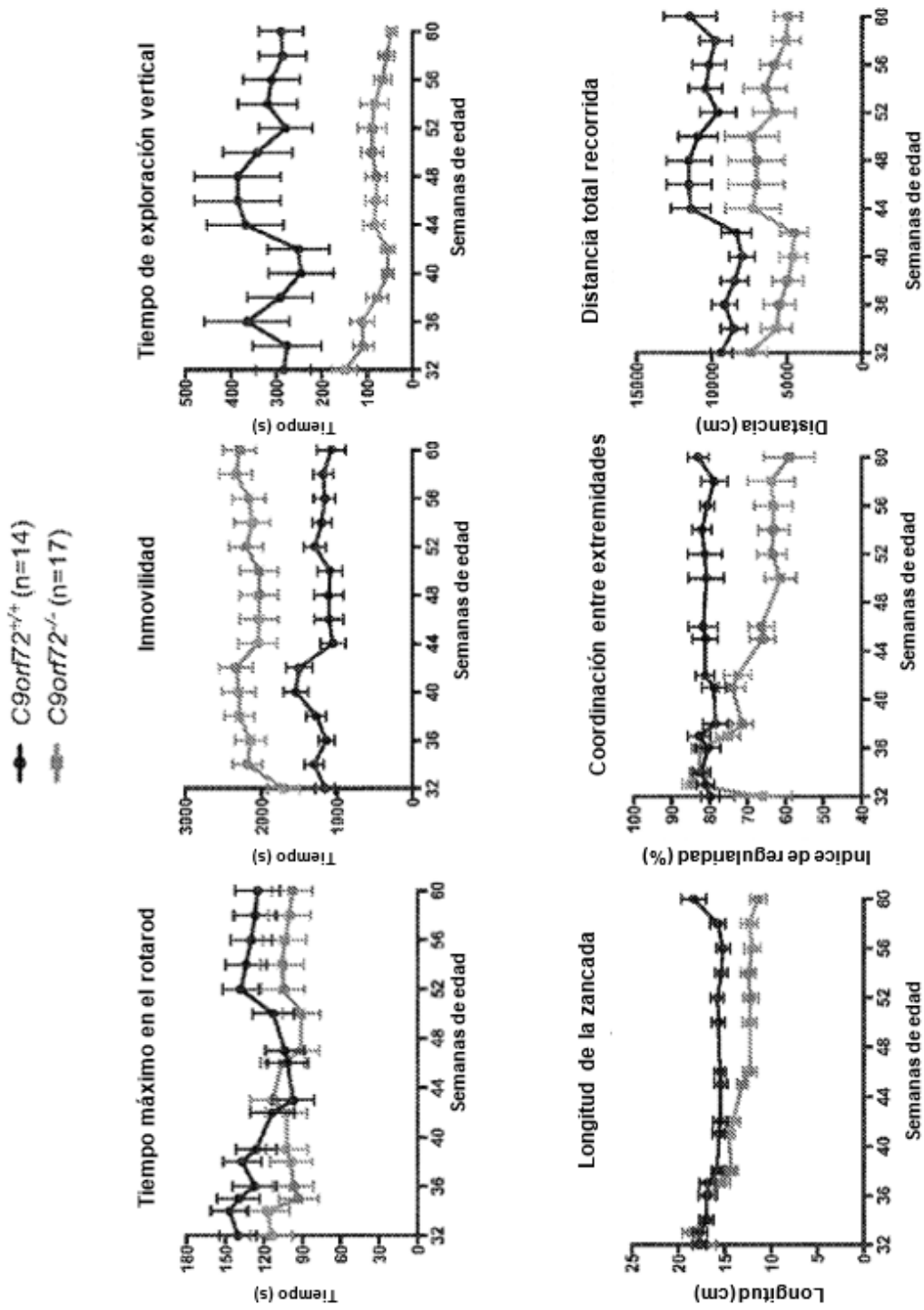


Figura 2K

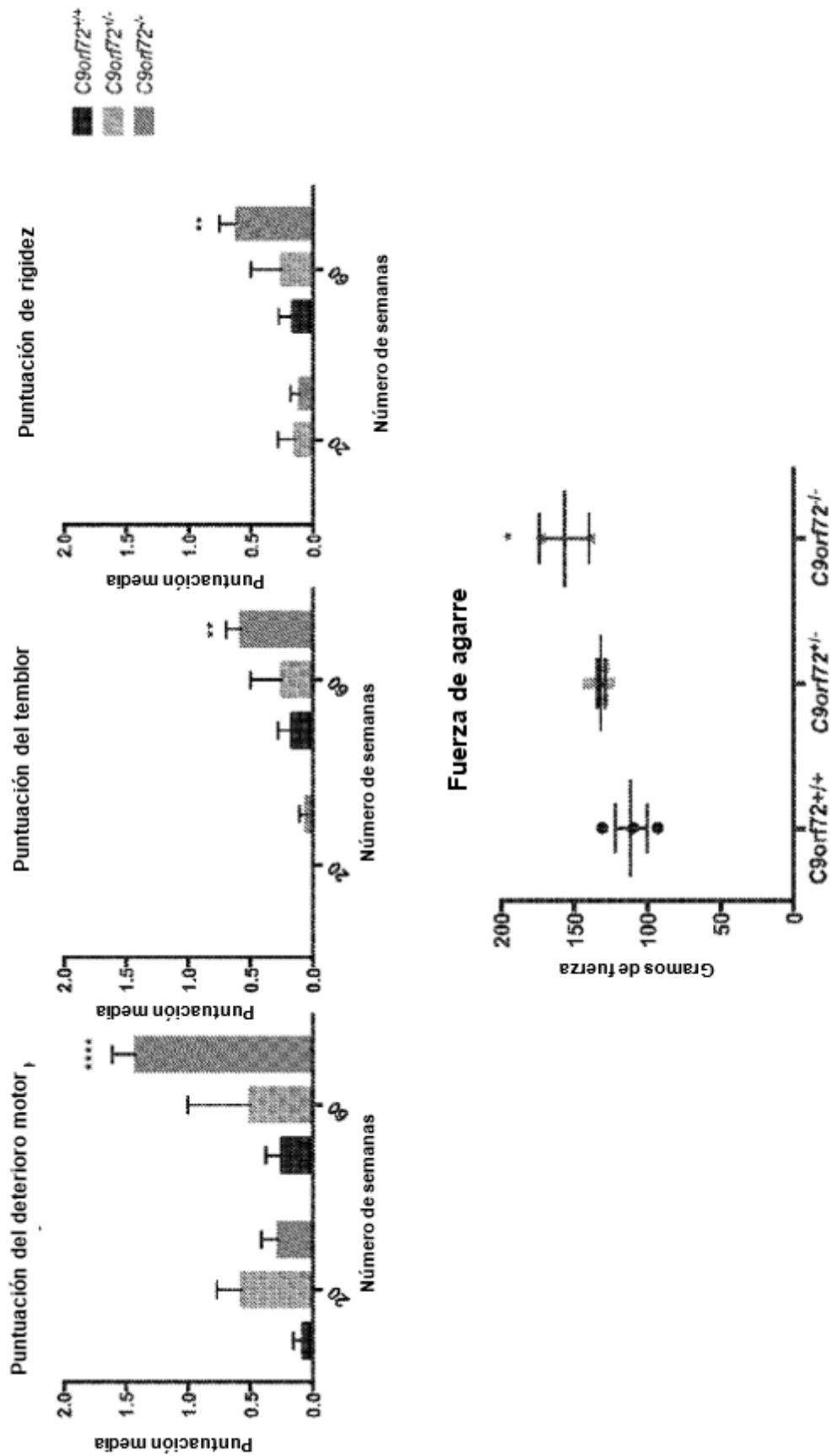


Figura 2L

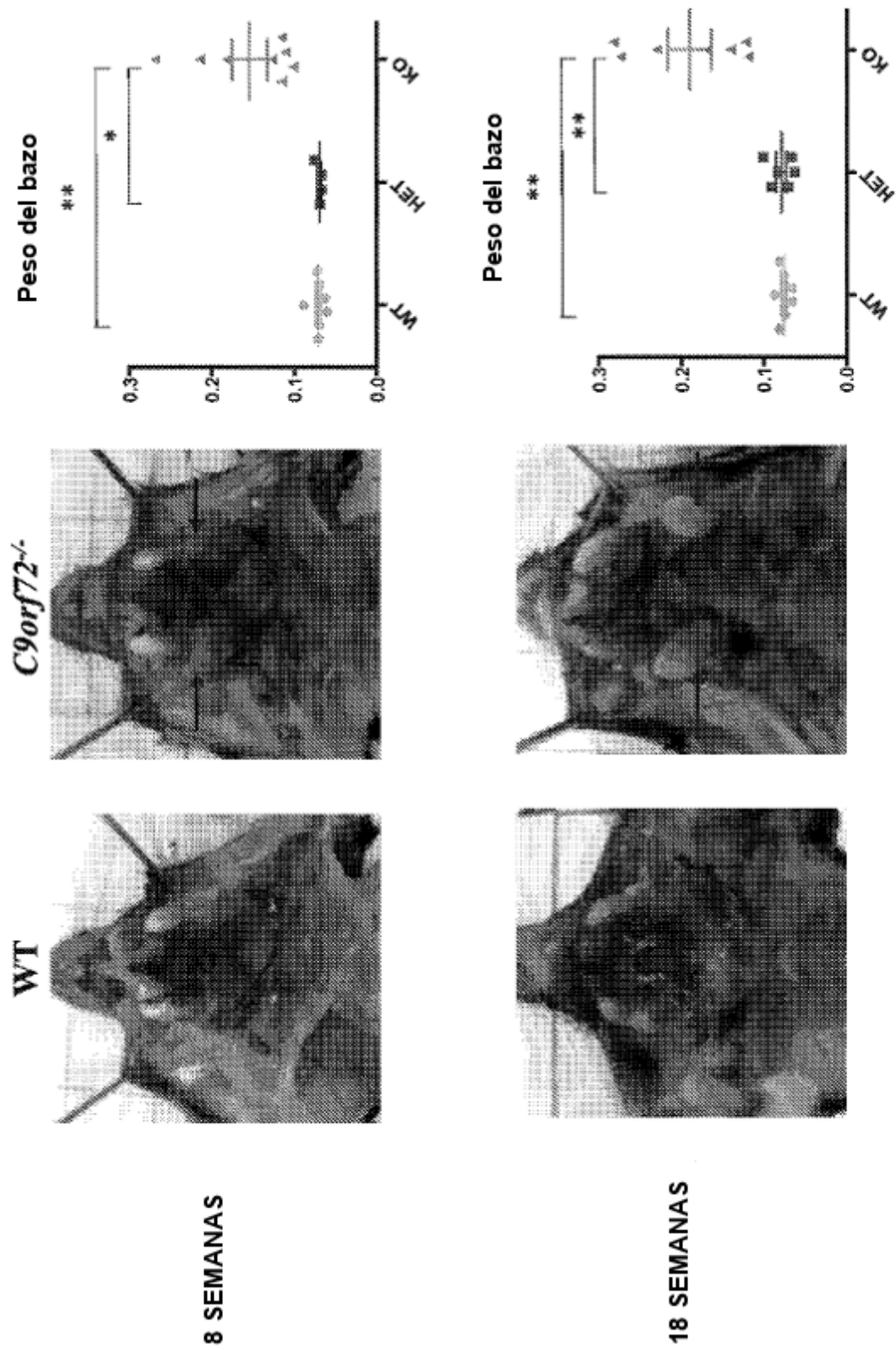


Figura 3A

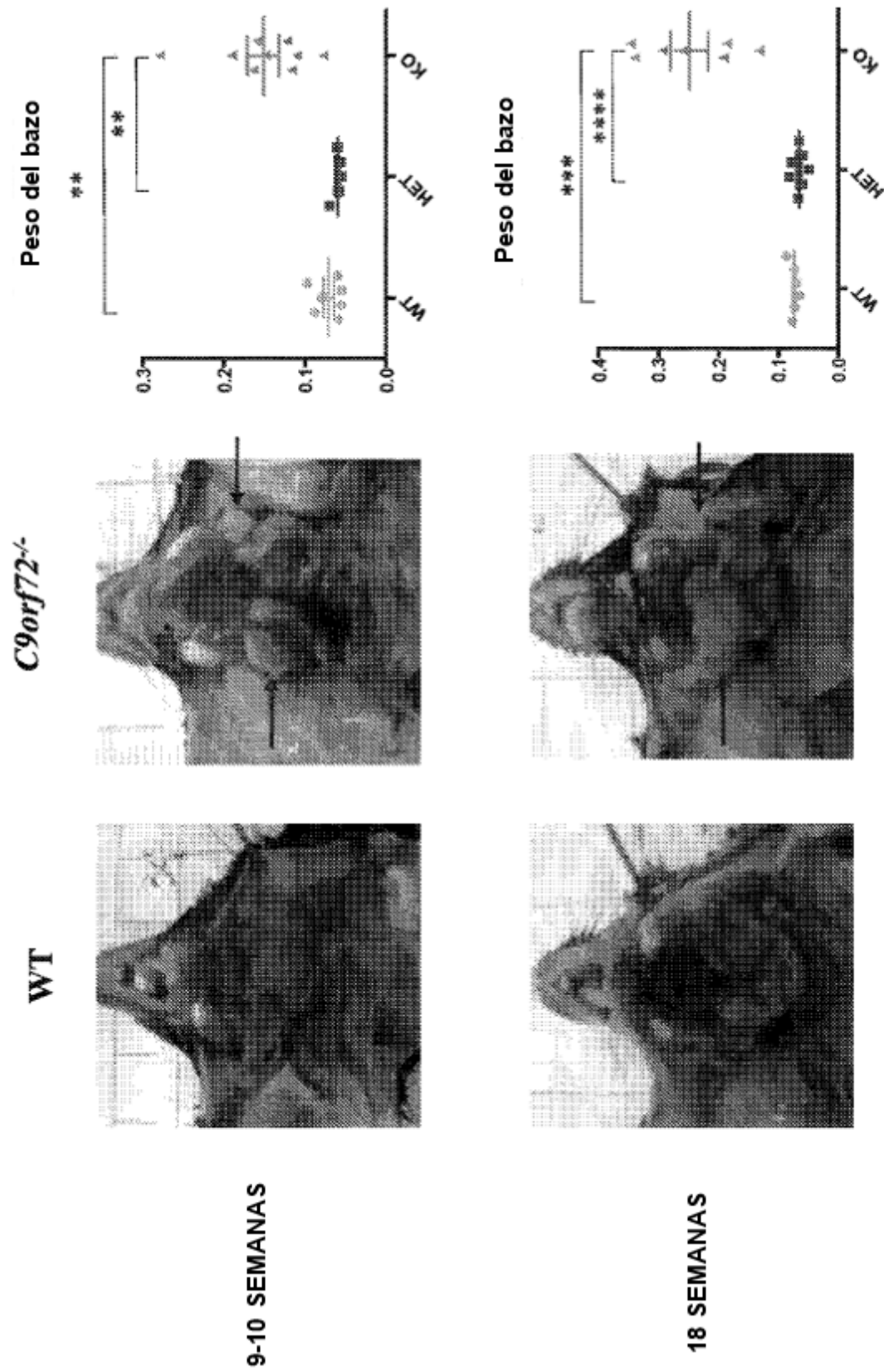
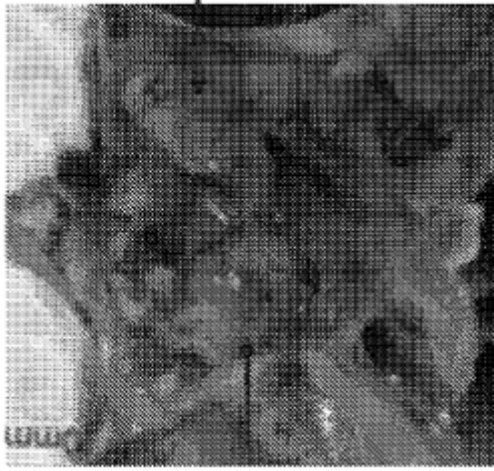


Figura 3B

Macho de 56 semanas



Hembra de 37 semanas

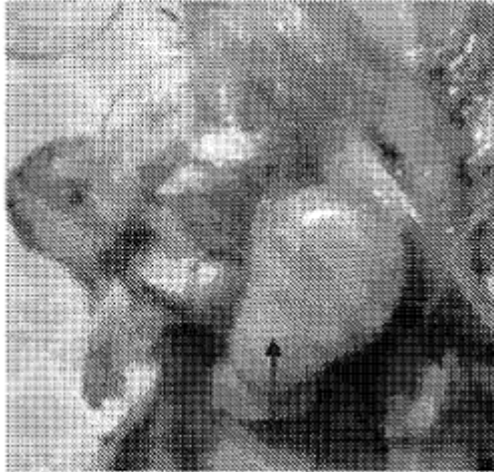


Figura 3C

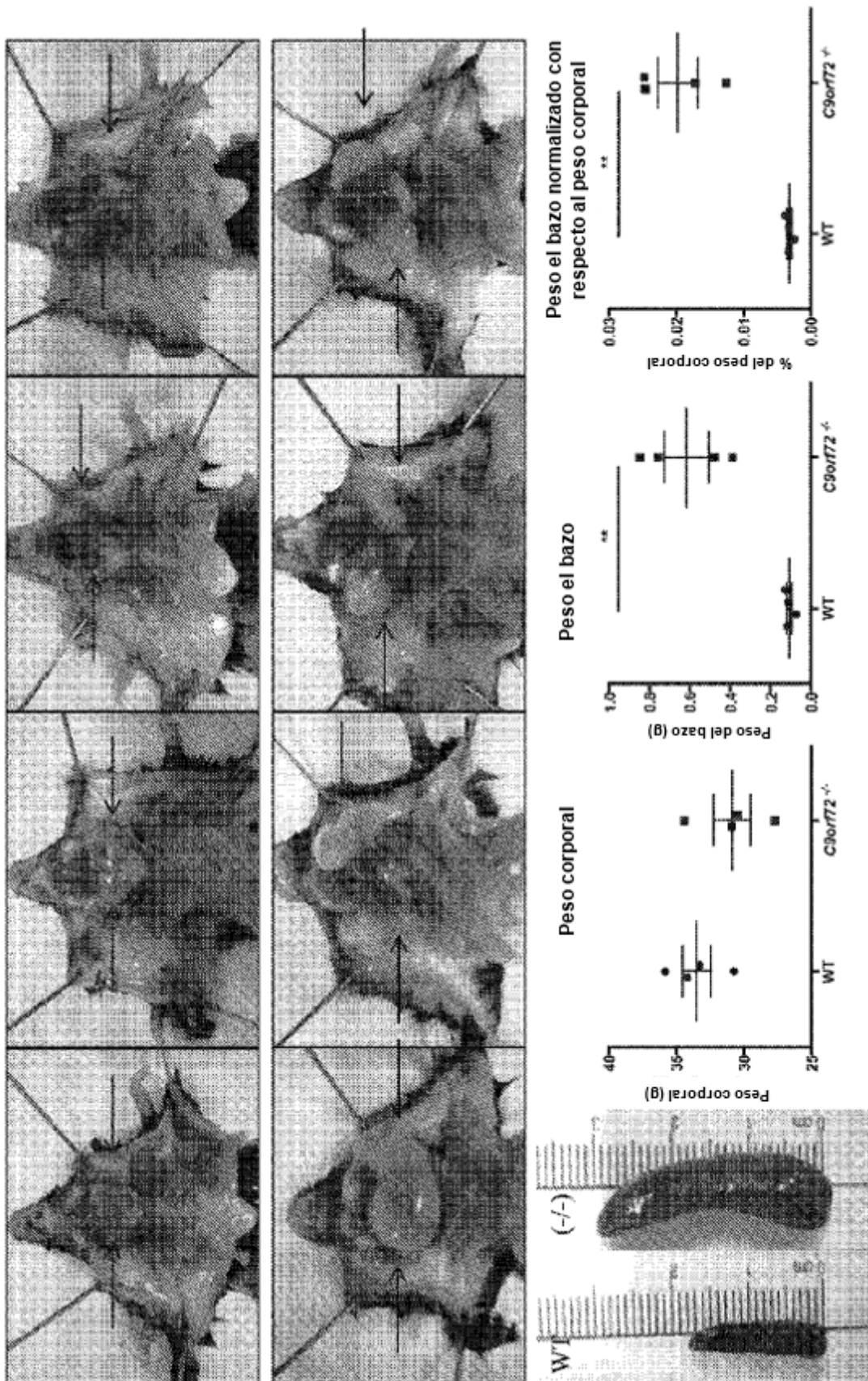
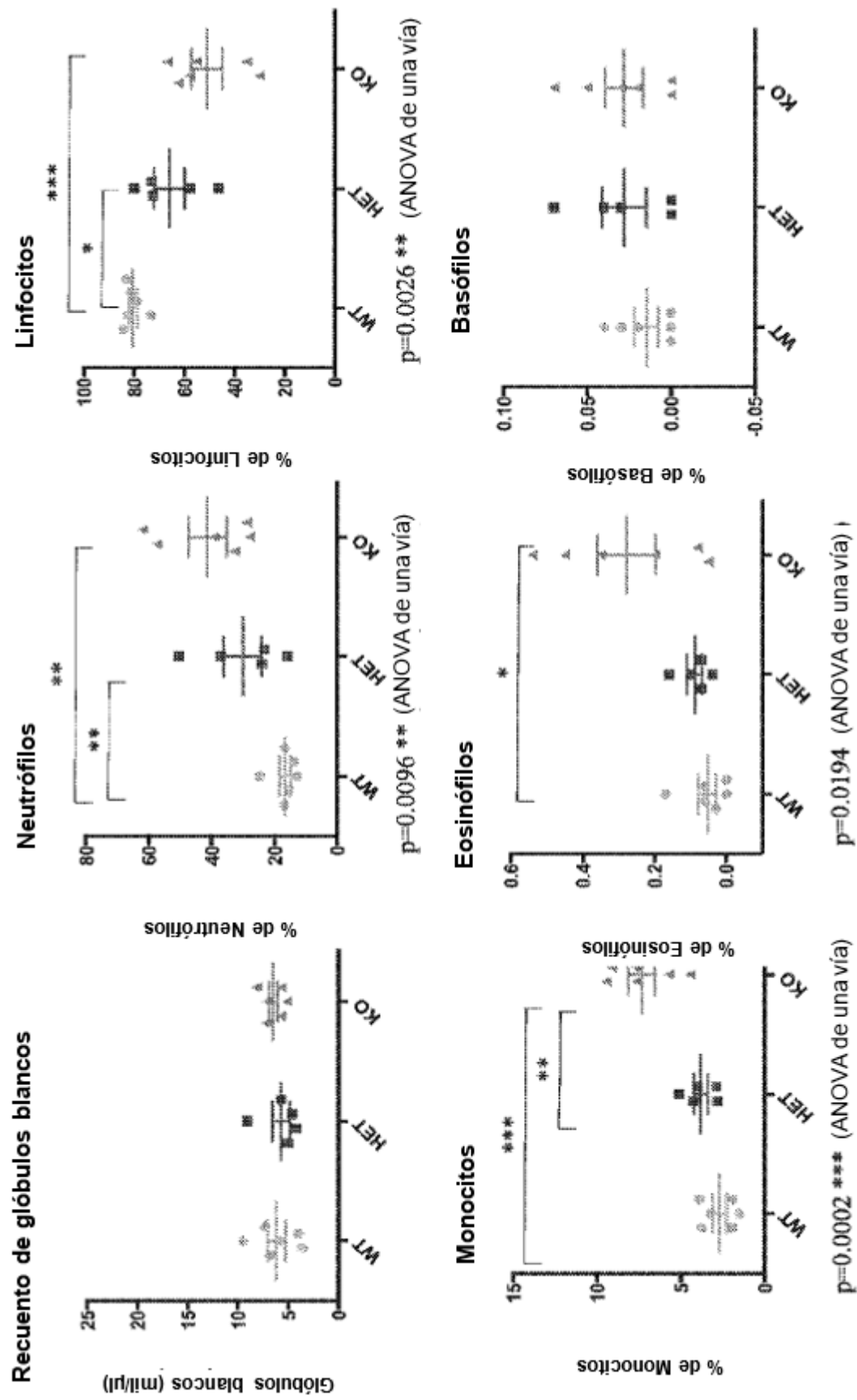


Figura 3D



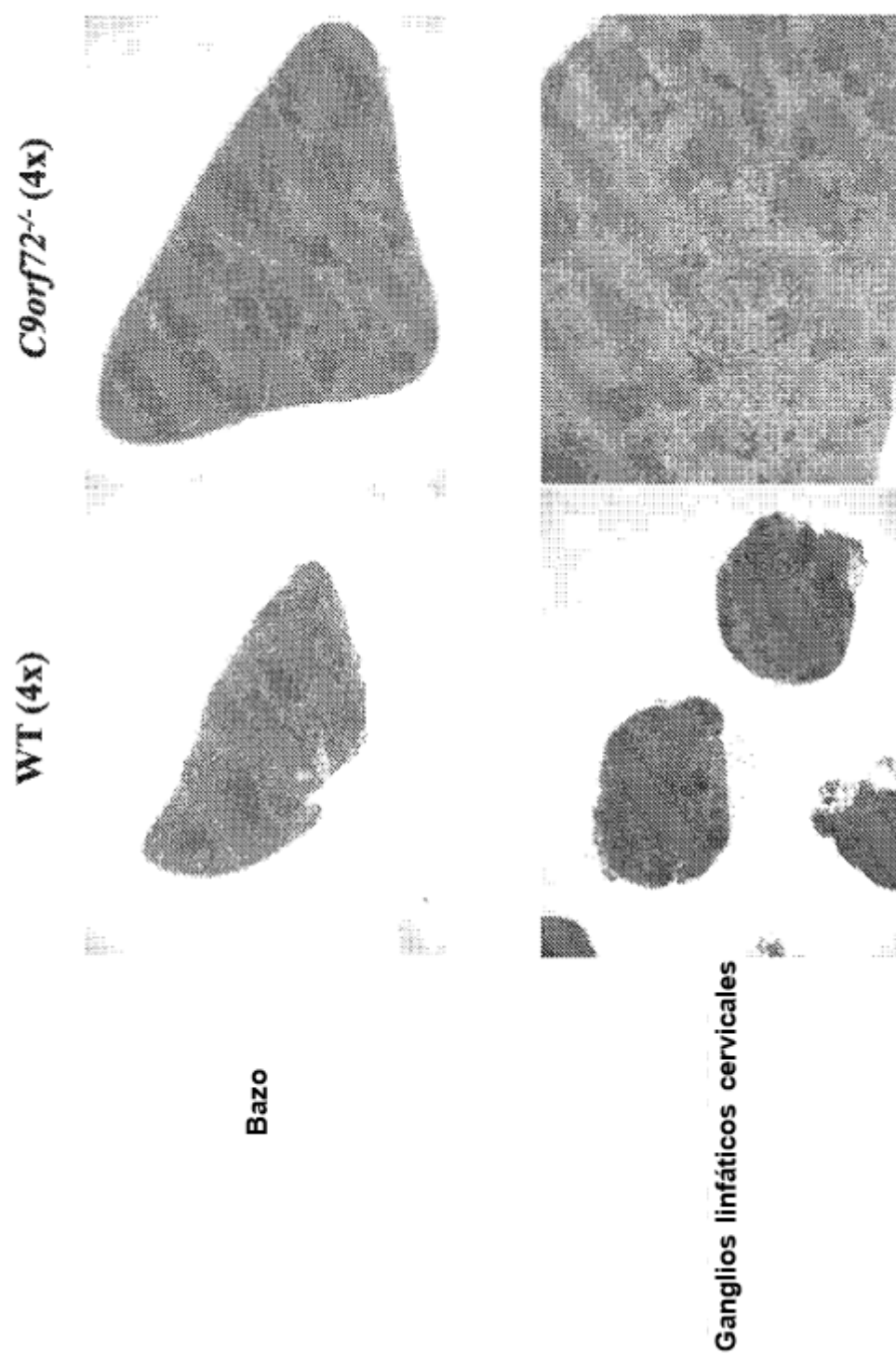


Figura 3F

Ganglios linfáticos cervicales C9orf72-/- (60x)

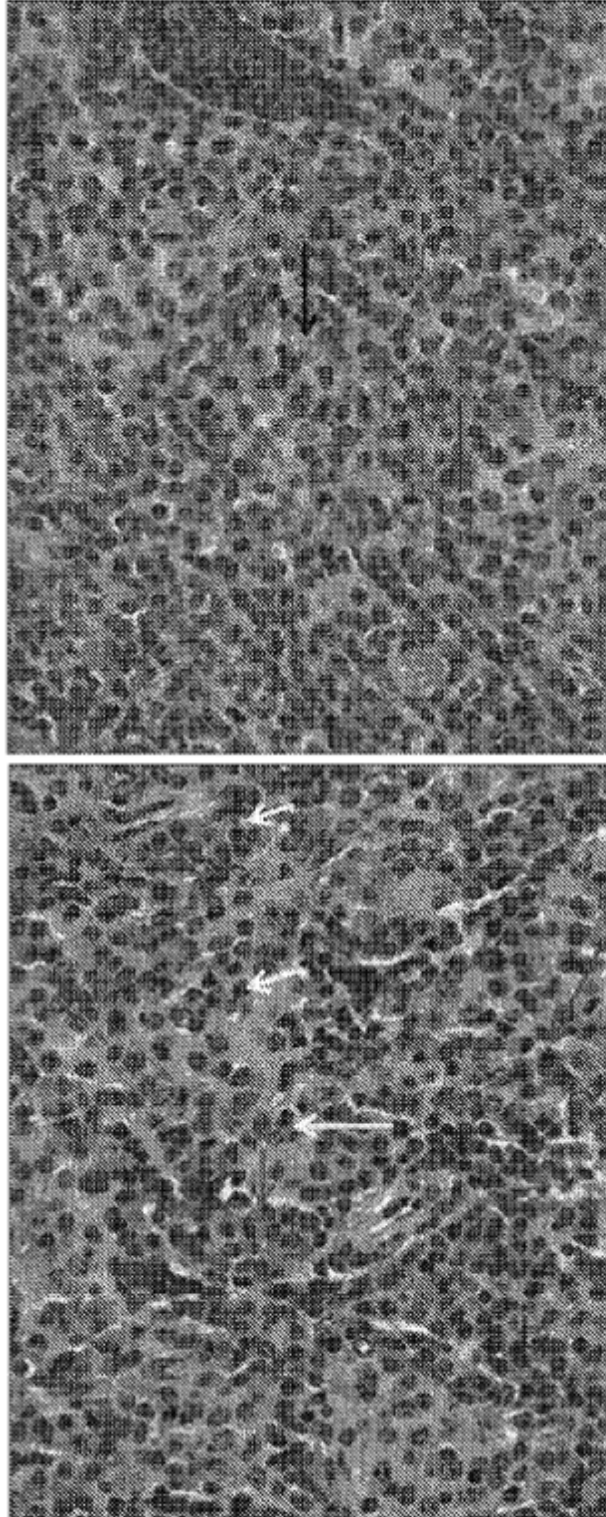


Figura 3G

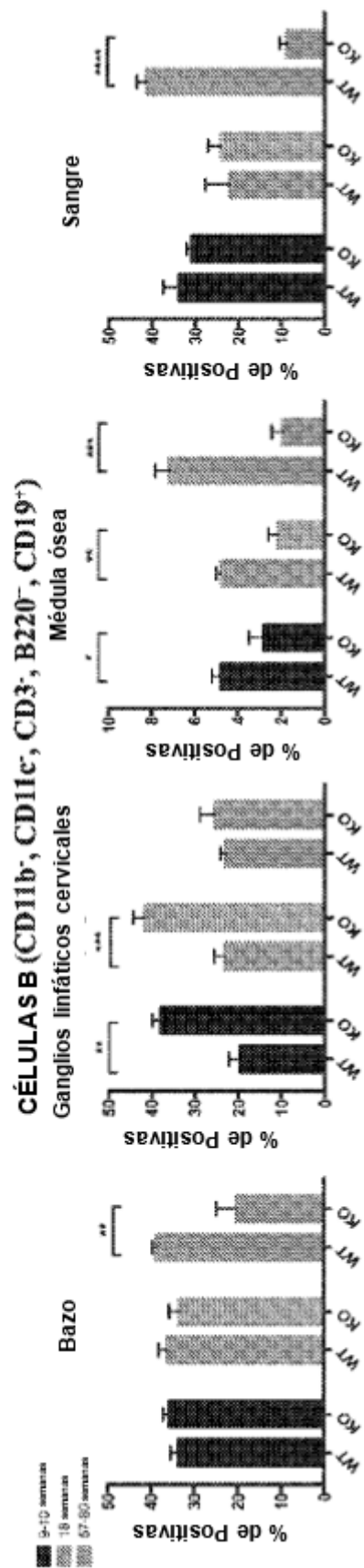


Figura 3H

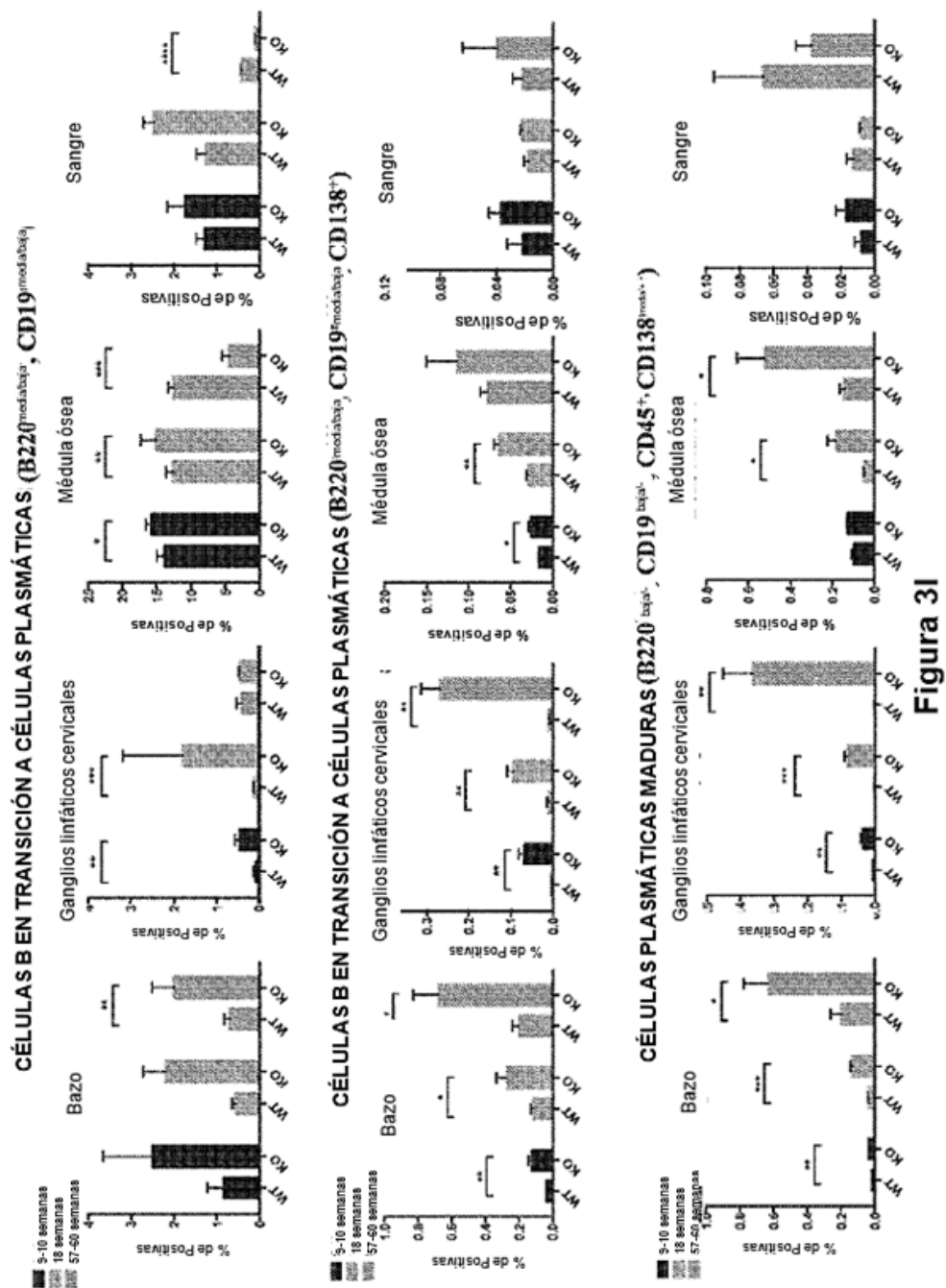


Figura 31

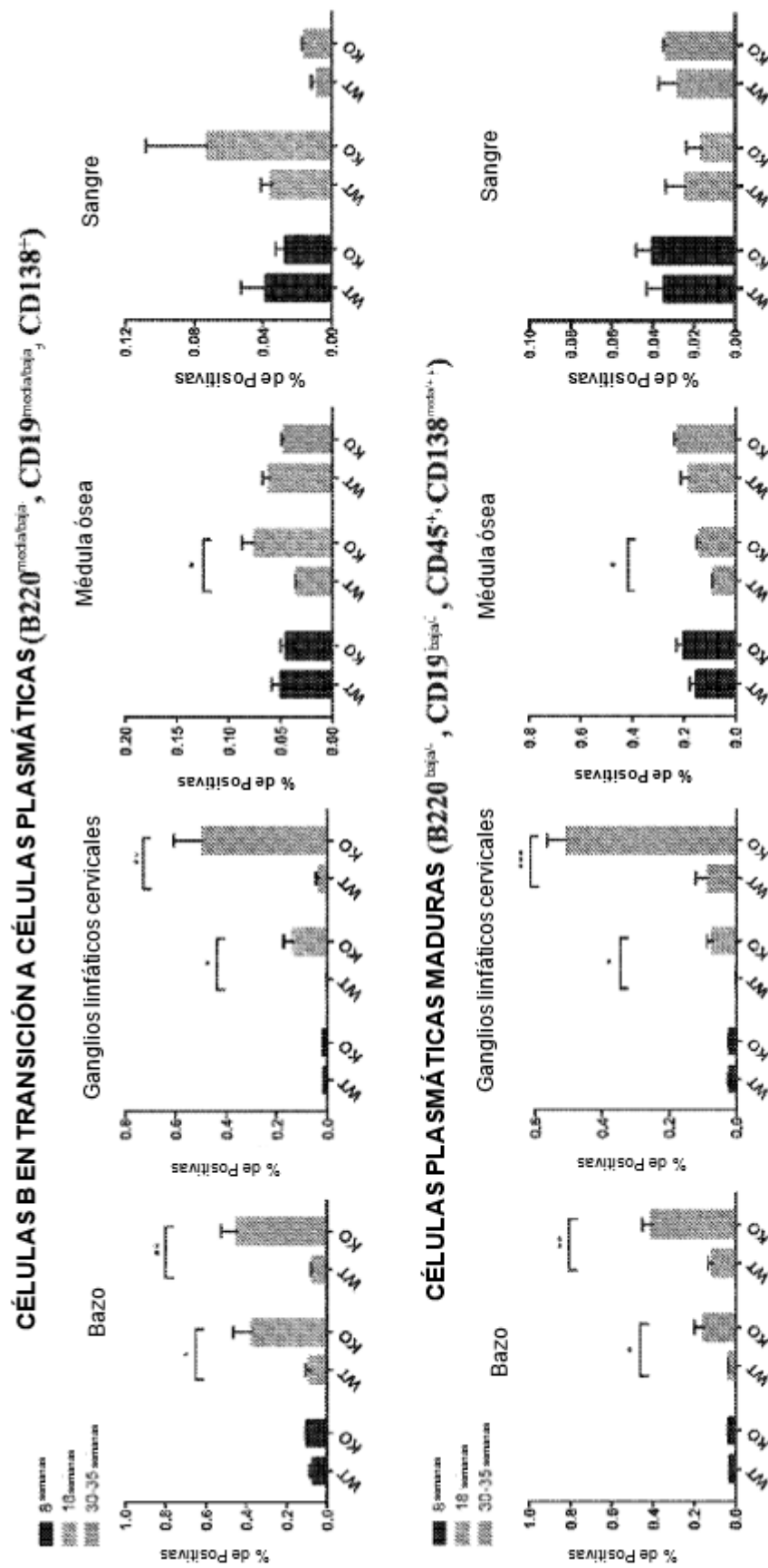
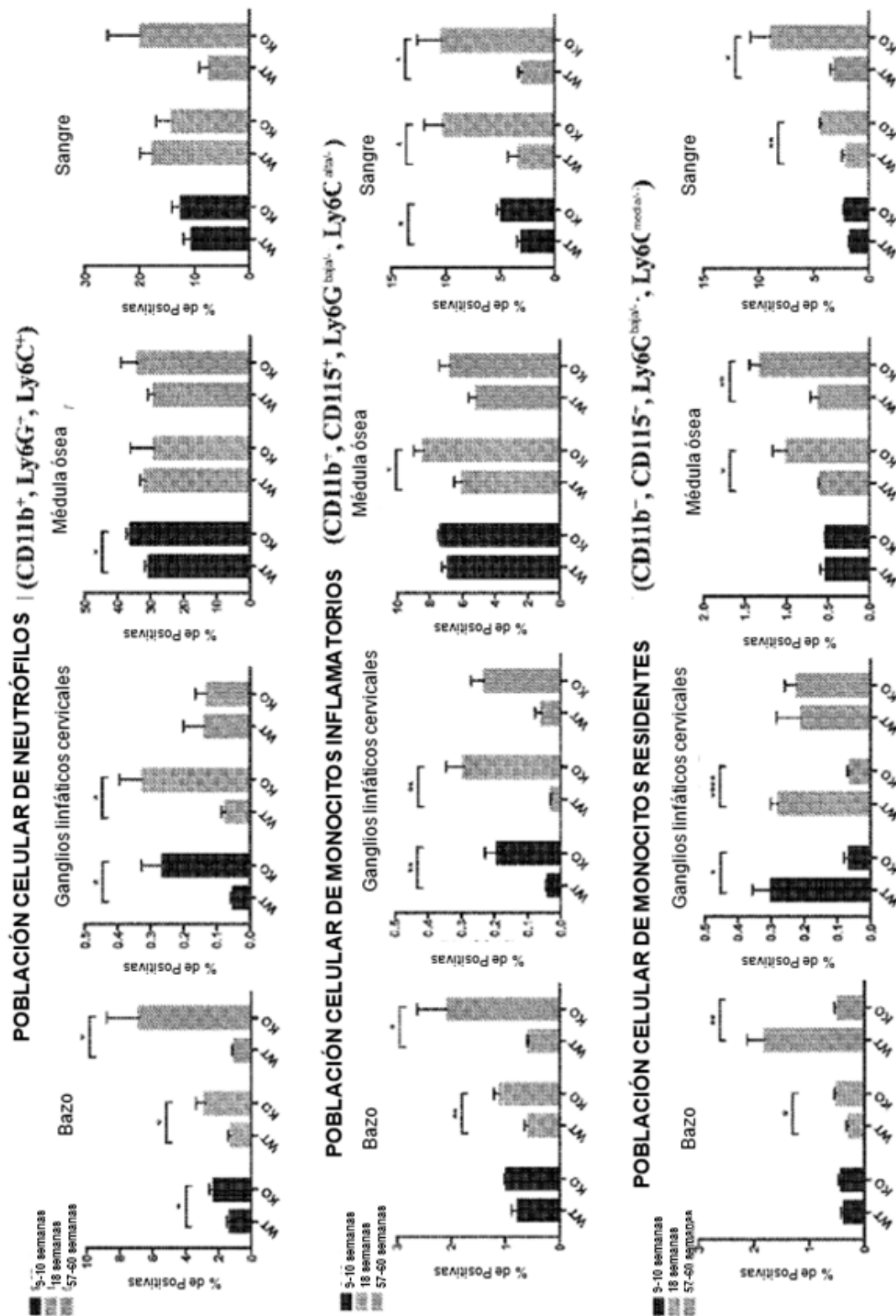


Figura 3J



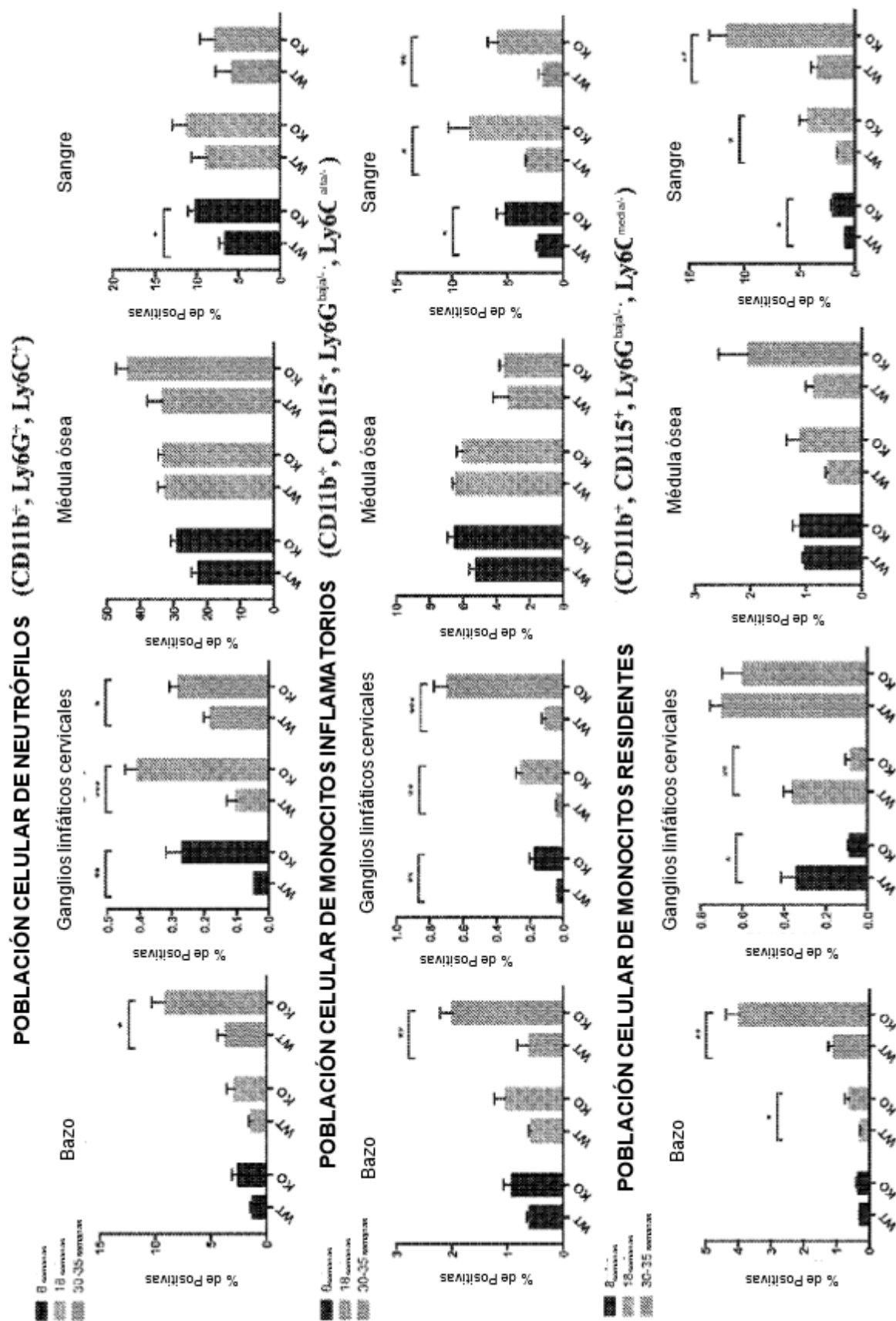


Figura 3L

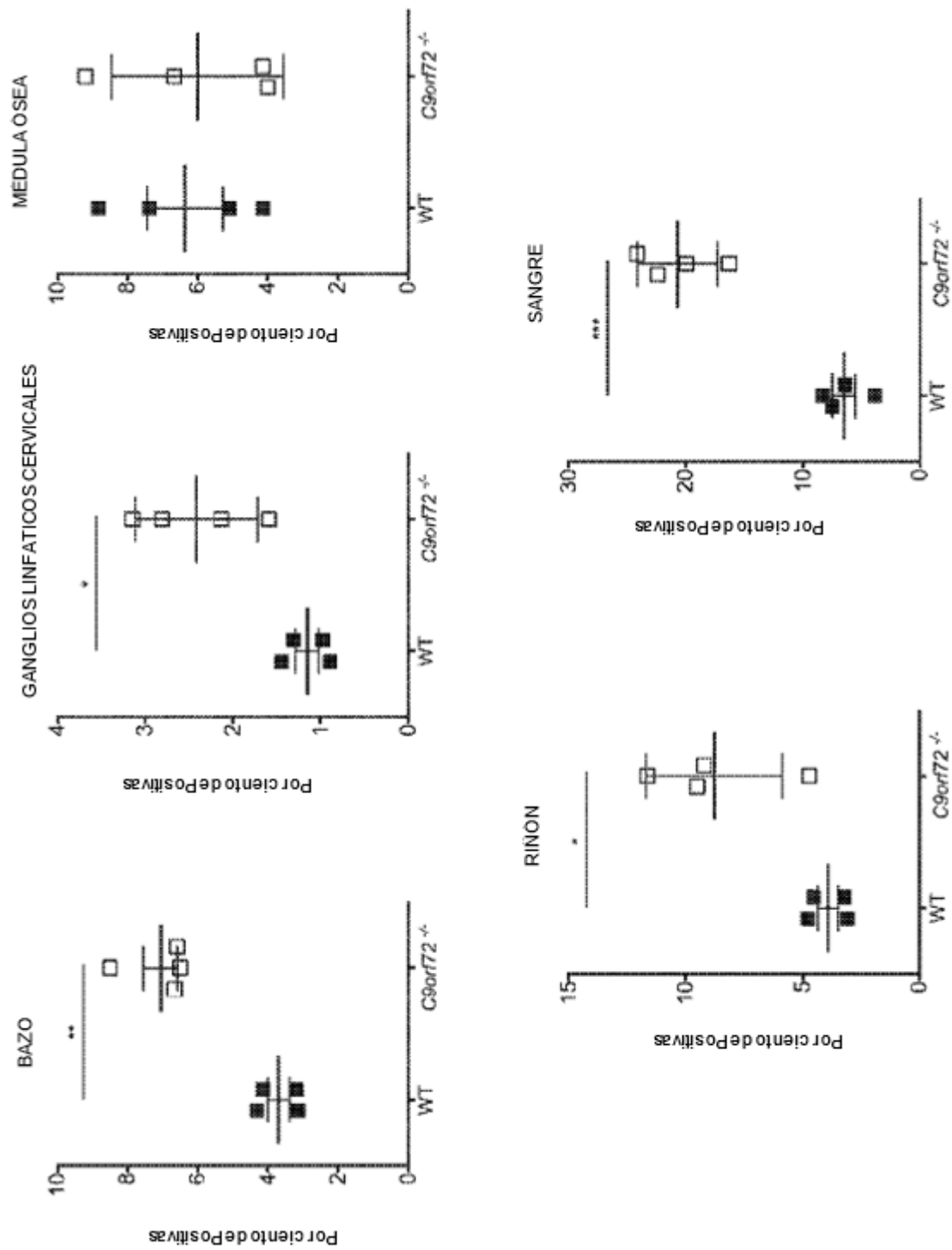


Figura 3M

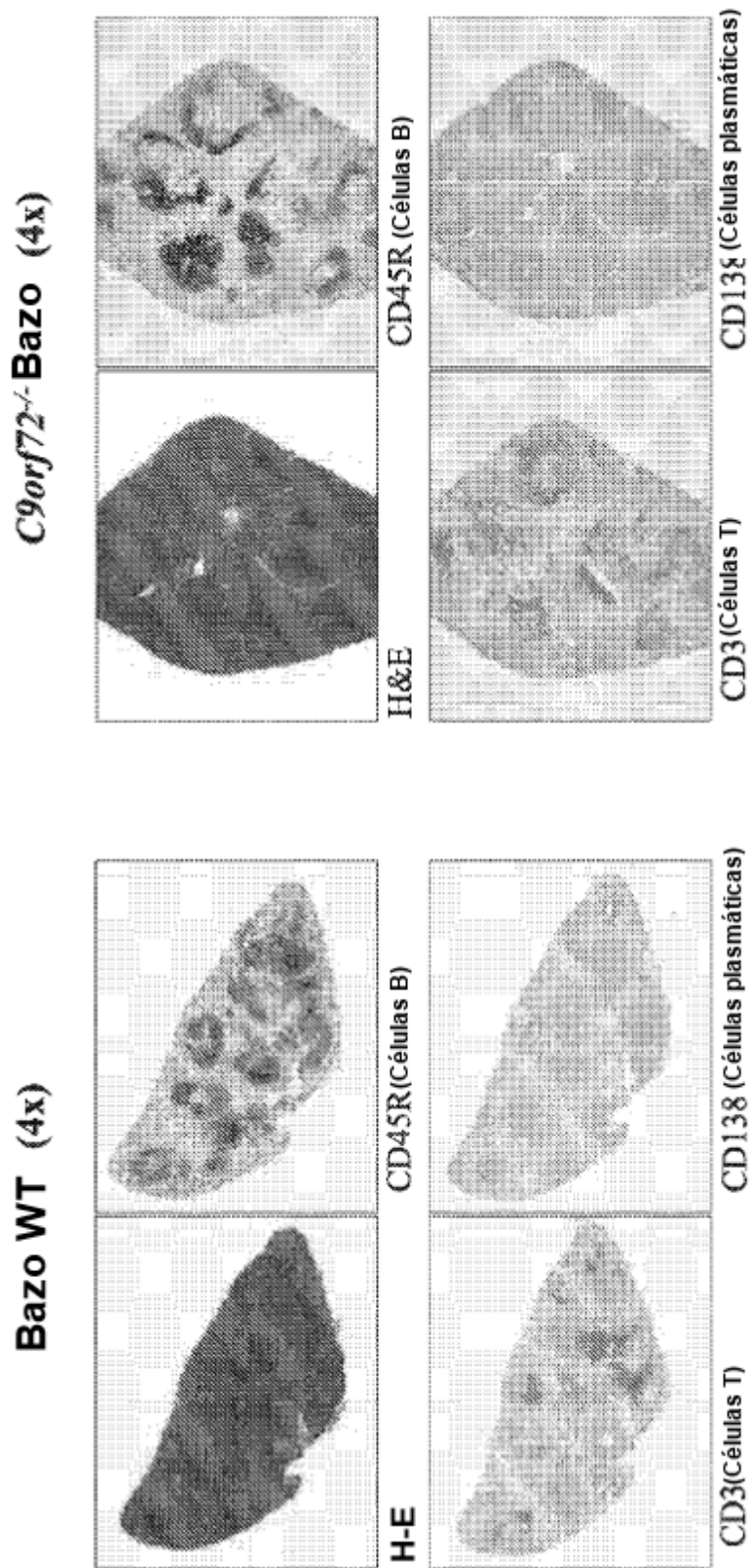


Figura 3N

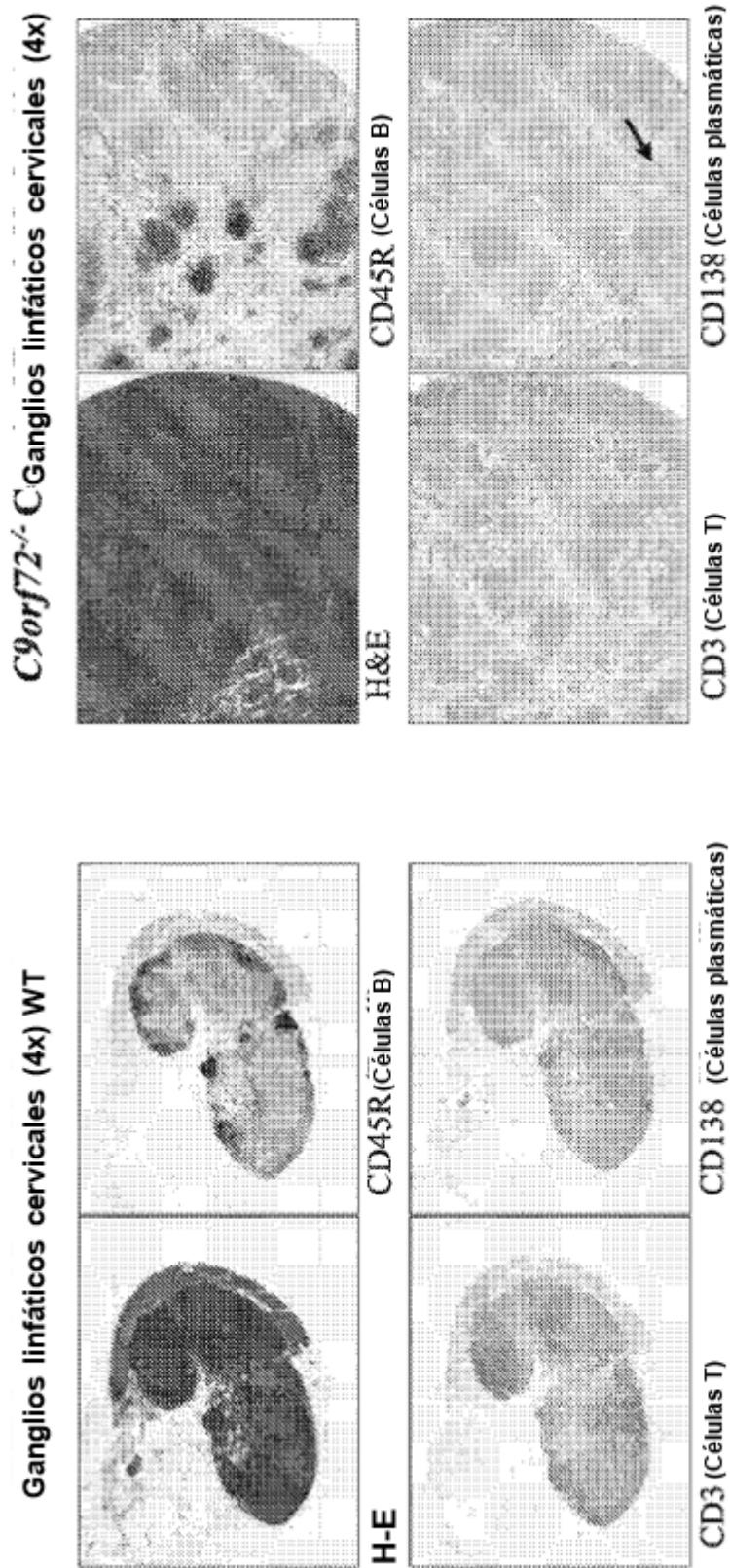


Figura 30

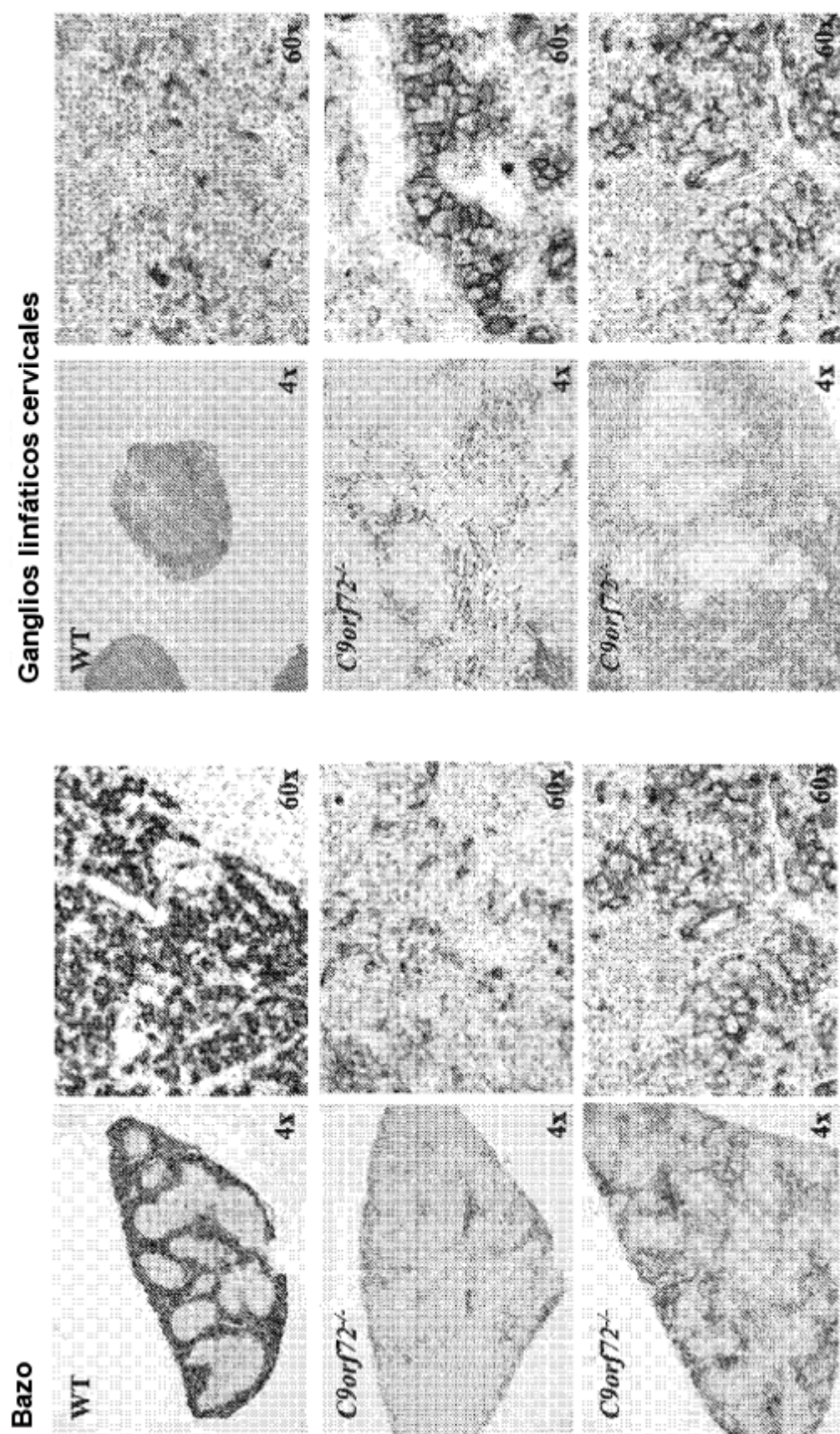


Figura 3P

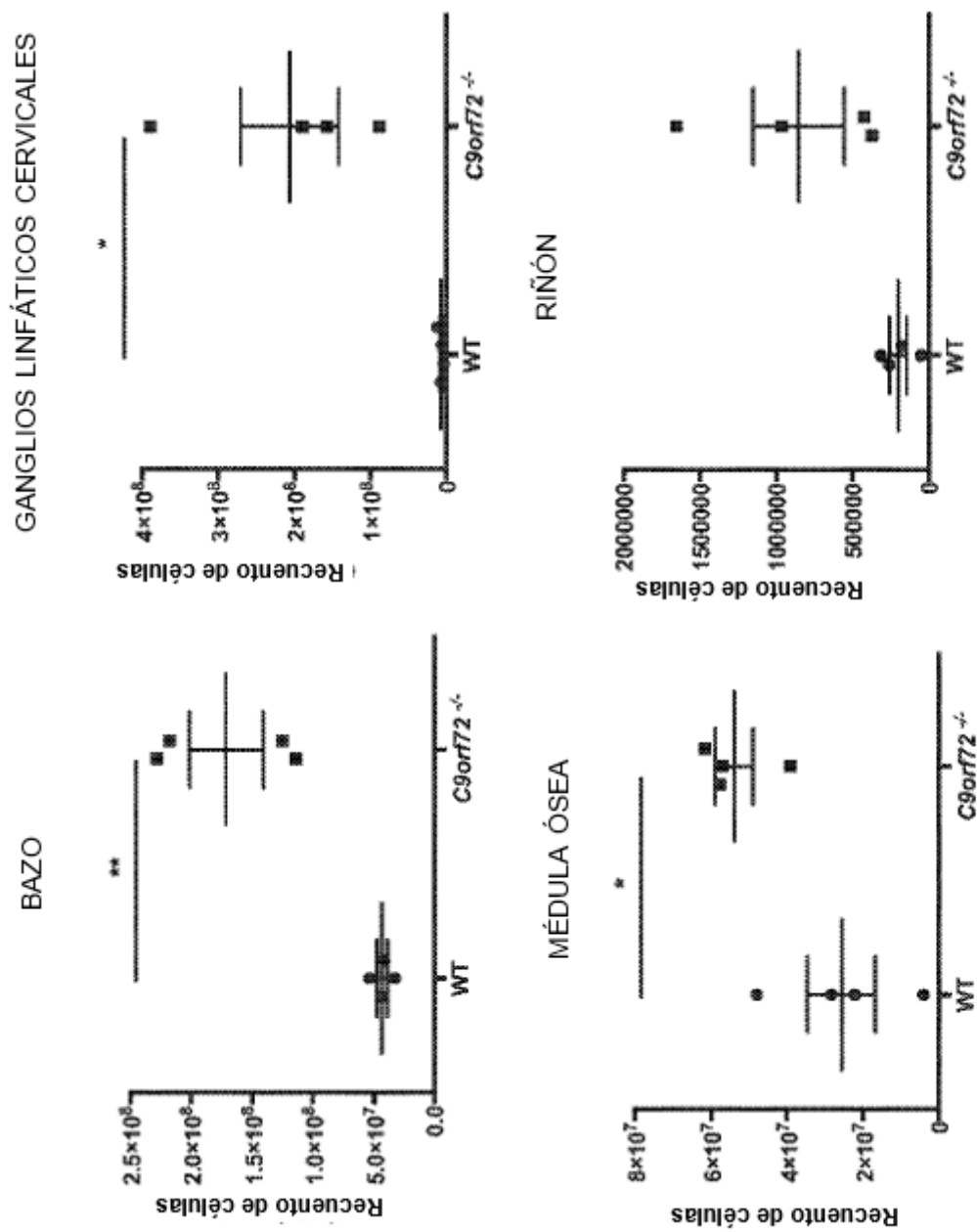


Figura 3Q

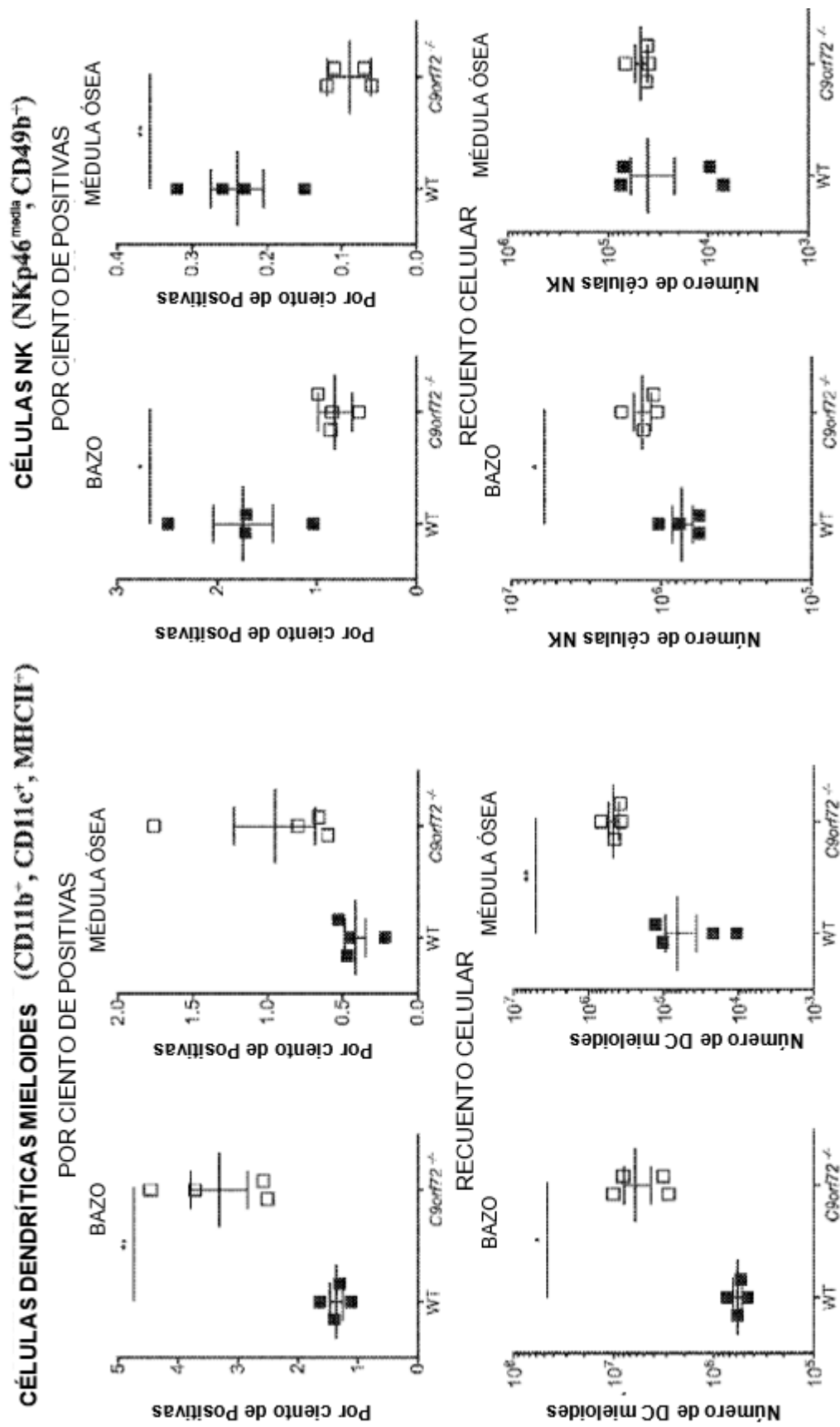


Figura 3R

CÉLULAS T CD45+

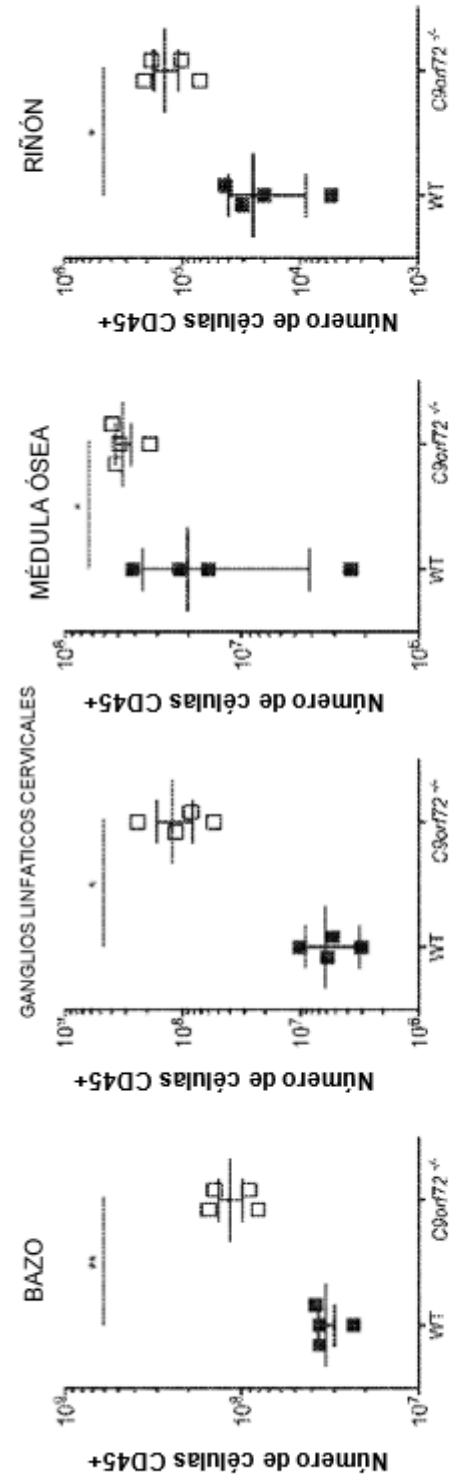
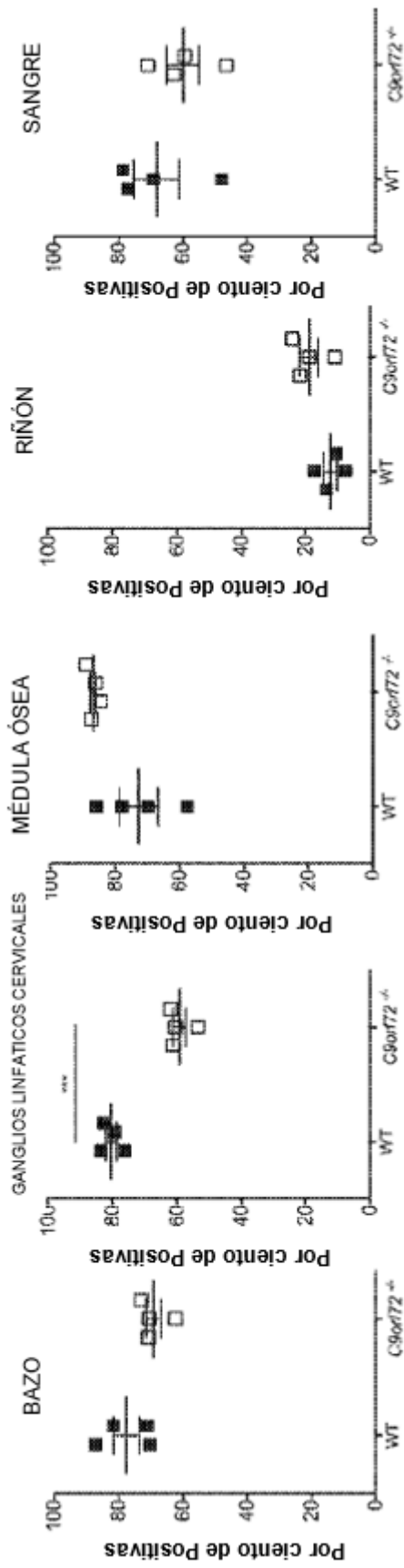


Figura 3S

CÉLULAS T CD8+

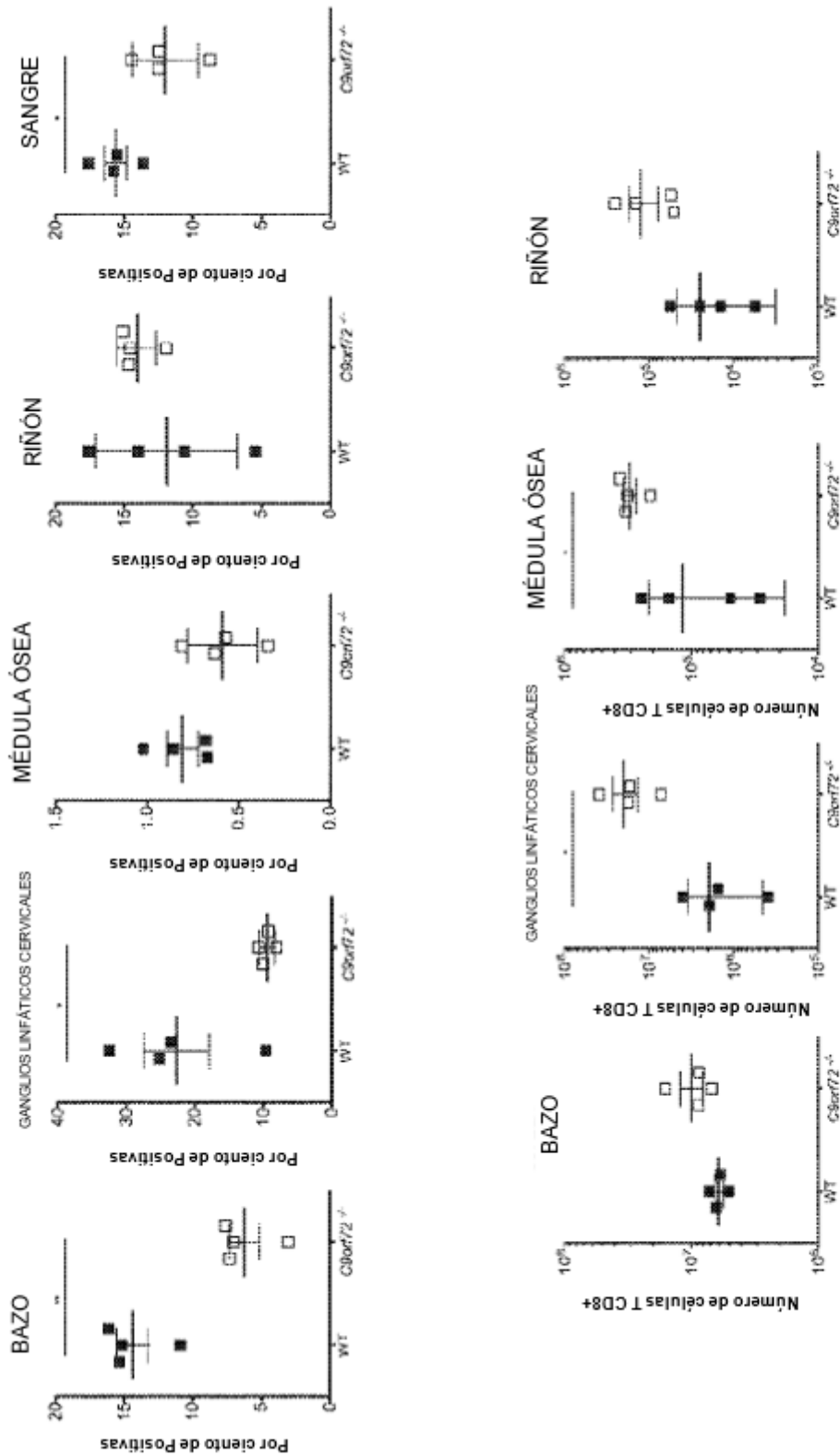


Figura 3T

CÉLULAS T CD4+

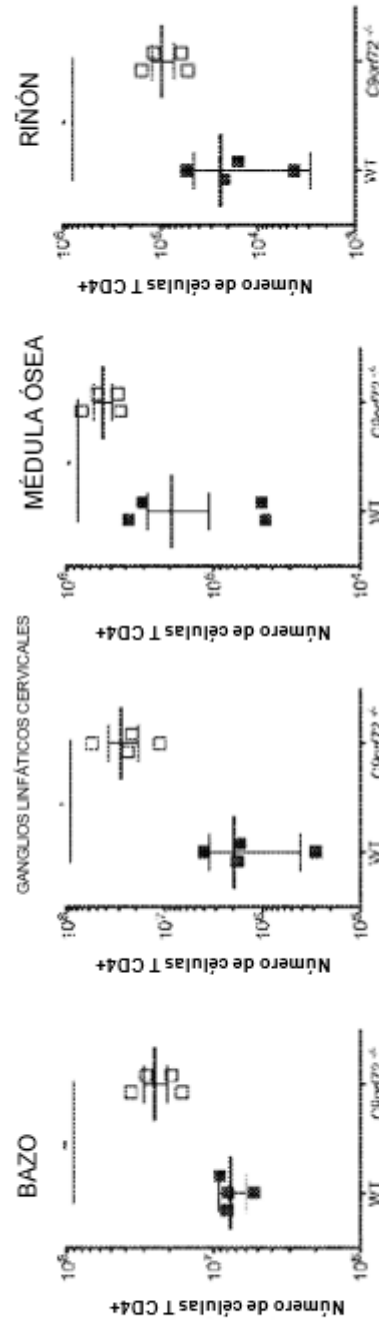
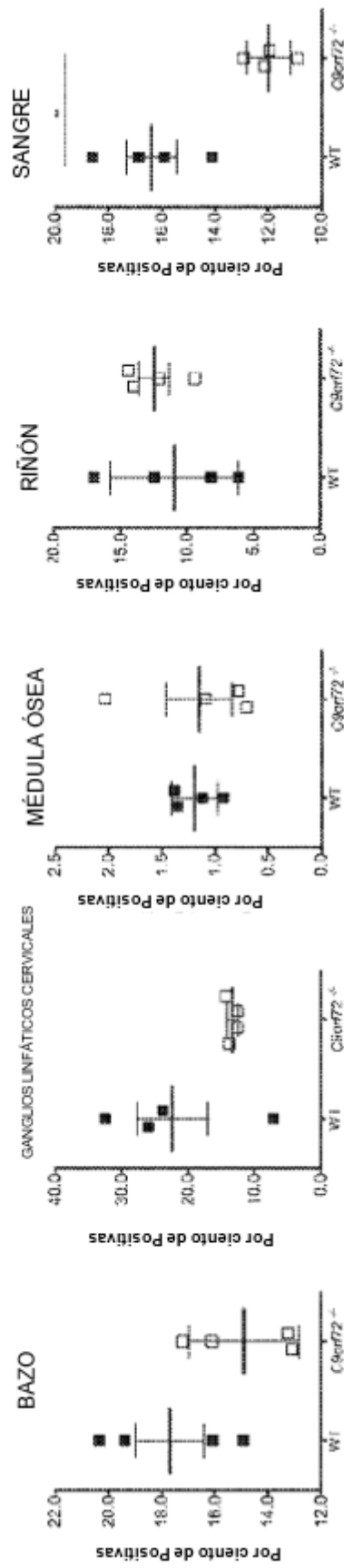


Figura 3U

CÉLULAS T CD8+CD44+

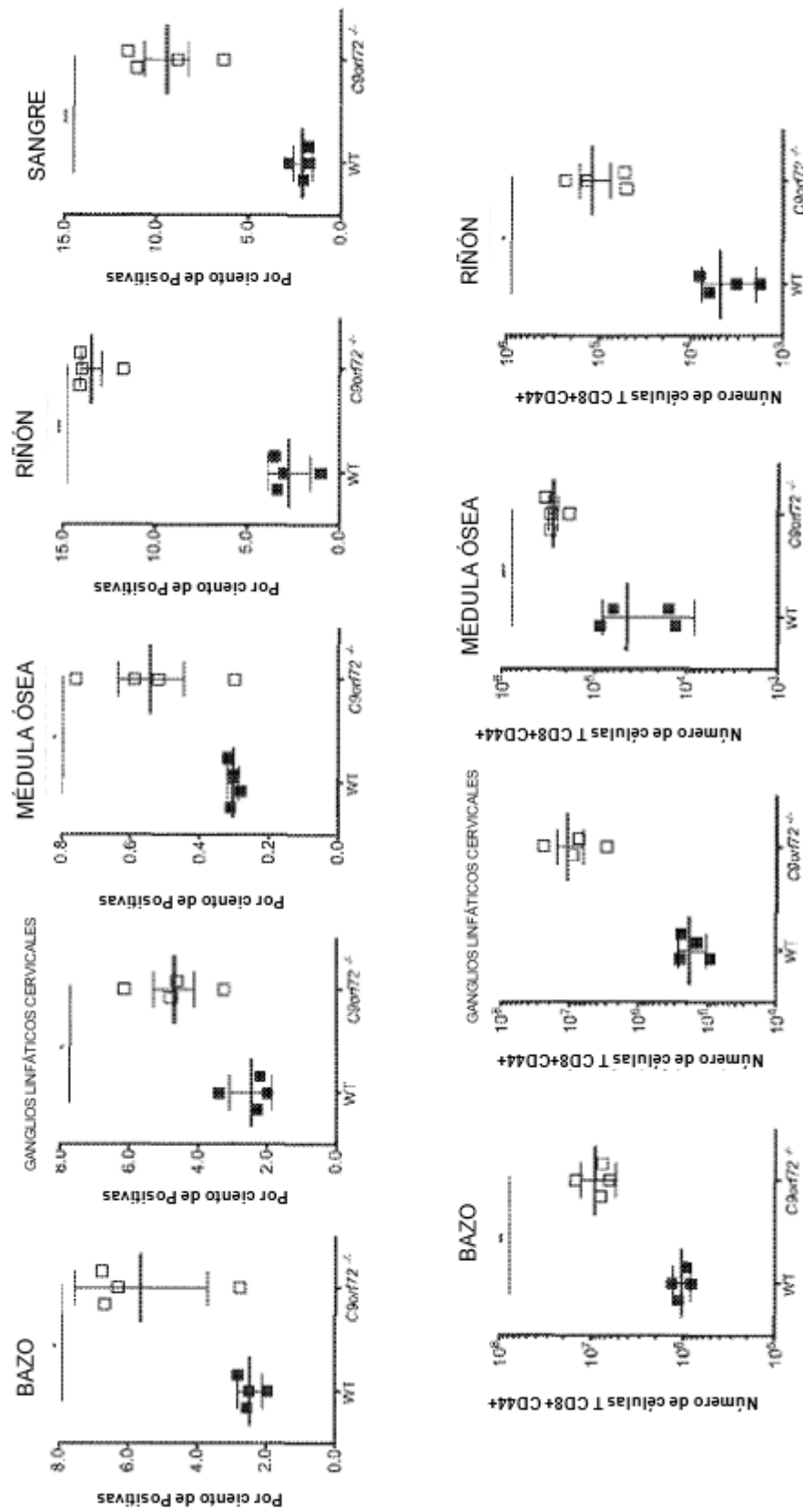


Figura 3V

CÉLULAS T CD4+CD44+

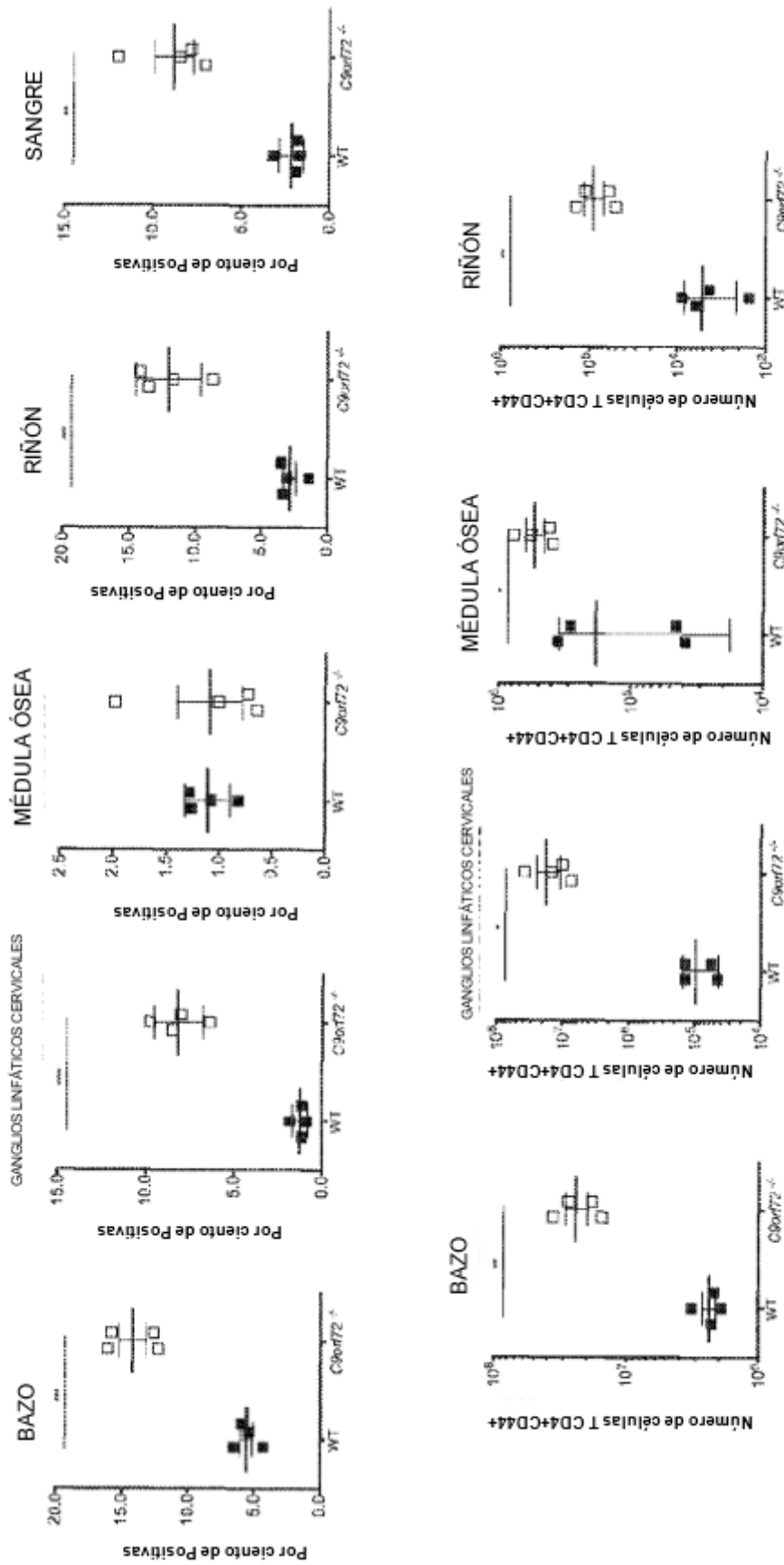


Figura 3W

CÉLULAS T CD8+CD69+

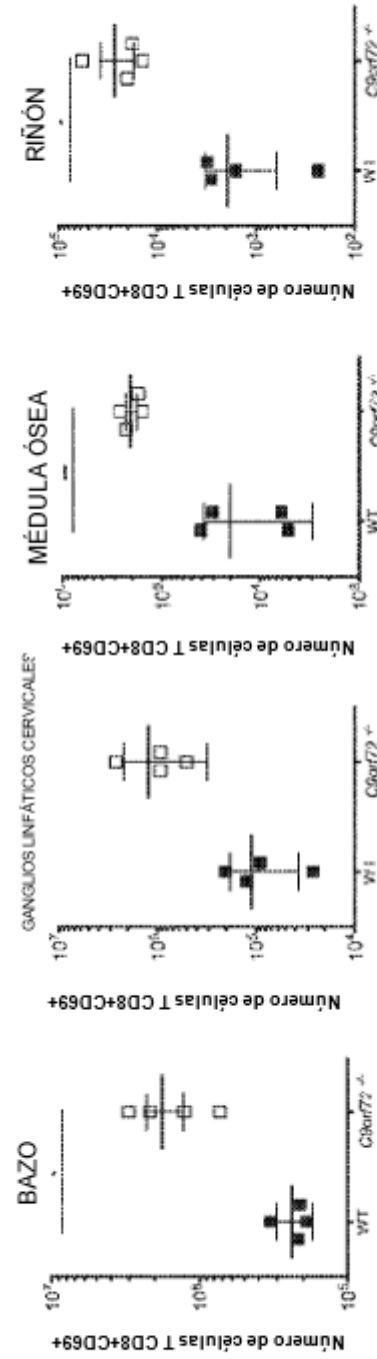
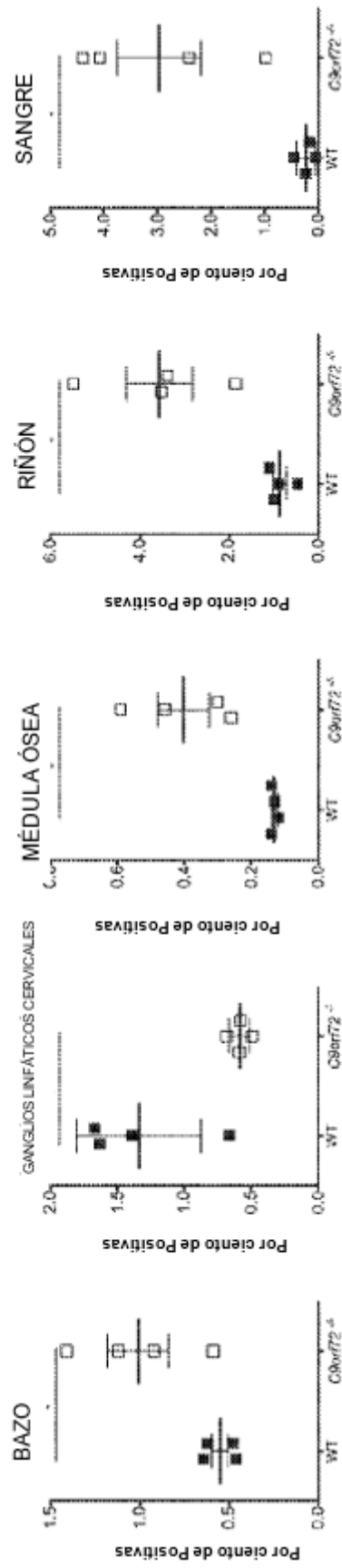


Figura 3X

CÉLULAS T CD4+CD69+

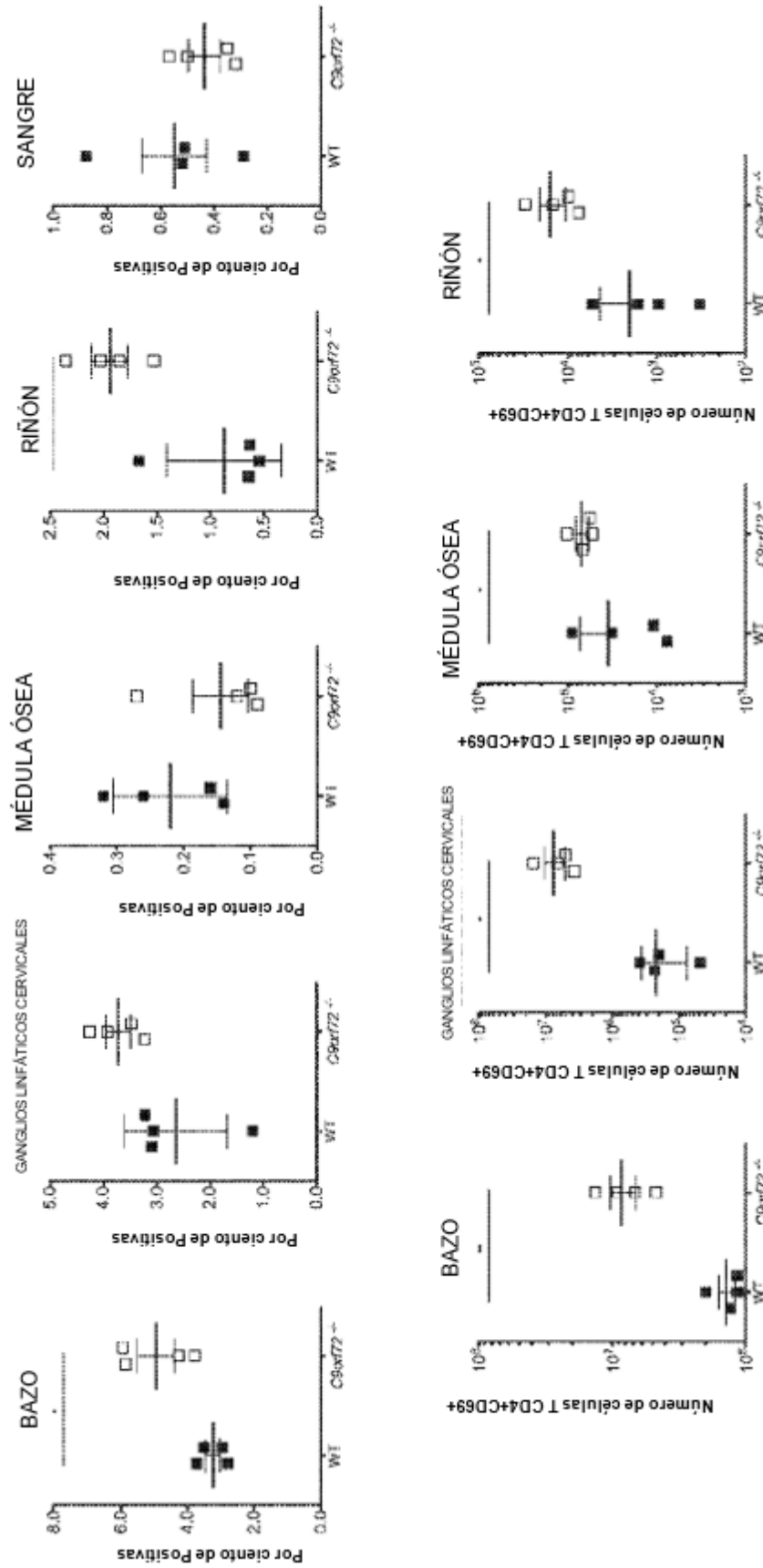


Figura 3Y

CÉLULAS T CD8+PD1+

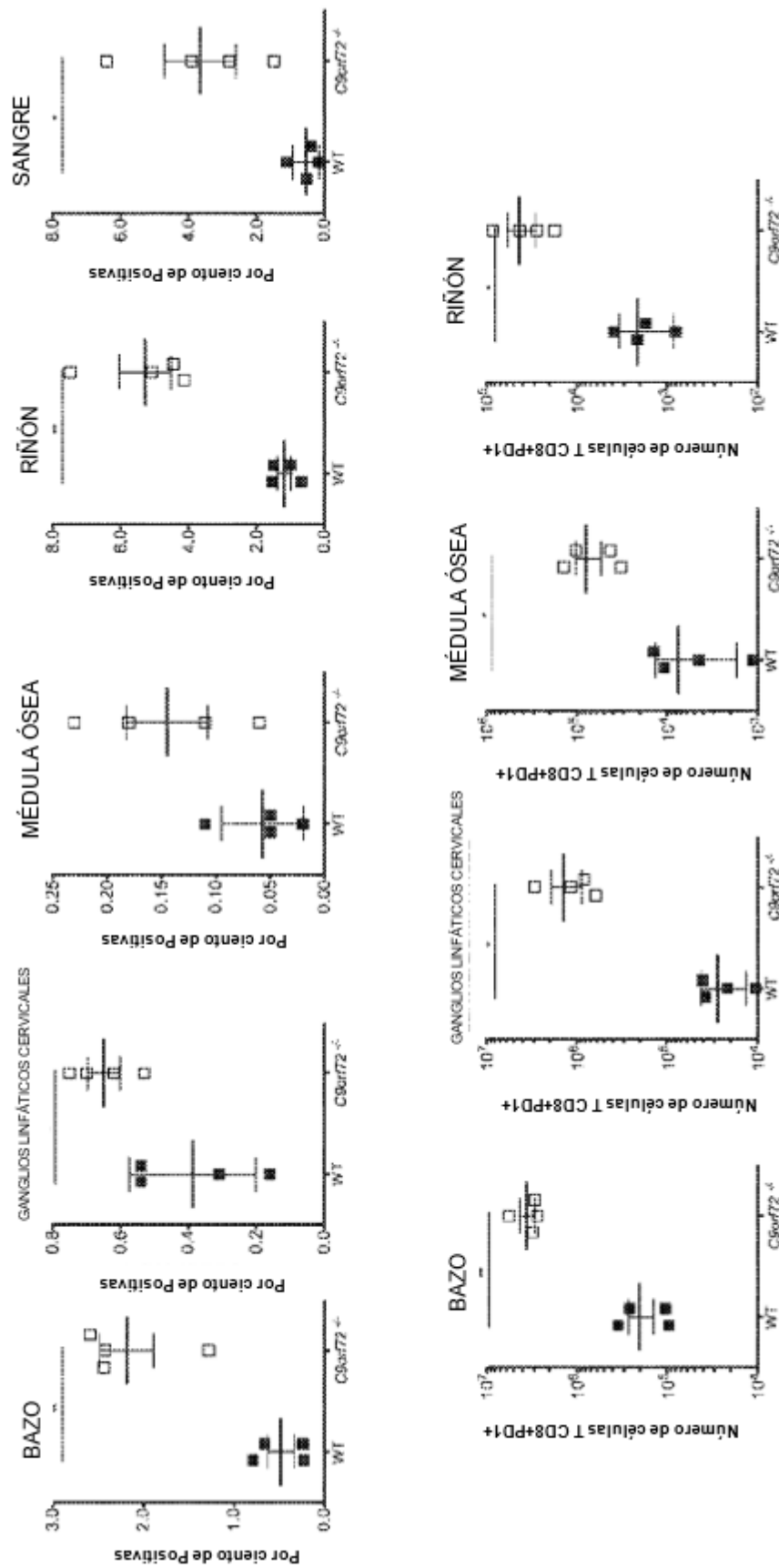


Figura 3Z

CÉLULAS T CD4+PD1+

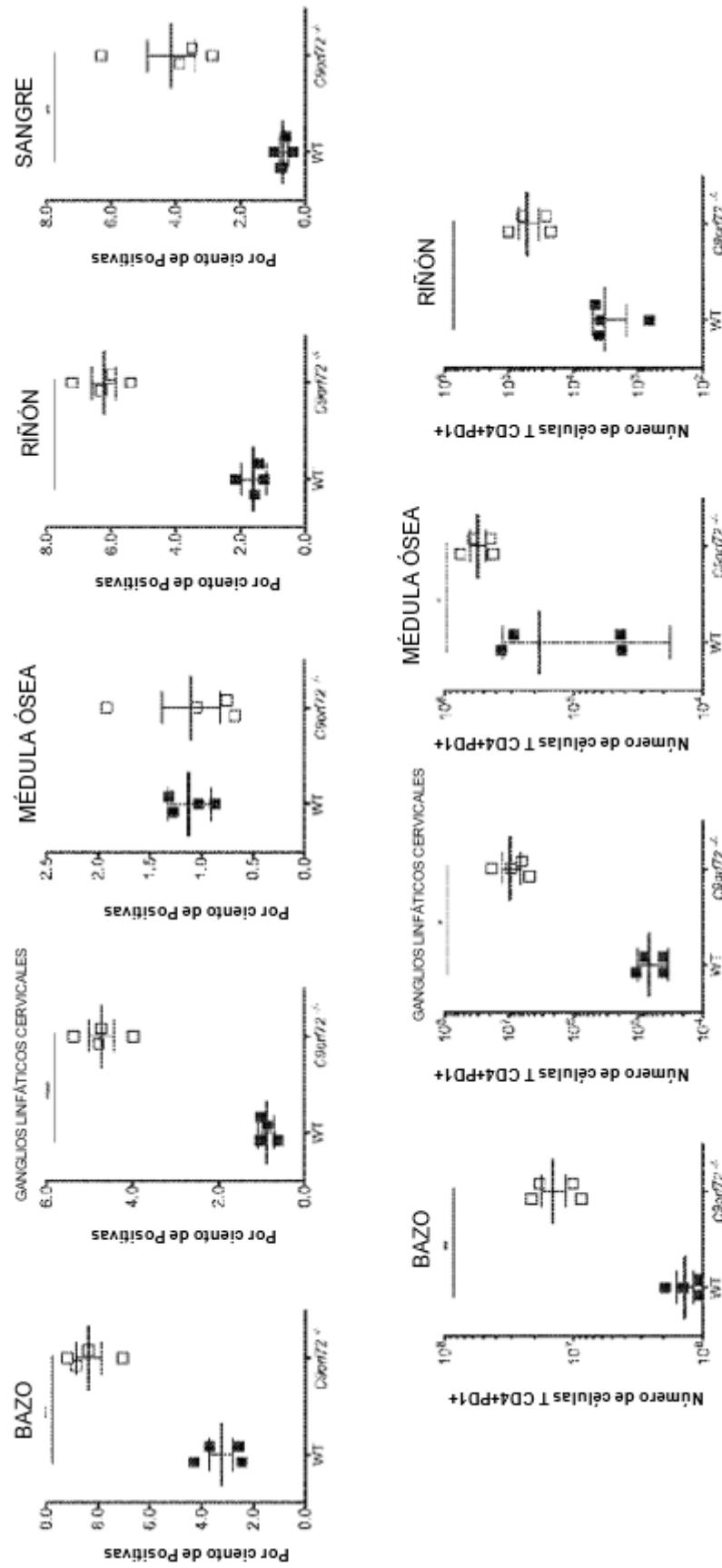


Figura 3AA

CÉLULAS T CD4+FoxP3+

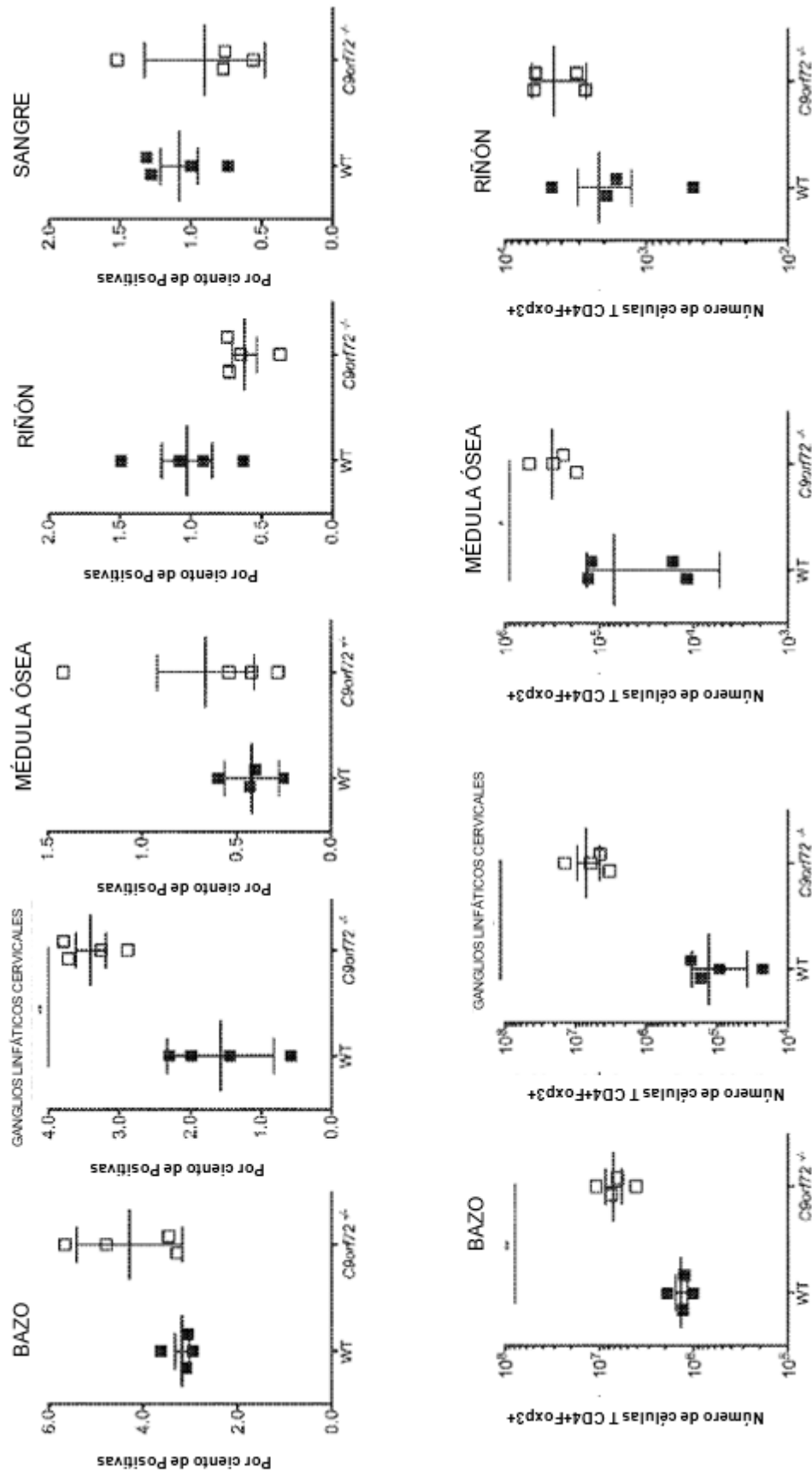


Figura 3AB

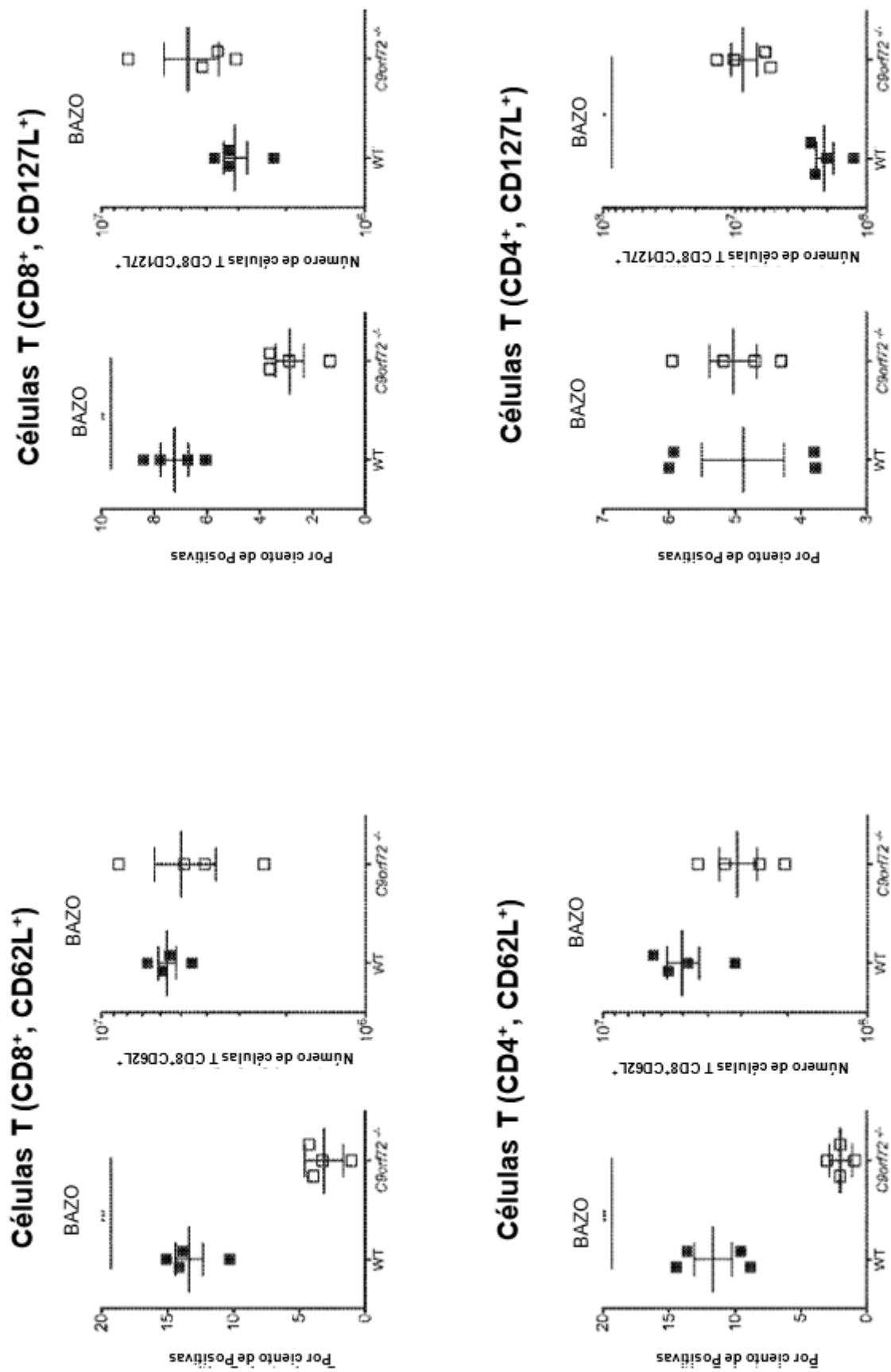


Figura 3AC

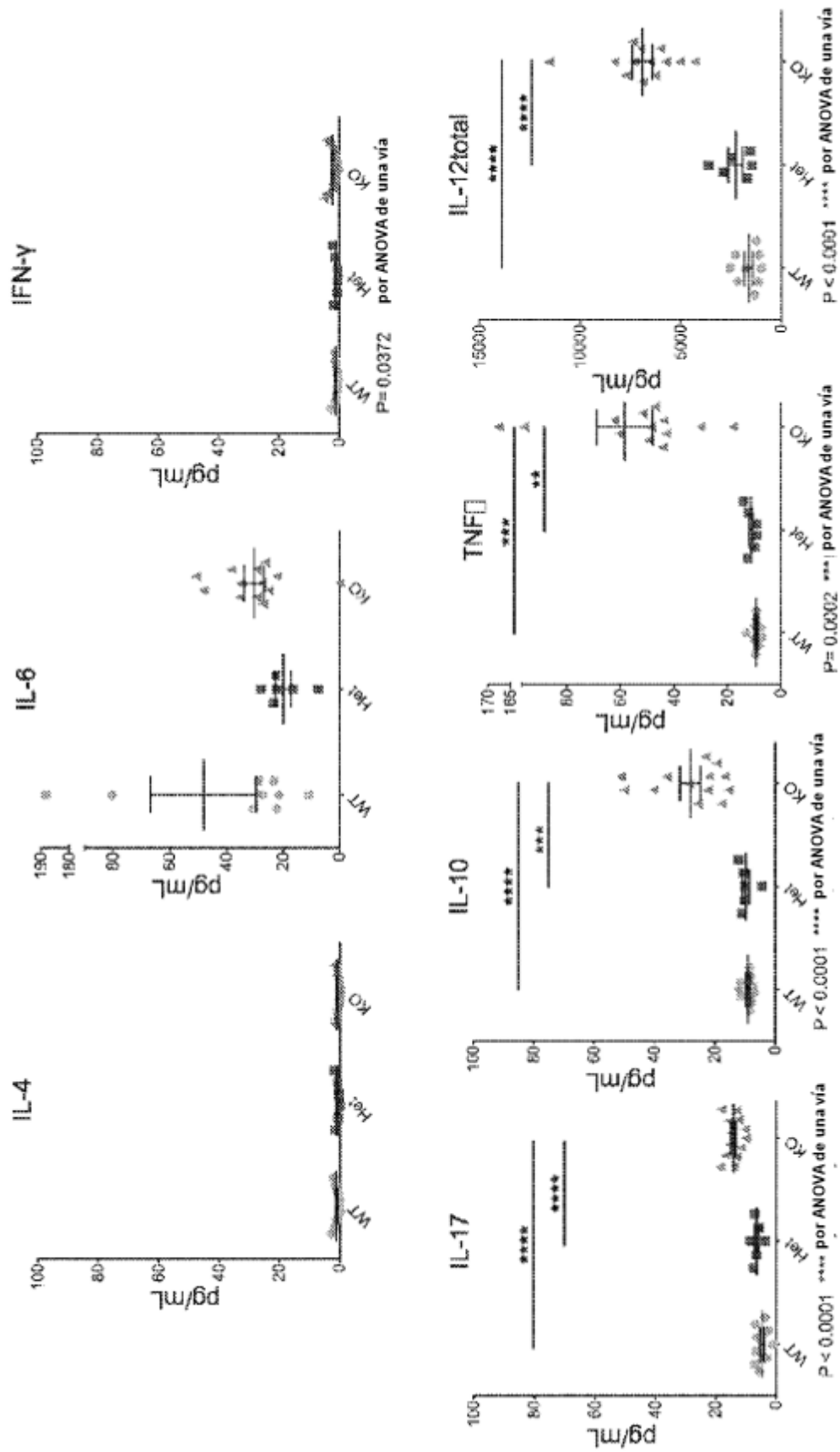


Figura 3AD

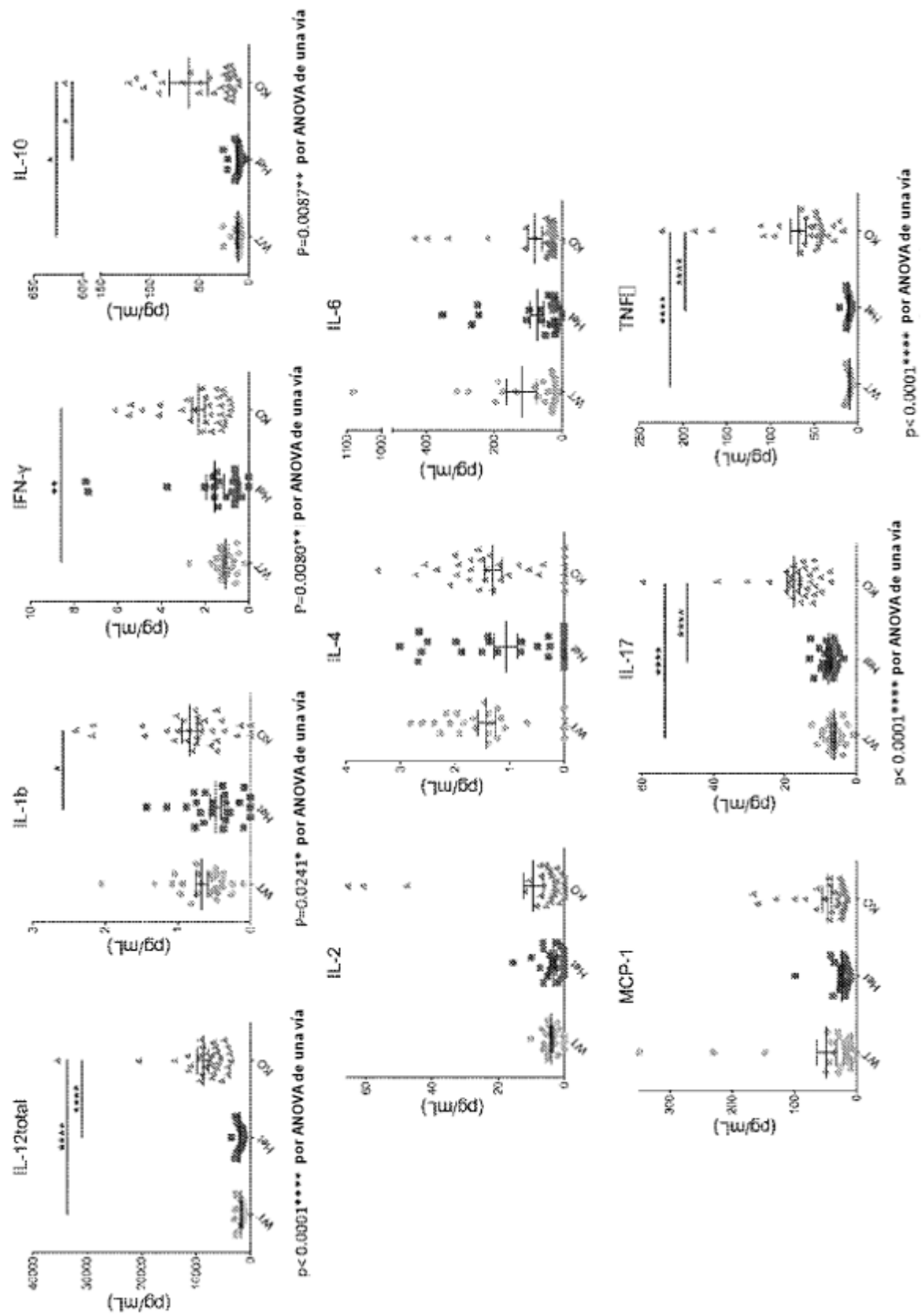


Figura 3AE

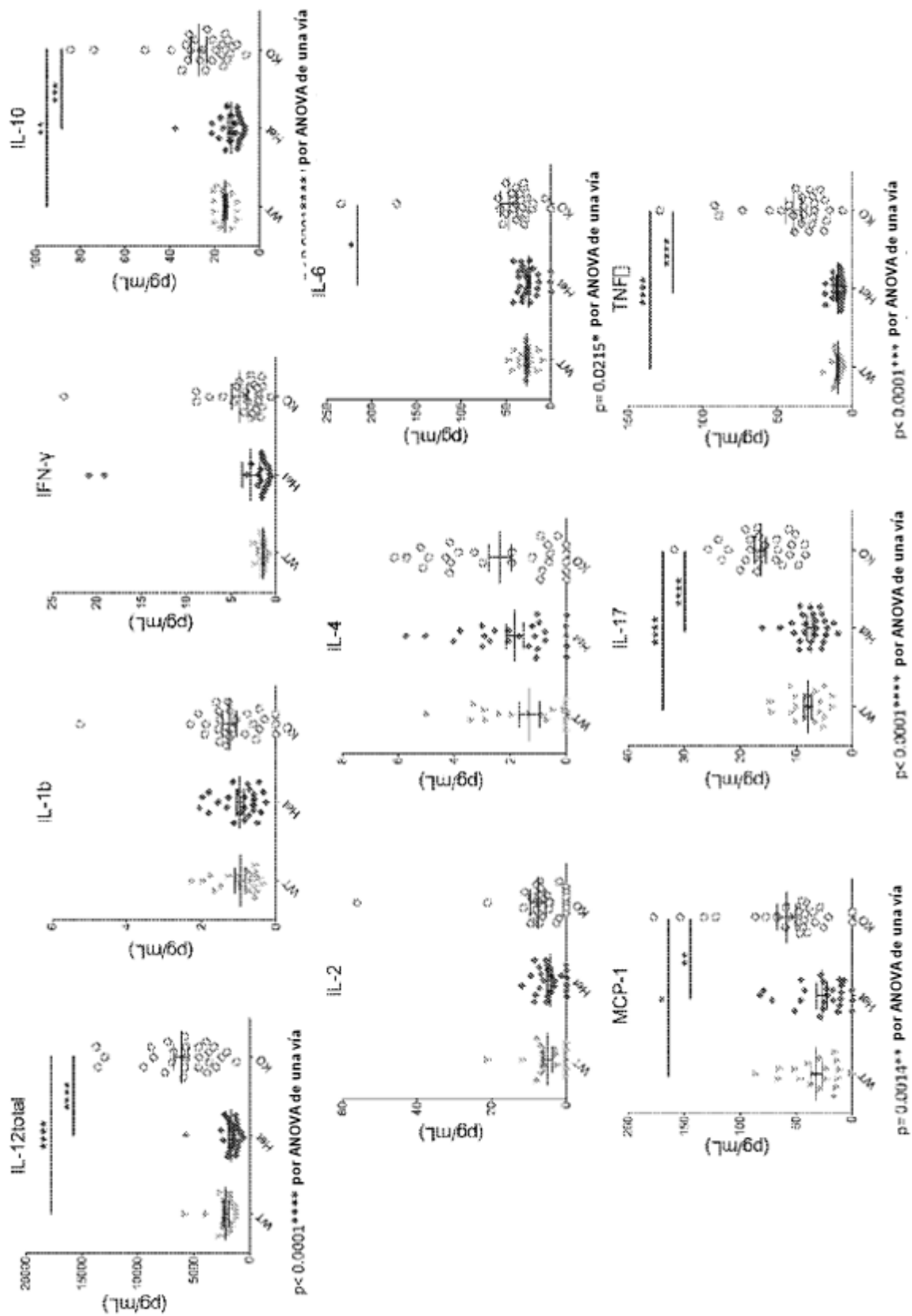
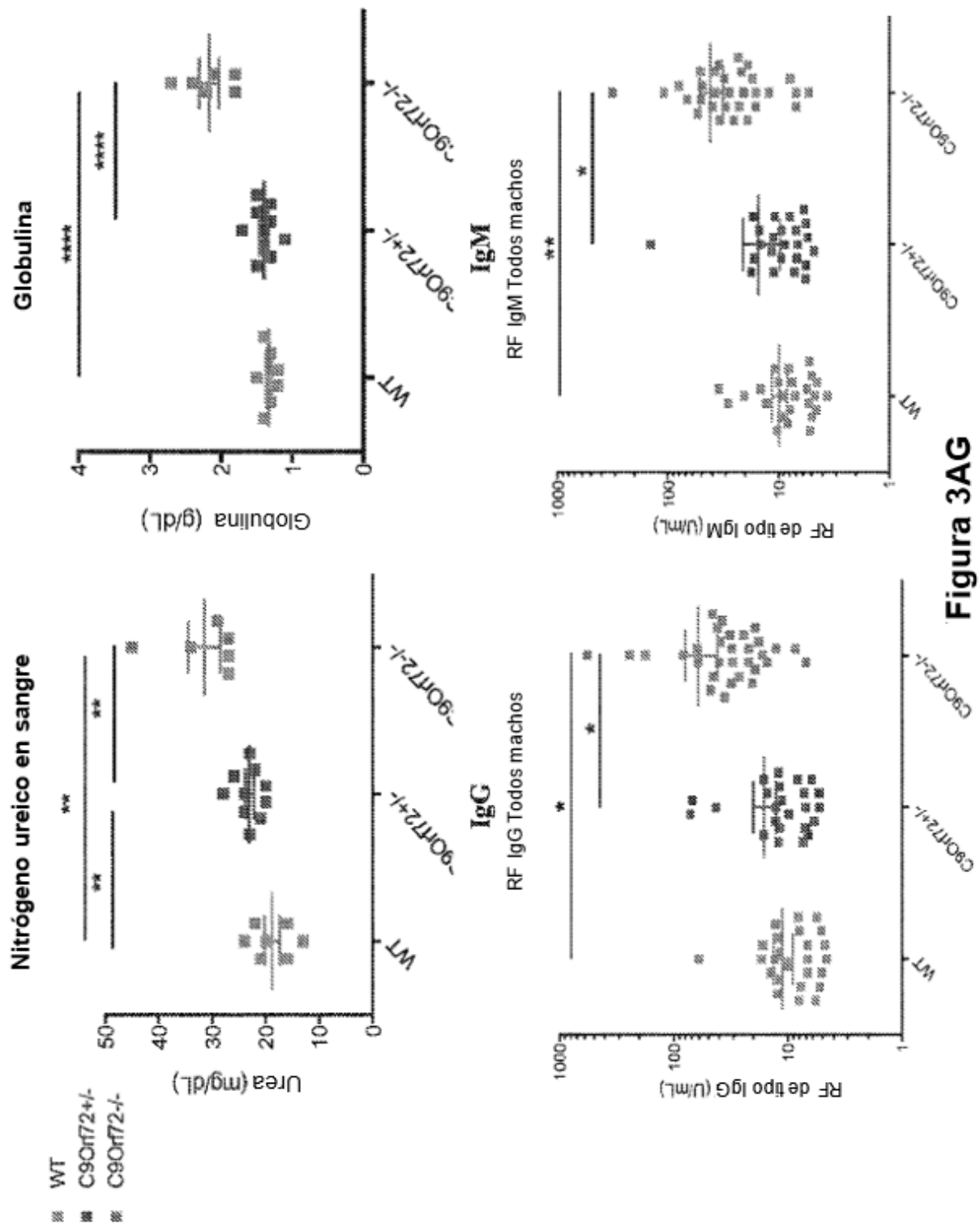


Figura 3AF



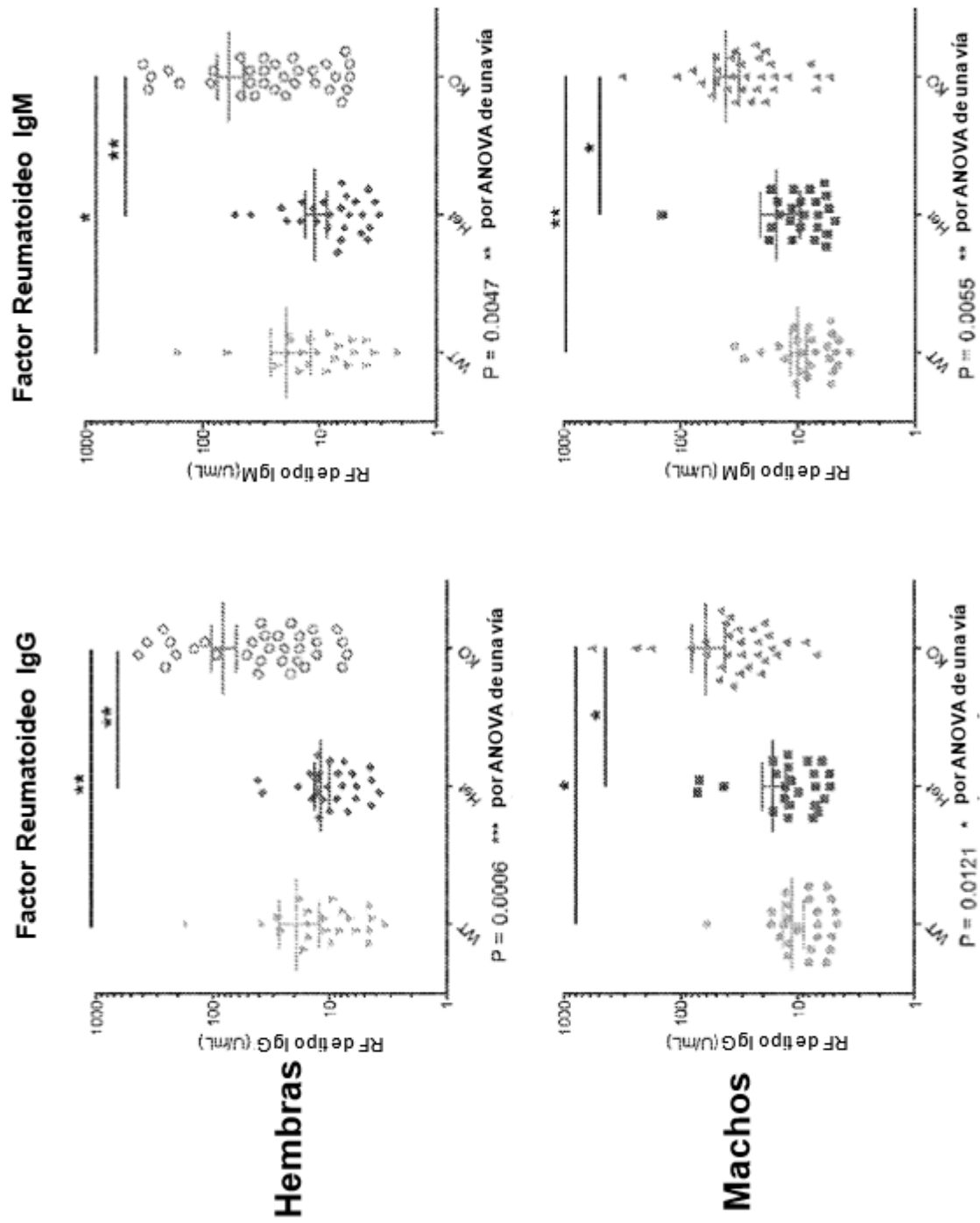


Figura 3AH

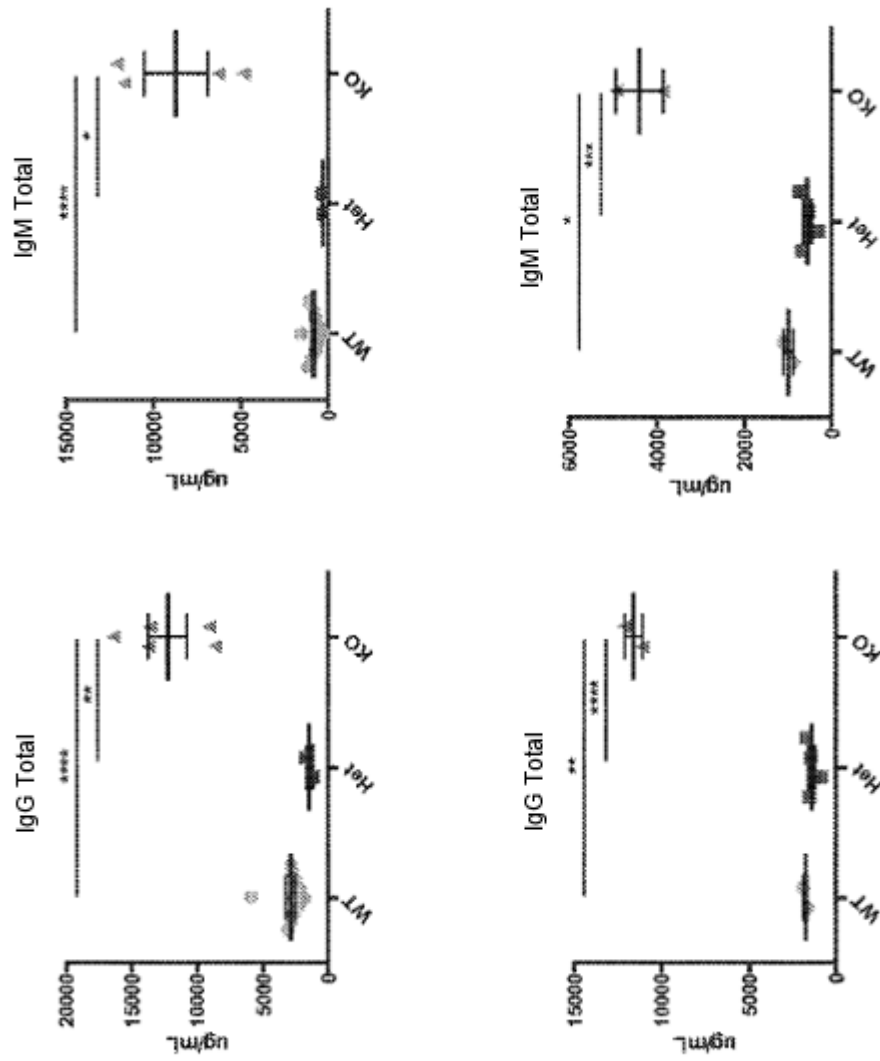


Figura 3AI

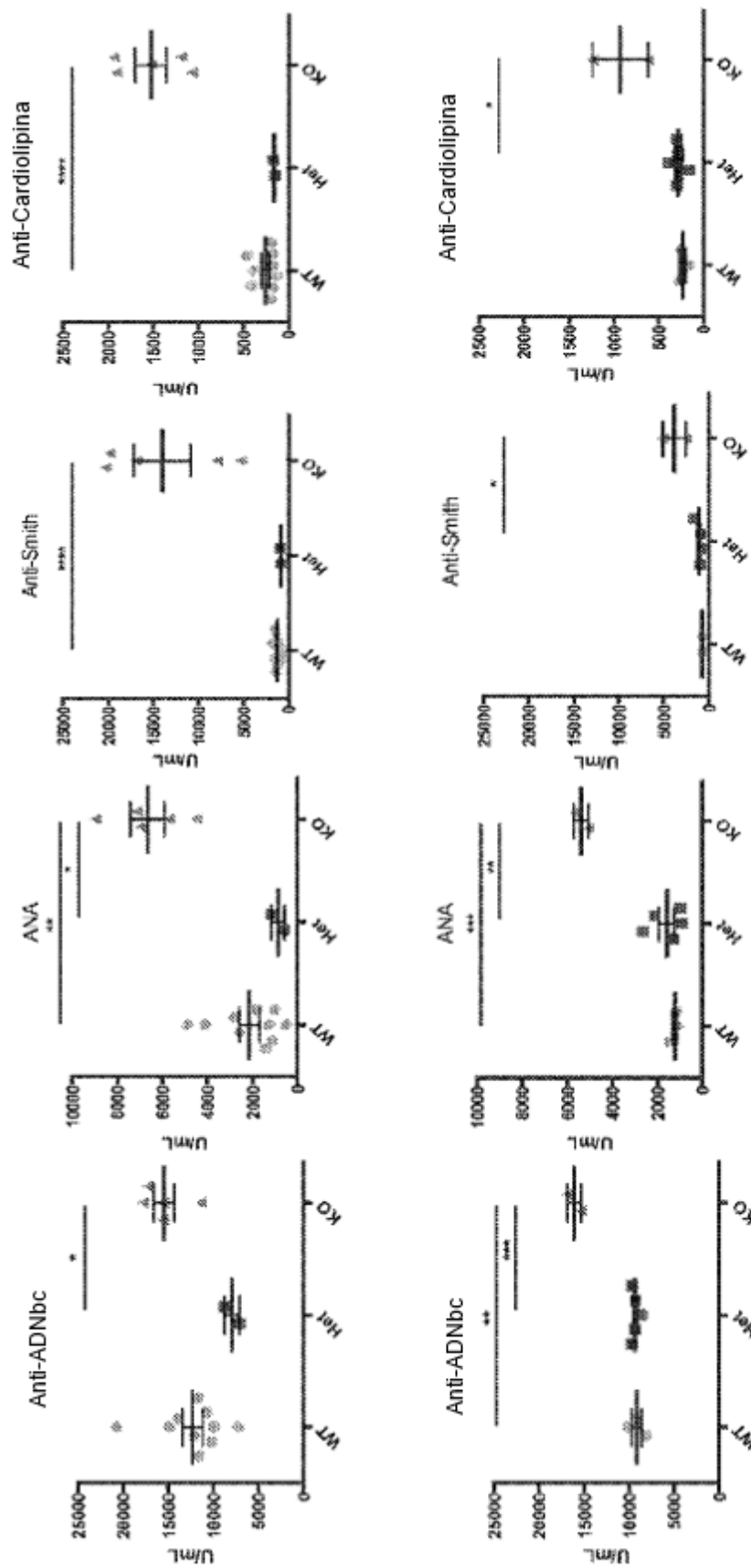


Figura 3AJ

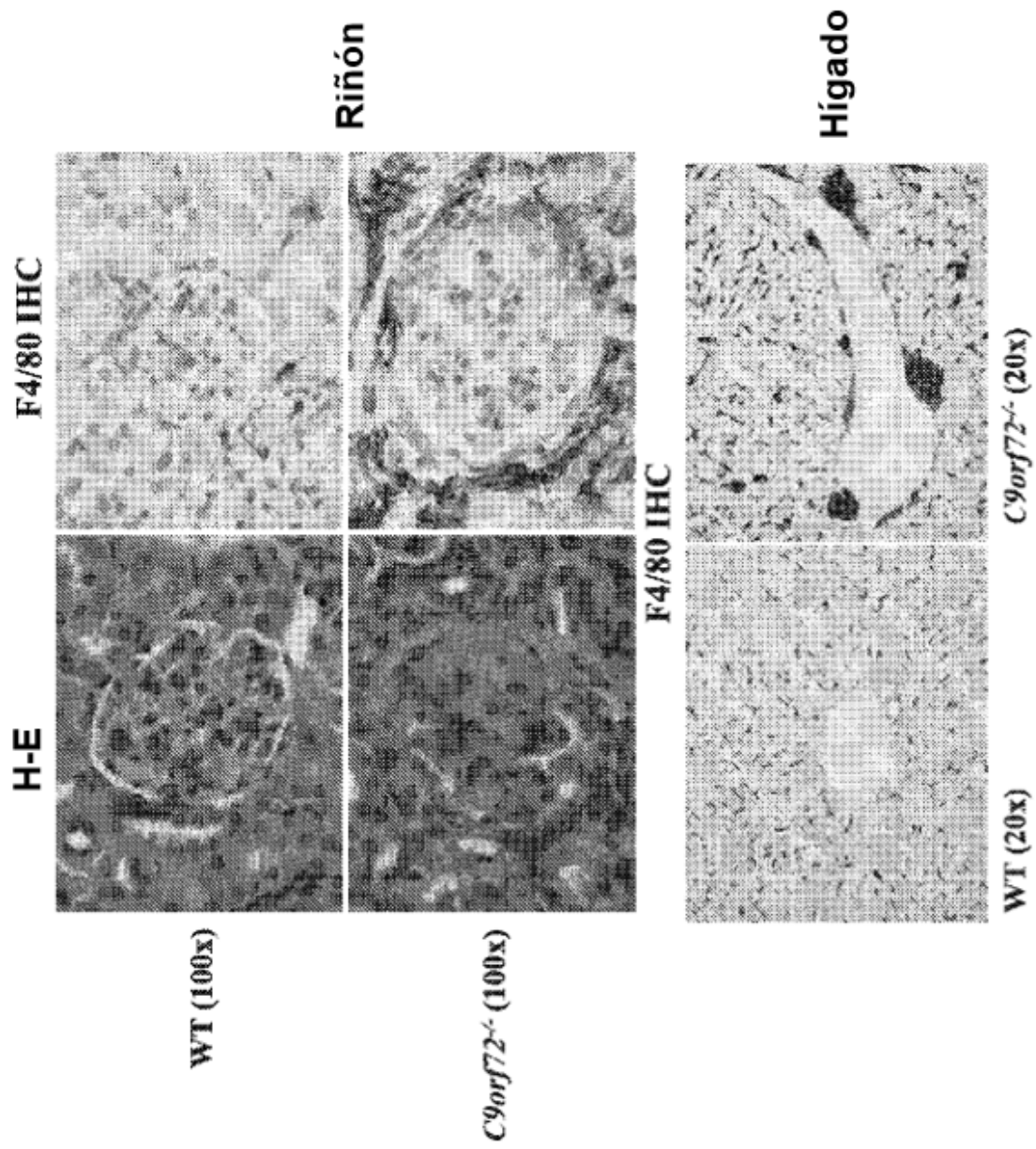


Figura 3AK

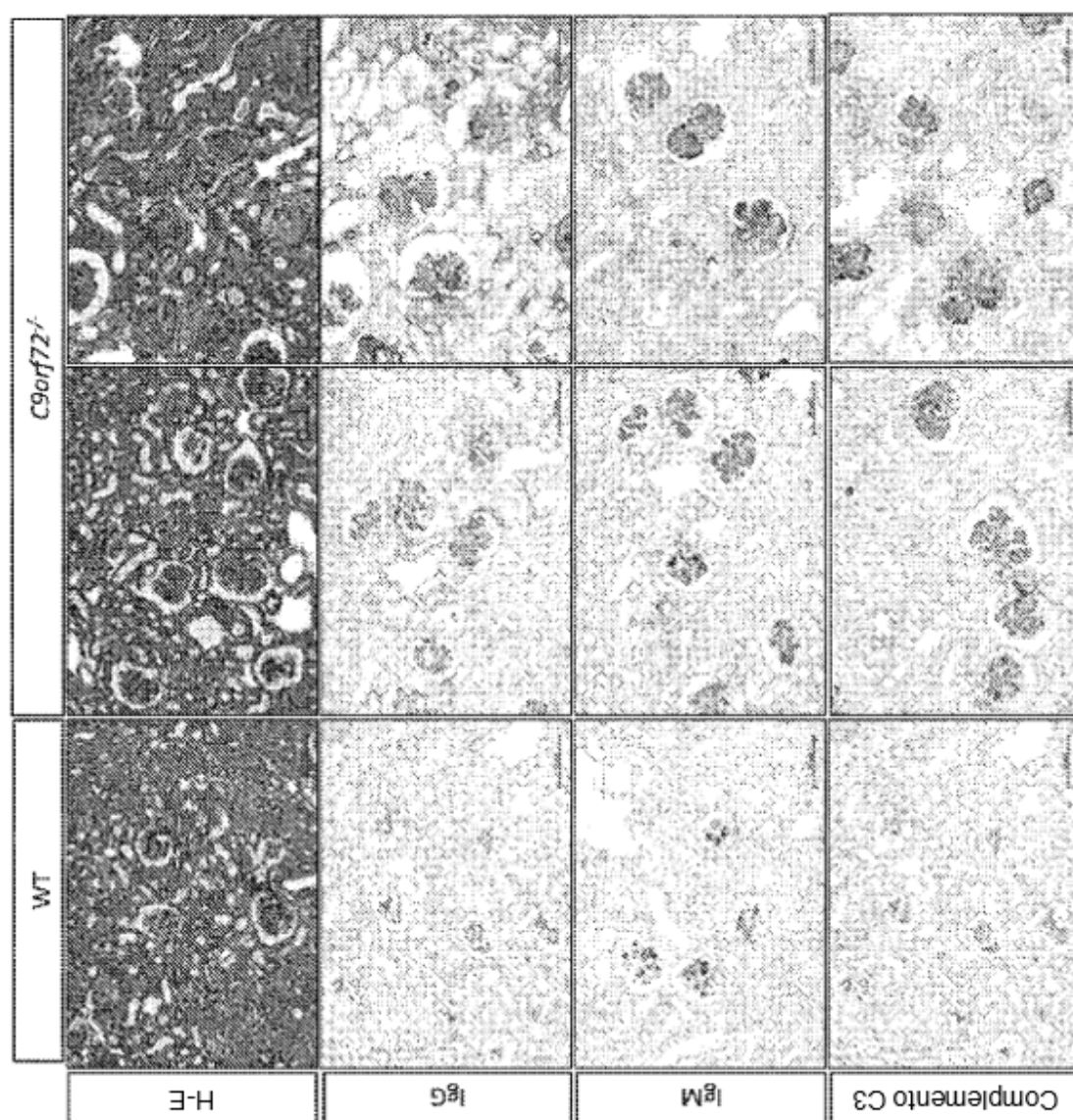


Figura 3AL

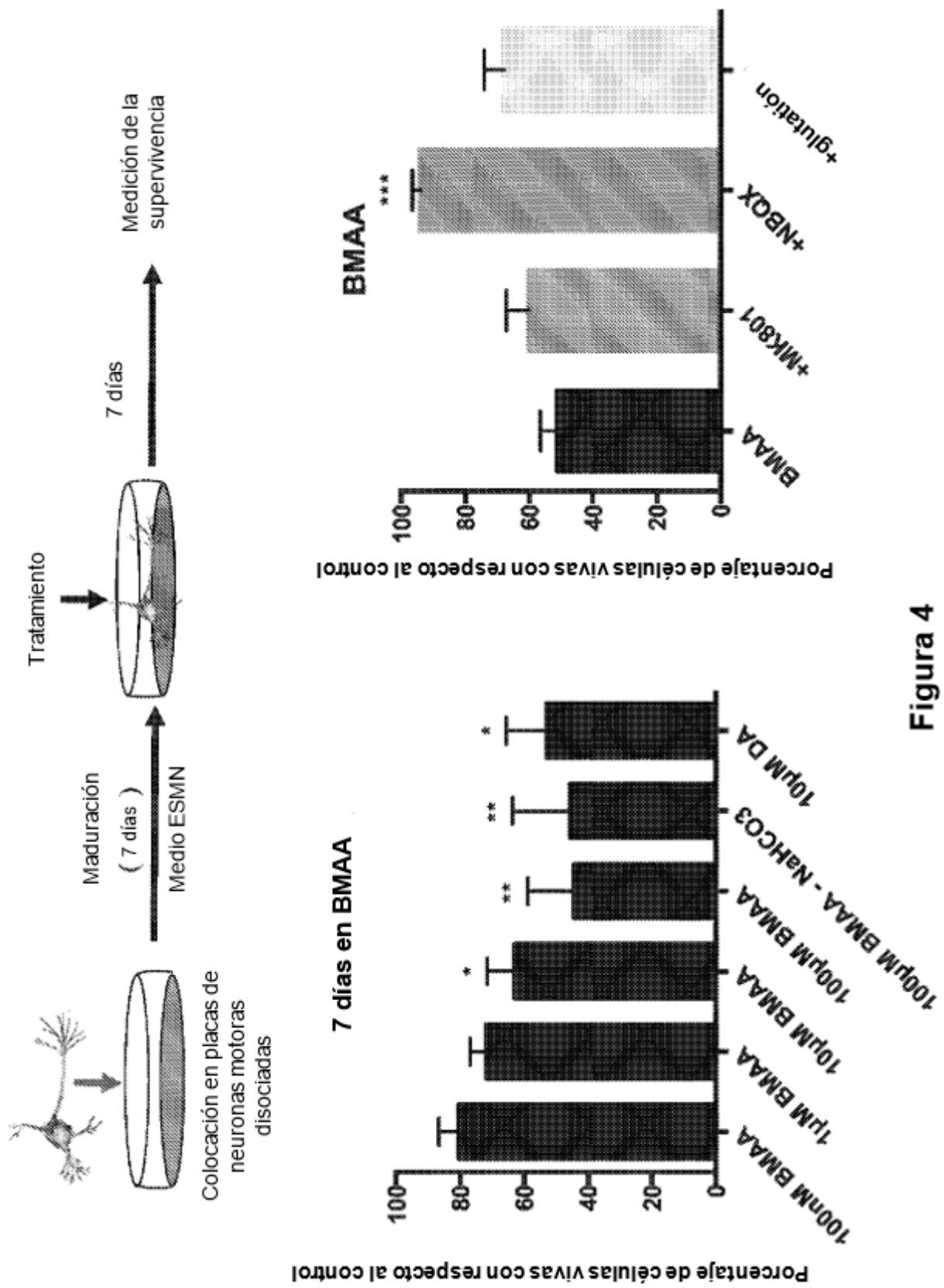


Figura 4

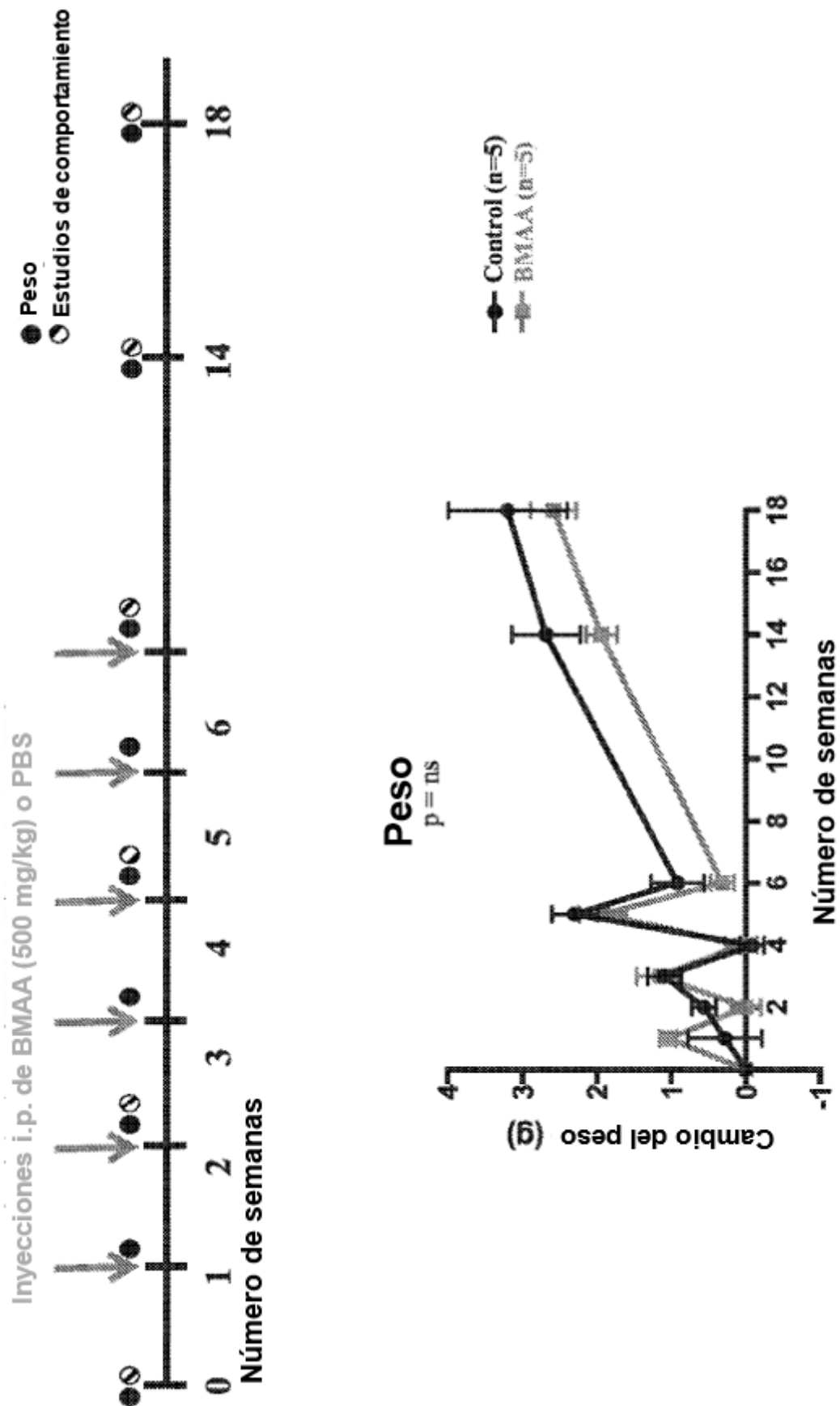


Figura 5A

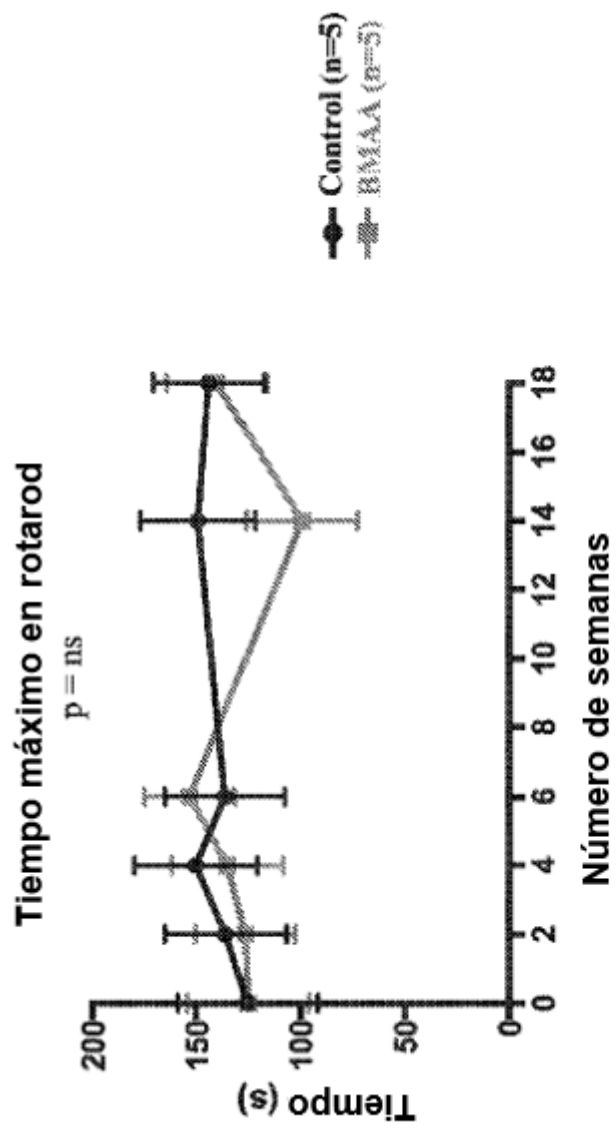


Figura 5B

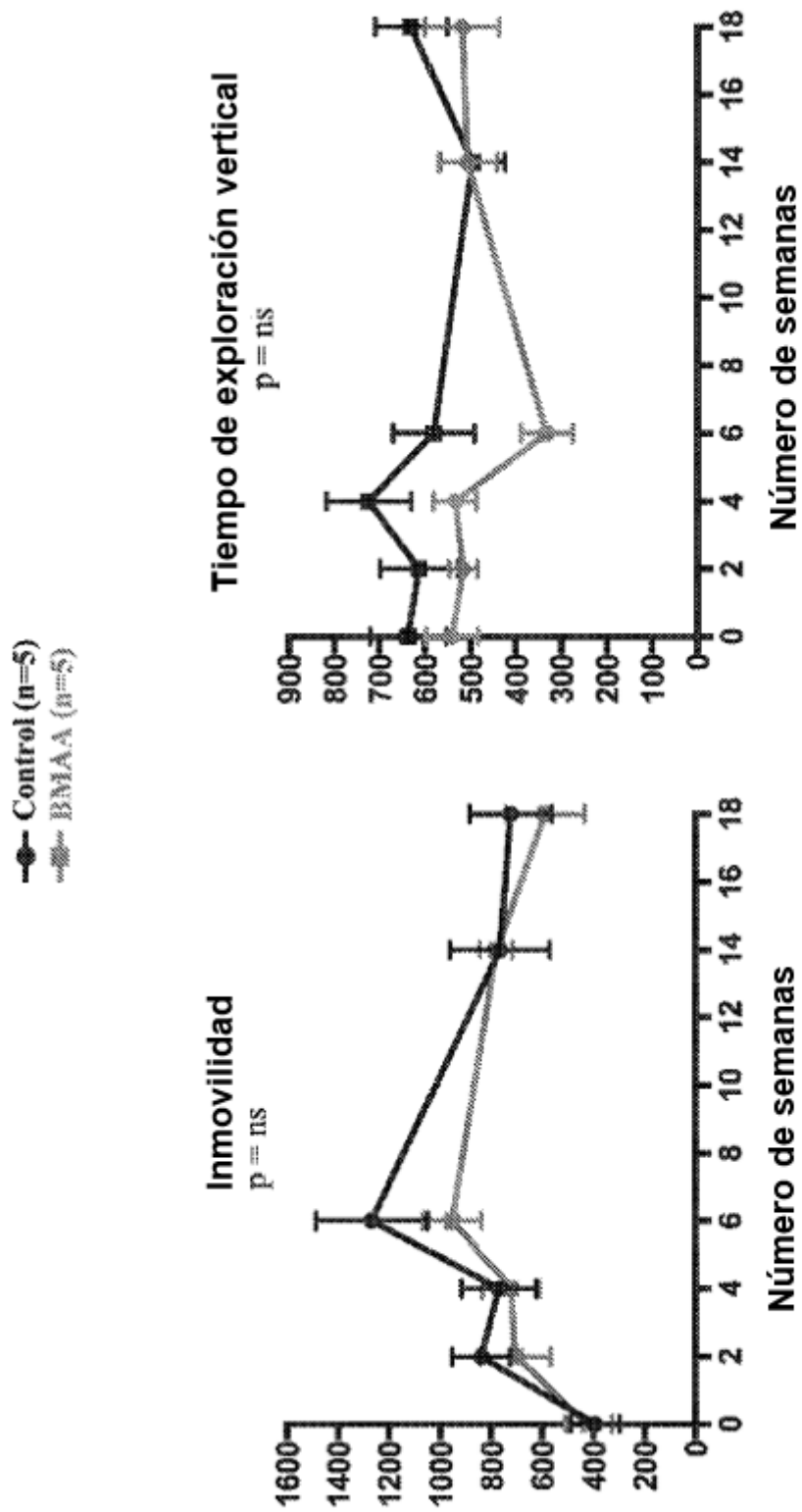


Figura 5C

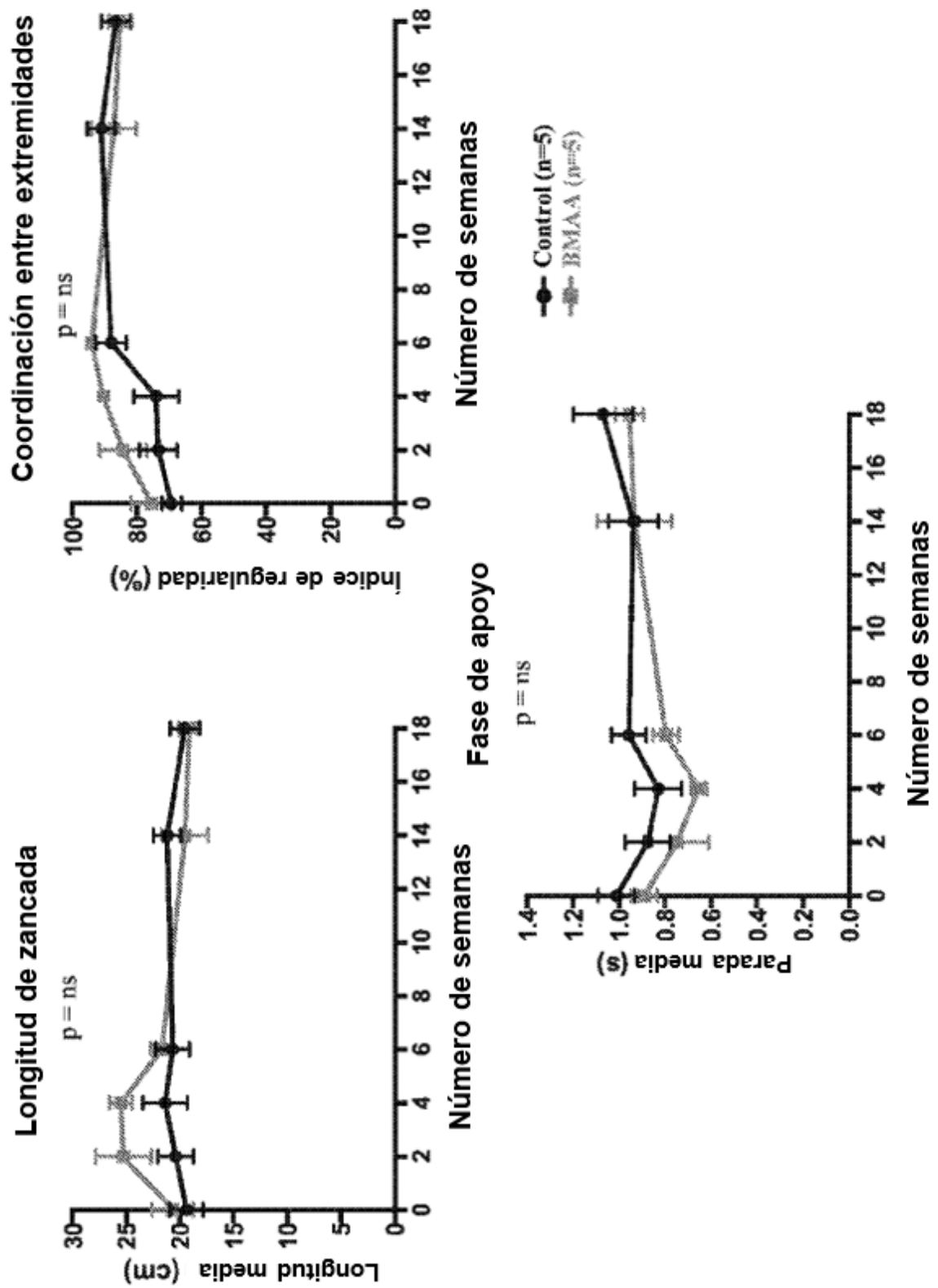


Figura 5D

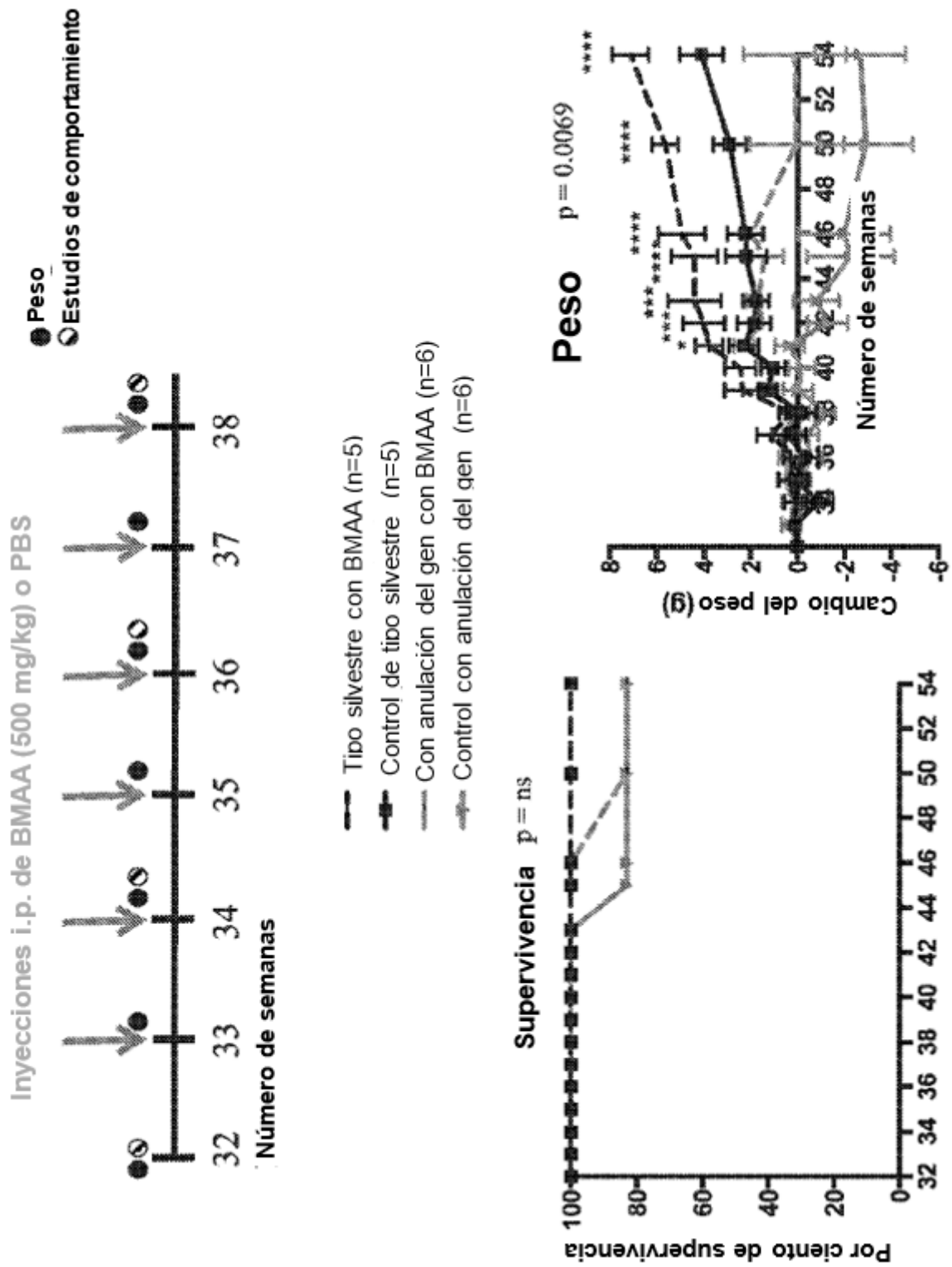


Figura 6A

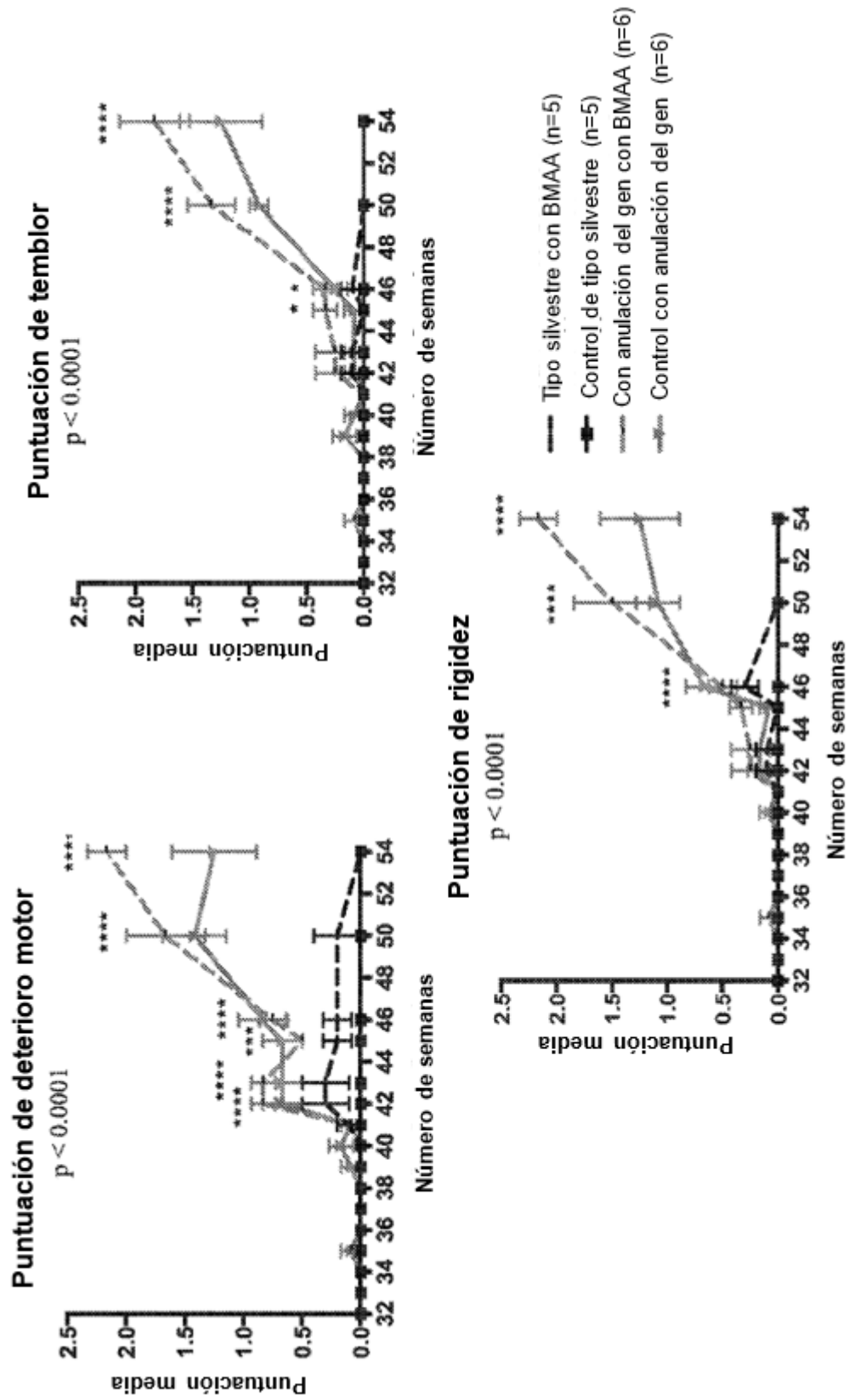


Figura 6B

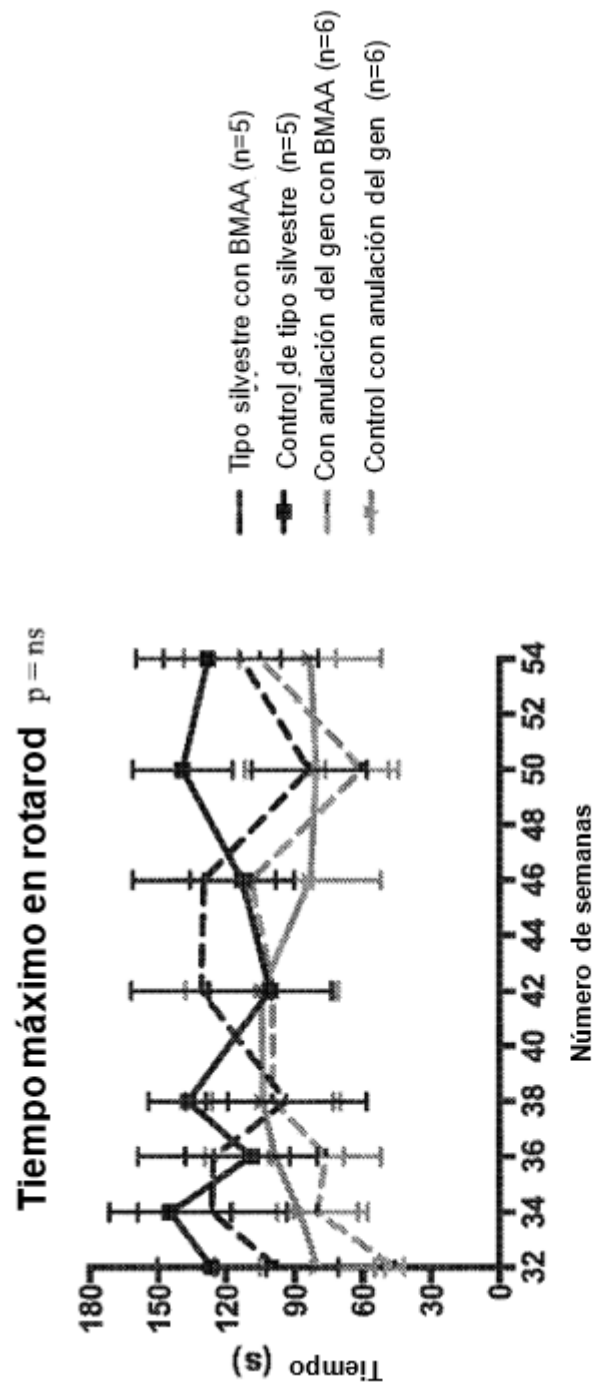


Figura 6C

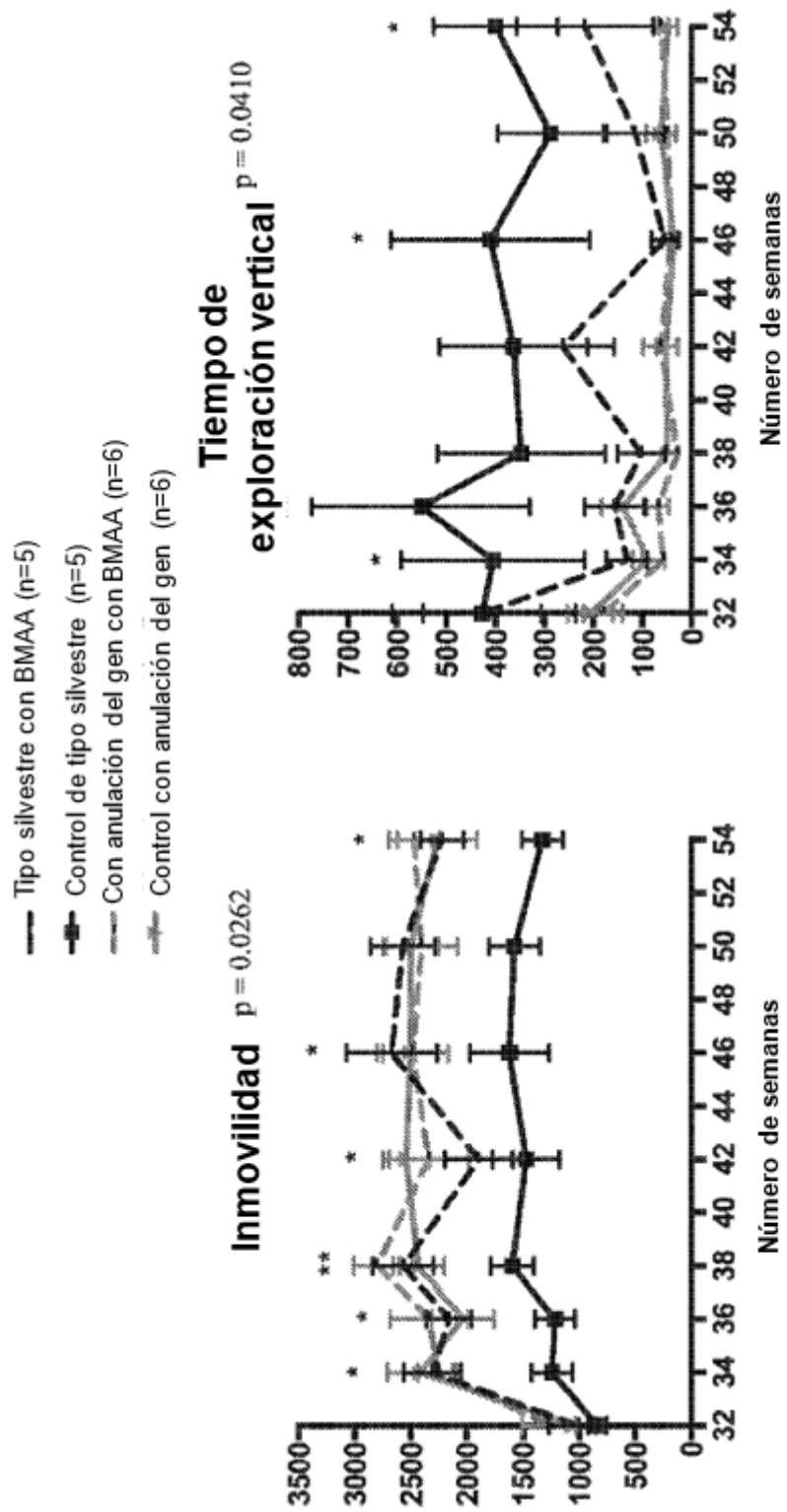


Figura 6D

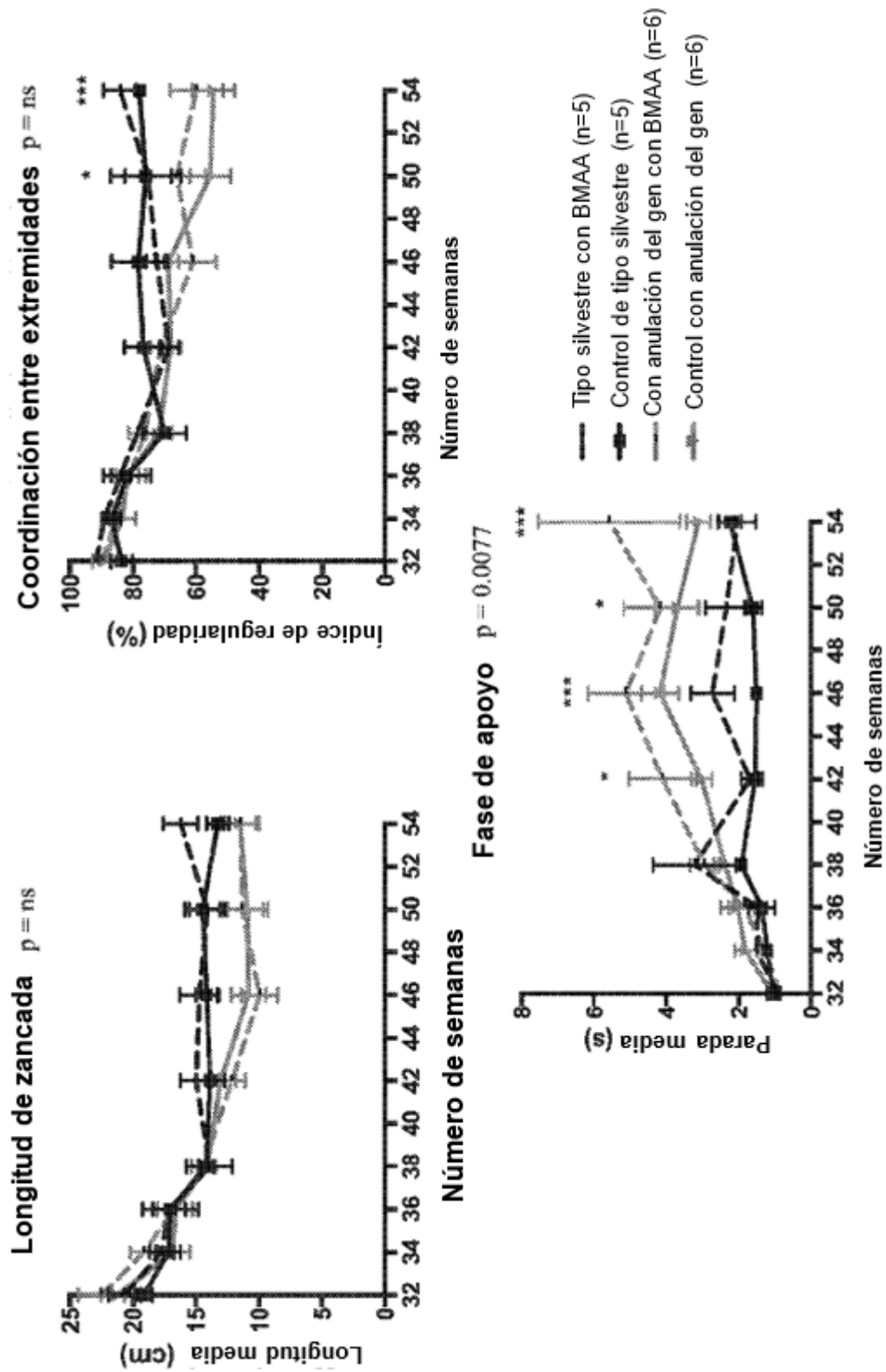


Figura 6E

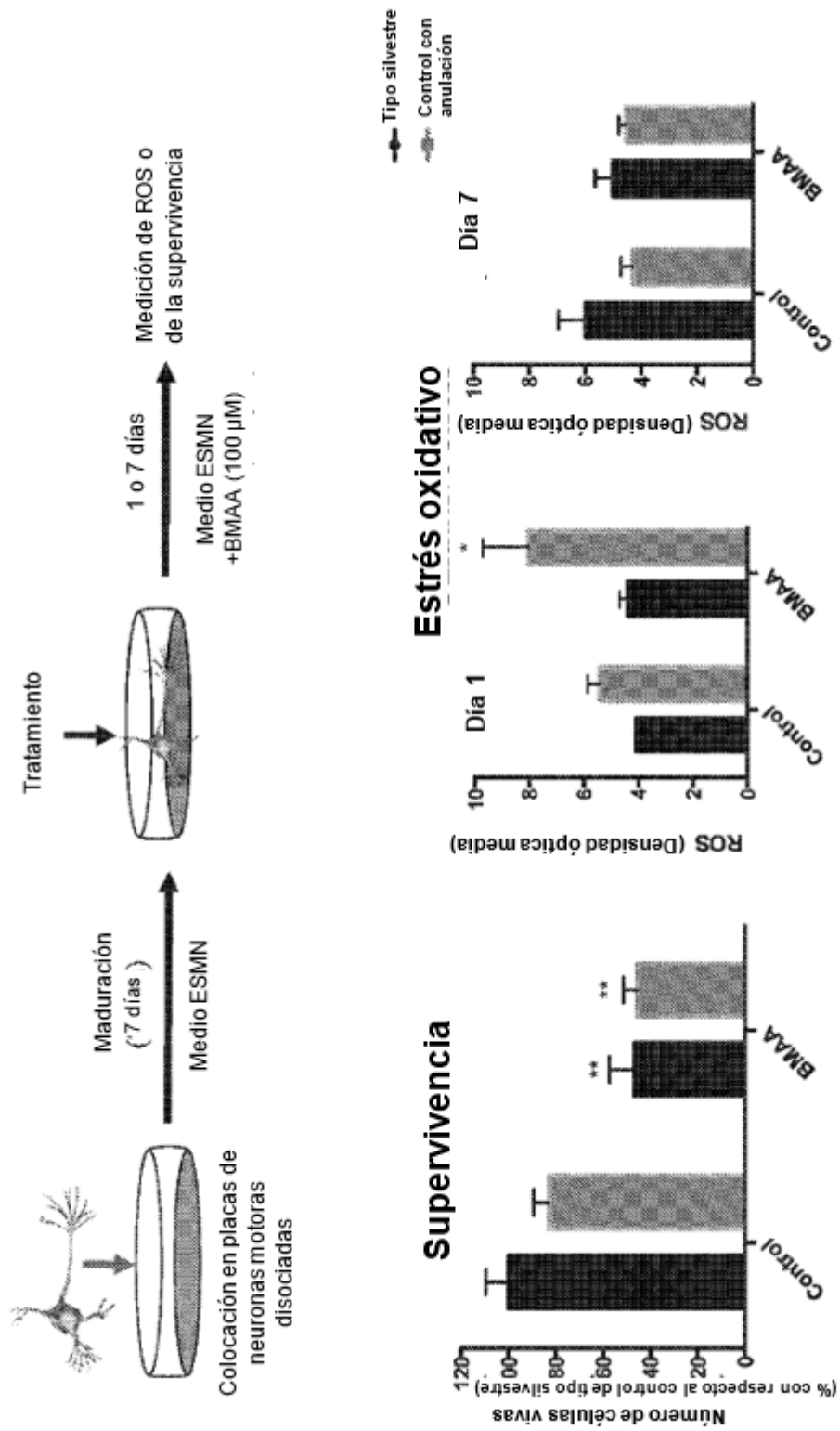


Figura 7

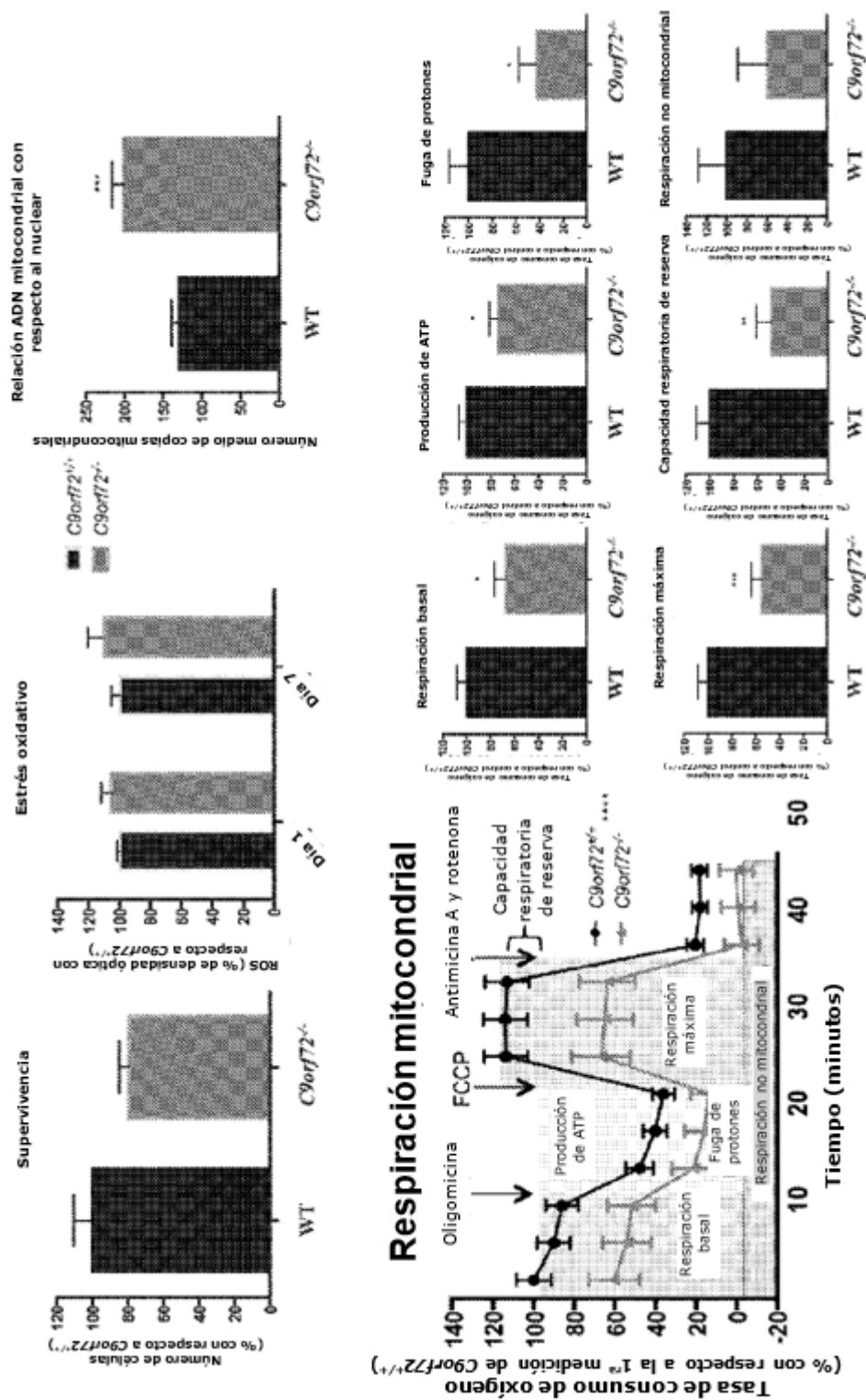


Figura 8

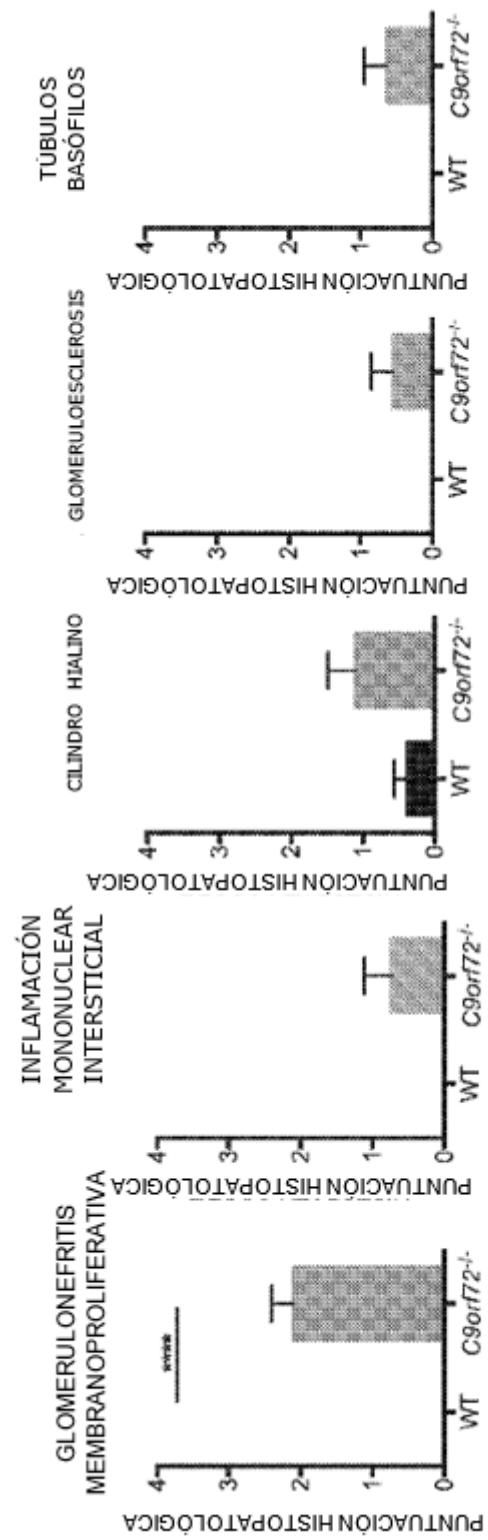


Figura 9A

Genotipo	Edad (sem)	Glomerulonefritis membranoproliferativa	Inflamación mononuclear intersticial	Cilindro hialino	Glomerulosclerosis	Túbulos basófilos
WT	38	0	0	0	0	0
WT	38	0	0	0	0	0
WT	40	0	0	0	0	0
WT	63	0	0	1	0	0
WT	63	0	0	0	0	0
WT	63	0	0	1	0	0
WT	63	0	0	0	0	0
WT	61	0	0	1	0	0
C9orf72 ^{-/-}	38	1	0	0	0	0
C9orf72 ^{-/-}	38	2	0	0	0	1
C9orf72 ^{-/-}	37	4	2	3	2	2
C9orf72 ^{-/-}	37	1	0	0	0	0
C9orf72 ^{-/-}	37	3	3	3	1	3
C9orf72 ^{-/-}	35	1	0	0	0	0
C9orf72 ^{-/-}	63	1	0	1	0	0
C9orf72 ^{-/-}	63	2	0	0	0	0
C9orf72 ^{-/-}	61	3	3	3	3	0
C9orf72 ^{-/-}	61	2	0	1	0	1
C9orf72 ^{-/-}	61	3	0	1	0	0

Figura 9B

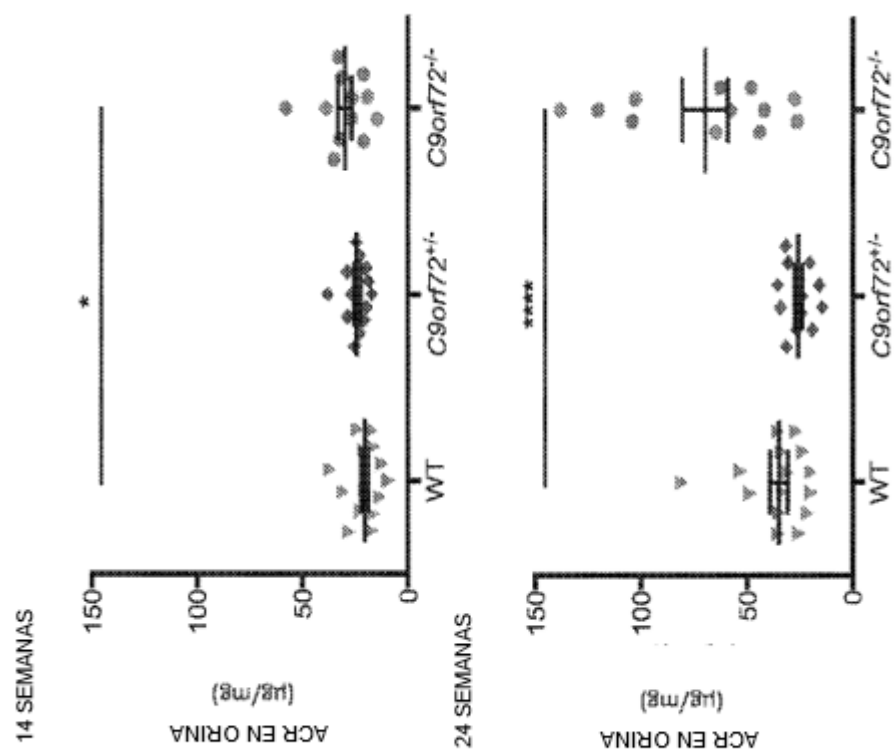


Figura 9C

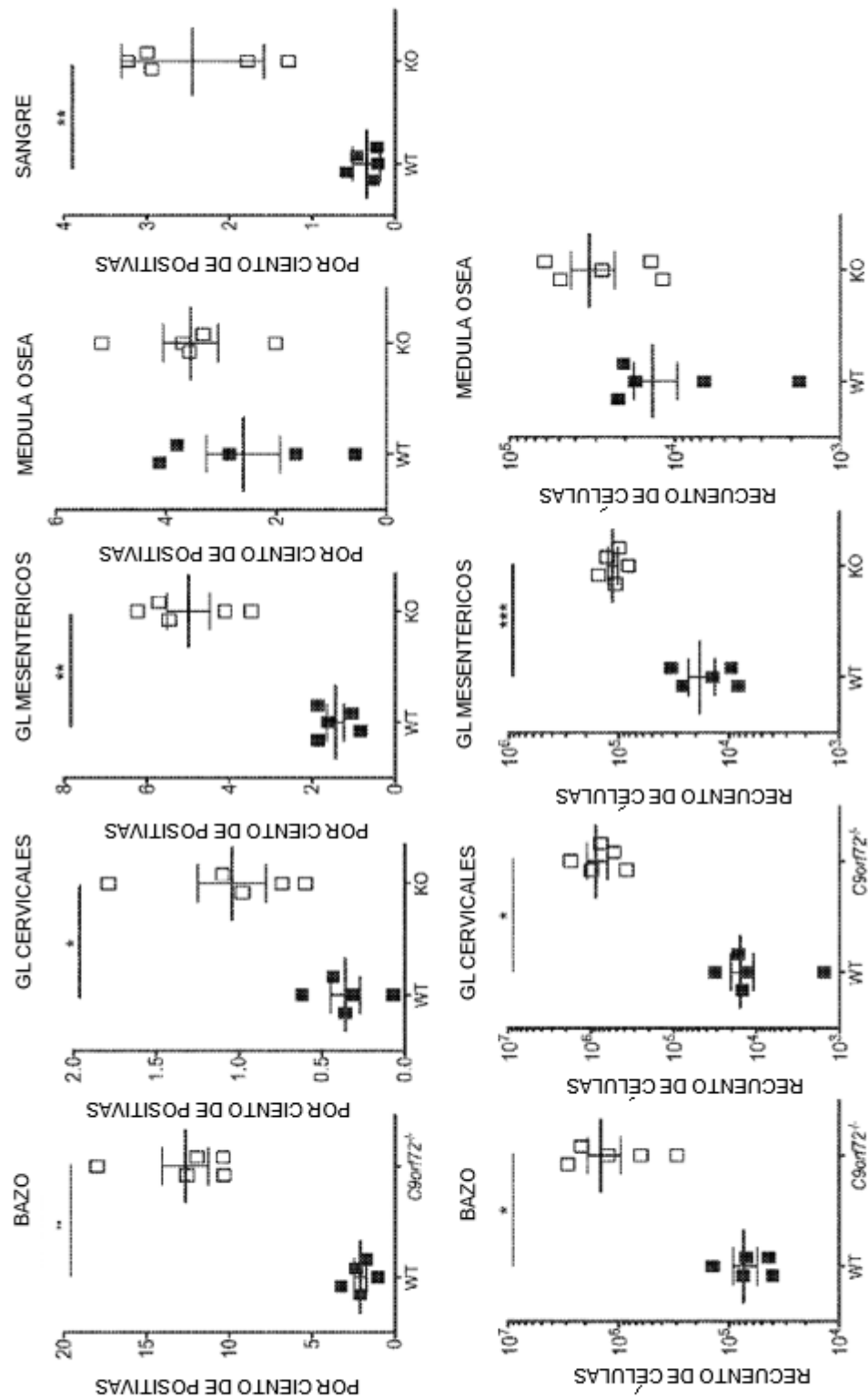


Figura 10