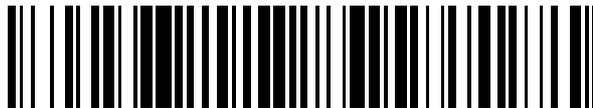


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 448 090**

21 Número de solicitud: 201231296

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

13.08.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

13.03.2014

Fecha de la concesión:

25.03.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

01.04.2015

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (25.0%)**

Serrano, 117

28006 Madrid (Madrid) ES;

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN
RED DE ENFERMEDADES RARAS (CIBERER)**
(25.0%);

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ DE HENARES (25.0%)
y

**FUNDACIÓN CENTRO NACIONAL DE
INVESTIGACIONES ONCOLÓGICAS CARLOS III**
(25.0%)

72 Inventor/es:

ZURITA REDONDO, María Esther;

MONTOLIU JOSÉ, Lluís;

FERNÁNDEZ LÓPEZ, Almudena;

DE LA VILLA POLO, Pedro;

GONZÁLEZ NEIRA, Anna y

BENÍTEZ ORTIZ, Javier

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **Nuevo modelo animal de acromatopsia**

57 Resumen:

La presente invención describe ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI, mutantes para el gen Gnat2, causante del fenotipo alterado de retina coneless, preferentemente una mutación Gnat2^{cpfl3}, y más preferentemente en homocigosis. Así mismo, la presente invención hace referencia al uso de dichos ratones, concretamente su uso como modelo animal para retinopatías, preferentemente acromatopsia y más preferentemente acromatopsia de tipo IV. La presente invención también hace referencia a un método para identificar al menos un ratón albino no consanguíneo HsdWin:NMRI, caracterizado por presentar una mutación en el gen Gnat2, causante del fenotipo alterado de retina coneless, en una colonia de ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI, preferentemente una mutación Gnat2^{cpfl3}, y más preferentemente en homocigosis.

ES 2 448 090 B1

NUEVO MODELO ANIMAL DE ACROMATOPSIA**DESCRIPCIÓN****5 SECTOR DE LA TÉCNICA**

La presente invención se dirige, tanto en los aspectos de producción como de utilización, a los sectores de agricultura, química y farmacia. En especial, la presente invención se dirige a empresas relacionadas con la cría y distribución de animales de experimentación, y a empresas biotecnológicas que usan modelos animales para desarrollar o validar estrategias preclínicas para el tratamiento de retinopatías, como por ejemplo la acromatopsia.

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

15 Esta invención se refiere a una descripción de un nuevo modelo animal de acromatopsia de tipo IV, identificado en ratones de la colonia albina no consanguínea comercial HsdWin:NMRI.

La acromatopsia de tipo IV, como enfermedad rara, está asociada a mutaciones en el gen *Gnat2*, localizado en el cromosoma 3 del genoma del ratón, en las coordenadas: 3:107895707-107904350, (OMIM "*Online Mendelian Inheritance in Man*": <http://omim.org>, OMIM: #139340). Este gen codifica para la subunidad alfa de la proteína transducina, implicada en el proceso de la fototransducción en la retina (Hofmann KP *et al.* 2009).

La acromatopsia es una enfermedad congénita rara (ORPHANET: <http://www.orphanet.org>, ORPHA49382), autosómica y de herencia recesiva, con una baja prevalencia, estimada en 1-9:100000 personas, caracterizada por una reducida agudeza visual, nistagmo, fotofobia, pequeño escotoma central, fijación excéntrica y pérdida total o parcial a la capacidad de discriminación de colores (Kohl S, *et al.* 2010). La mayoría de individuos afectados tienen acromatopsia completa, con una pérdida total de la función de los tres tipos de fotorreceptores (verdes, rojos y azules). Más infrecuentemente existen personas afectadas que tienen acromatopsia incompleta, en la que uno o varios tipos de conos funcionan incorrectamente. En este último caso los síntomas son parecidos a la acromatopsia completa, aunque menos severos. La agudeza visual oscila entre un 10%, o menos, en el caso de acromatopsia completa, y puede llegar al 25% en el caso de acromatopsia incompleta. El diagnóstico puede determinarse genéticamente, mediante fallos o confusión en la percepción de los colores, con ayuda de un sencillo test visual, y mediante electrofisiología, usando ERG, en la que respuesta fotópica (incluida la respuesta flicker a 30 Hz, debida mayoritariamente a fotorreceptores conos) es ausente o está marcadamente reducida.

Se conocen por lo menos cuatro genes cuyas mutaciones causan diferentes tipos de acromatopsia: *CNGA3*, *CNGB3*, *GNAT2* y *PDE6C*. Las mutaciones en el gen *CNGB3* (OMIM: #605080), asociado a acromatopsia de tipo III (OMIM: #262300) suman más del 50% de casos de acromatopsia (Kohl S, *et al.* 2005), un 25% de casos de acromatopsia se deben a mutaciones en el gen *CNGA3* (OMIM: #600053), asociado a acromatopsia de tipo II (OMIM: #216900) (Kohl S, *et al.* 1998), mientras que las mutaciones en el gen *GNAT2* (OMIM: #139340), asociado a acromatopsia de tipo IV (OMIM: #613856) (Aligianis *et al.* 2002) y *PDE6C* (OMIM: #600827), asociado a acromatopsia de tipo V (Thiadens AA, *et al.* 2009) tienen una menor prevalencia (<2%).

Existen documentos de patente relativos a métodos de ajuste cromático para personas con acromatopsia (EP2175414 publicada el 14/04/2010 por Konica Minolta Holdings Inc; WO/2009/020115 publicada el 12/2/2009 por Konica Minolta Holdings Inc) o dispositivos para detectar y corregir acromatopsia en humanos (EP1354550 publicada el 22/10/2003 por Chen Yan Dept. Of Physical EDUC; WO/1999/045424 publicada el 10/9/1999 por Chen, Mou).

La acromatopsia es una condición genética monogénica y localizada, por lo tanto buena candidata para ser tratada mediante terapia génica (Pang JJ, *et al.* 2010). Para ello son necesarios modelos animales de acromatopsia que puedan ser utilizados en el desarrollo y validación de estas aproximaciones terapéuticas. Hasta la fecha se conocen varios ratones mutantes en los genes causantes de acromatopsia: *Cnga3*^{tm1Biel} (MGI "*Mouse Genome Informatics*": <http://www.informatics.jax.org>, MGI:2388388, descrito en Biel M, *et al.* 1999), *Cngb3*^{tm1Dgen} (MGI:4367989, descrito en Ding XQ, *et al.* 2009), ratones de la cepa ALS/LtJ, con la mutación *Gnat2*^{cpfl3} (MGI:3588845, descrito en Chang B, *et al.* 2006) y *Pde6c*^{cpfl1} (MGI:2657247, descrito en Chang B, *et al.* 2002), además de los que están siendo producidos, genéricamente, dentro de la iniciativa IKMC (IKMC: "*International Knockout Mouse Consortium*", <http://www.knockoutmouse.org>).

Algunos de estos modelos animales ya han sido usados con éxito en experimentos preclínicos de terapia génica utilizando vectores virales (por ejemplo: AAV) portadores de la copia correcta del gen a corregir. Se han publicado experimentos de terapia génica, en ratones, para restaurar la función del gen *Gnat2* (Alexander JJ, *et al.* 2007), también para restaurar la función del gen *Cnga3* (Michalakakis S, *et al.* 2010), y para el gen *Cngb3* (Carvalho LS, *et al.* 2011). También para este gen, *Cngb3*, se han reportado experimentos de terapia génica realizados en modelos caninos (Komáromy AM, *et al.* 2010).

El uso universal de multitud de cepas y colonias de ratón en investigación biomédica hace que sea muy importante la caracterización genética de las mismas, con objeto de que los experimentos a realizar a posteriori con ellas puedan interpretarse correctamente. Es importante describir si una determinada cepa de ratón es portadora de mutaciones que puedan interferir en las investigaciones posteriores (Mattapallil MJ, *et al.* 2012).

En la actualidad, se conoce otro modelo animal de acromatopsia de tipo IV con mutaciones en el mismo gen *Gnat2*. Los ratones ALS/Ltj son portadores de la mutación *Gnat2^{cpfl3}*, correspondiente a un único cambio de nucleótido, situado en el exón número 6 del gen, en posición G598A, que está asociado al cambio de residuo de aminoácido Asp200Asn en la proteína *Gnat2* resultante (Chang B, *et al.* 2006). Estos ratones ALS/Ltj manifiestan las alteraciones en la retina características de los pacientes con acromatopsia de tipo IV, sin embargo han tenido un uso muy limitado en investigación biomédica. Una búsqueda de "ALS/Ltj" en la base de datos de publicaciones científicas PubMed aporta solamente tres artículos.

Por otro lado, algunos ratones de la colonia albina no consanguínea comercial HsdWin:NMRI presentan un déficit funcional de fotorreceptores de tipo cono, medido mediante electroretinografía, ERG, alteración que se correlaciona con un número inferior de fotorreceptores de tipo cono analizados mediante histología e inmunohistoquímica (De la Villa P, *et al.* 2007). Los ratones HsdWin:NMRI se utilizan habitualmente en experimentación animal. A diferencia de los ratones de la cepa ALS/Ltj, cuyo uso es muy poco frecuente en biomedicina, los ratones de la colonia comercial (*stock* en inglés) no consanguínea HsdWin:NMRI son de uso muy común y se utilizan como ratones albinos no consanguíneos en multitud de experimentos, en todo el mundo, gracias a su buen comportamiento, excelente capacidad de cría y a que pueden ser obtenidos fácilmente desde diversos distribuidores: Harlan, Charles River, Taconic. Una búsqueda de "NMRI" en la base de datos de publicaciones científicas PubMed aporta más de 2000 artículos.

El haber descubierto que en los ratones HsdWin:NMRI segrega la mutación *Gnat2^{cpfl3}*, hecho desconocido hasta el momento, implica que en cualquier colonia de estos ratones existente actualmente en el mundo habrá, por lo menos, relativo a este locus, dos tipos de ratones NMRI, los que manifiesten el fenotipo de acromatopsia y los que no (además de los portadores de la mutación que, al ser recesiva, no manifestarán alteraciones en su retina). A cualquier persona interesada en utilizar un modelo animal de acromatopsia o en diferenciar, en su colonia de ratones NMRI, los portadores de la mutación en el gen *Gnat2*, le será mucho más sencillo y asequible utilizar estos ratones NMRI que los ratones ALS/LtJ.

Adicionalmente, también se conoce en estos animales HsdWin:NMRI la existencia de individuos que, además de presentar las alteraciones en ERG mencionadas, asociadas a un déficit funcional de conos, fenotipo electroretinográfico denominado "*coneless*", muestran además defectos degenerativos en la retina (presencia de vacuolas/drusas), similares a los que aparecen asociados a muchas otras retinopatías, como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) (Zurita E, *et al.* 2010).

Las alteraciones del fenotipo "*coneless*" (alteraciones en la retina y en el ERG de los conos) identificadas en los ratones HsdWin:NMRI son características de un elevado número de distintas retinopatías, como por ejemplo: la acromatopsia, la retinitis pigmentosa (la cual presenta más de 100 genes distintos asociados), la vitroretinocoroidiopatía, el síndrome del cono-S aumentado (síndrome de Goldmann-Favre), las retinopatías asociadas a diabetes Amaurosis congénita de Leber (tipos LCA1, LCA2, LCA3, LCA4, etc.), los distintos tipos de la enfermedad de Stargardt, la distrofia de conos-bastones de distintos tipo (tipo 9, tipo 2, tipo 3, etc.), el síndrome de Alstrom, el síndrome de Mainzer-Saldino, BCM, el monocratismo de conos azules, la distrofia de conos de tipo 5, el síndrome de Bardet-Biedl, la ataxia espinocerebral de tipo 7, la distrofia retinal de conos (tipos 1, 2, 3, etc.), la enfermedad de Danon, la distrofia macular de retina (tipo 1, 2, 3, etc.), etc.

La gran cantidad de alteraciones que pueden causar retinopatías y alteraciones ERG de conos hace prácticamente imposible asociar el fenotipo "*coneless*" de los ratones HsdWin:NMRI con una retinopatía concreta. Es más, existen publicaciones en las que se usan ratones HsdWin:NMRI para contabilizar fotorreceptores y, específicamente, se describe que no hay variaciones en el número de conos (Jeffery *et al.* 1997), contradiciendo los anteriores datos. Y, más recientemente, también se han empleado ratones HsdWin:NMRI para discriminar diferencias en el número de fotorreceptores (Lavado *et al.* 2006). Estas divulgaciones contradicen los resultados obtenidos en Zurita E, *et al.* 2010, por lo que no queda claro si los ratones HsdWin:NMRI presentan dicha deficiencia de conos.

En Lavado *et al.* 2006 se muestran resultados del test optocinético con ratones HsdWin:NMRI. Este test requiere de la actividad funcional de los conos, por lo que al llevarse a cabo dicho test se pone de nuevo en entredicho si los ratones HsdWin:NMRI presentan un número deficiente de conos.

Más aún, existen ensayos donde se emplean ratones HsdWin:NMRI como animales "*control*", en comparación con otros modelos animales que manifiestan distrofias retinales, por lo que los ratones HsdWin:NMRI son

considerados como animales carentes de distrofias retinales (Varela et al. 2003).

Por todo esto, no queda claro si dichos ratones HsdWin:NMRI son susceptibles de ser empleados como modelos animales para retinopatías

5

Otra complicación adicional en el análisis de las alteraciones de la retina en ratones HsdWin:NMRI, es que cuando se adquieren ratones comerciales HsdWin:NMRI (por ejemplo a la casa comercial Harlan), no todos los individuos presentan el citado fenotipo “*coneless*”. Solamente algunos individuos de la colonia lo manifiestan, por lo que dicho análisis implica estudiar un gran número de individuos. De otra manera, las variaciones experimentales que se obtendrían hubieran sido comúnmente interpretadas como variaciones interindividuales características de cualquier cepa no consanguínea (*outbred*) en la que sus *loci* se encuentran mayoritariamente (pero no exclusivamente) en heterocigosis en dicha población.

10

Por tanto, para determinar si los ratones HsdWin:NMRI son susceptibles de ser empleados como modelos animales para retinopatías, actualmente es necesario llevar a cabo una concatenación de experimentos genómicos complejos (como por ejemplo experimentos de ligamiento genético y de secuenciación de exomas) para identificar y constatar el tipo de mutación responsable de dicho fenotipo “*coneless*”.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

20

La presente invención describe el uso de ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI, mutantes para el gen *Gnat2*, como modelo animal para retinopatías, preferentemente acromatopsia y más preferentemente acromatopsia de tipo IV. La presente invención permite obtener dos sub-colonias a partir de los ratones HsdWin:NMRI, en función de si son o no portadoras de dicha mutación.

25

En la presente invención, a través de experimentos genómicos complejos, se ha localizado una región del cromosoma 3 de los ratones HsdWin:NMRI, susceptible de comprender la mutación responsable del fenotipo “*coneless*”. Dicha región comprende hasta 200 genes como posibles candidatos, de los cuales se ha localizado el locus *Gnat2*, con la mutación *cpf13*, que había sido identificada previamente en una cepa distinta de ratones y de uso muy limitado en investigación biomédica (ratones ALS/Ltj portadores de la mutación *Gnat2^{cpf13}*) (Chang B, et al. 2006).

30

En concreto, mediante experimentos de electrofisiología se detectaron individuos de la colonia de ratones HsdWin:NMRI que mostraban una respuesta ERG alterada, con ausencia de respuesta fotópica, lo cual sugería algún tipo de alteración funcional en los fotorreceptores conos de la retina de estos ratones.

35

Estas observaciones iniciales se confirmaron mediante histología e inmunohistoquímica, marcando los segmentos externos de los conos de la retina mediante una lectina específica unida a un fluorocromo (lectina-PNA-Alexa Fluor 488), y corroborando su menor número en individuos que mostraban un ERG alterado. Adicionalmente, mediante análisis de la ultraestructura celular de la retina de estos animales realizado con ayuda del microscopio electrónico, se pudo comprobar la presencia de alteraciones celulares en la capa de células del epitelio pigmentado de la retina y de los fotorreceptores, muy parecidas a las características de varias retinopatías, como la DMAE o la acromatopsia, entre muchas otras como: la retinitis pigmentosa (la cual presenta más de 100 genes distintos asociados), la vitroretinocoroidiopatía, el síndrome del cono-S aumentado (síndrome de Goldmann-Favre), las retinopatías asociadas a diabetes Amaurosis congénita de Leber (tipos LCA1, LCA2, LCA3, LCA4, etc.), los distintos tipos de la enfermedad de Stargardt, la distrofia de conos-bastones de distintos tipo (tipo 9, tipo 2, tipo 3, etc.), el síndrome de Alstrom, el síndrome de Mainzer-Saldino, BCM, el monocratismo de conos azules, la distrofia de conos de tipo 5, el síndrome de Bardet-Biedl, la ataxia espinocerebral de tipo 7, la distrofia retinal de conos (tipos 1, 2, 3, etc.), la enfermedad de Danon, la distrofia macular de retina (tipo 1, 2, 3, etc.), etc.

40

45

50

Se decidió clonar el gen responsable de este fenotipo alterado de retina y se inició una aproximación clásica, genética, usando un centenar de ratones HsdWin:NMRI, con individuos de tres generaciones provenientes de diversos pedigríes, y, tras ser fenotipados en relación a si presentaban, o no, la alteración ERG de conos en la retina, se analizó la co-segregación de marcadores genéticos dispersos por todo el genoma de ratón (SNPs). Este experimento de ligamiento genético sirvió para determinar que la mutación correspondía a un locus/gen único (monogénica), no ligada al sexo (situada en un cromosoma autosómico) y de herencia recesiva. Y también permitió acotar la región portadora de la mutación responsable del fenotipo *coneless* a una zona determinada del cromosoma 3 del genoma de ratón, utilizando el panel comercial MD de SNPs (Illumina), delimitada por dos marcadores específicos. La región delimitada del cromosoma 3 incluía varios centenares de genes, muchos de ellos con expresión en retina, por lo que se optó por una estrategia más compleja, de secuenciación masiva NGS (*next generation sequencing*) y se abordó la secuenciación completa de varios exomas representativos de ratones HsdWin:NMRI que incluía individuos de tres tipos: mutantes para la alteración ERG (en homocigosis), portadores de la misma (heterocigotos para la mutación) o silvestres para la mutación. Mediante análisis bioinformáticos posteriores se descubrió que los ratones mutantes HsdWin:NMRI con alteración ERG de conos

55

60

65

en la retina eran portadores de una mutación en el gen *Gnat2*, asociado a una retinopatía, preferentemente acromatopsia y más preferentemente acromatopsia de tipo IV.

5 La misma mutación ya ha sido descrita anteriormente en otra cepa de ratón ALS/LtJ (Chang et al. 2006). Sin embargo, su presencia en los ratones HsdWin:NMRI se desconocía. Los ratones HsdWin:NMRI se utilizan ampliamente en Biomedicina como modelo de experimentación animal (a fecha 6/6/2012 es posible localizar 1962 referencias bibliográficas, a través de PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>, que reportan el uso de ratones HsdWin:NMRI) muchas más que las que utilizan ratones ALS/LtJ (3 citas en PubMed). Así pues, la presente invención hace referencia al uso de ratones HsdWin:NMRI como modelo animal de una retinopatía, preferentemente acromatopsia y más preferentemente acromatopsia de tipo IV. Y a su vez, la presente invención alerta de la presencia de esta mutación, que altera la funcionalidad de la retina, a cualquier investigador interesado en utilizar ratones HsdWin:NMRI para experimentos en los que se requiera función visual.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

15 La presente invención hace referencia a un ratón albino no consanguíneo HsdWin:NMRI, caracterizado por presentar una mutación en el gen *Gnat2* causante del fenotipo electroretinográfico (ERG) de conos alterado de retina *coneless*. Preferentemente dicho ratón se caracteriza por presentar una mutación *Gnat2^{cpfl3}*. Más preferentemente, dicho ratón se caracteriza por presentar una mutación *Gnat2^{cpfl3}* en homocigosis.

20 La presente invención hace referencia al uso del ratón descrito anteriormente descrito, como modelo animal de una retinopatía. Preferentemente, la retinopatía es acromatopsia. Más preferentemente, la acromatopsia es de tipo IV.

25 La presente invención hace referencia al uso del ratón descrito anteriormente descrito, para el tratamiento y/o prevención de anomalías y/o déficits visuales asociados a una retinopatía. Preferentemente, la retinopatía es acromatopsia. Más preferentemente, la acromatopsia es de tipo IV.

30 La presente invención hace referencia al uso del ratón descrito anteriormente descrito, para terapia génica.

La presente invención hace referencia al uso del ratón descrito anteriormente descrito, para validar protocolos de terapia experimental, génica o no, para tratamiento y/o prevención de los síntomas clínicos asociados a la acromatopsia de tipo IV.

35 La presente invención hace referencia al uso del ratón descrito anteriormente descrito, para estudios de la retina o del sistema visual.

40 La presente invención hace referencia a un método mediante PCR, como el descrito en Chang et al. 2006, para identificar al menos un ratón albino no consanguíneo HsdWin:NMRI, caracterizado por presentar una mutación en el gen *Gnat2*, causante del fenotipo electroretinográfico (ERG) de conos alterado de retina *coneless*, en una colonia de ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI. Preferentemente, se identifica al menos un ratón que presenta una mutación *Gnat2^{cpfl3}*. Más preferentemente, se identifica al menos un ratón que presenta una mutación *Gnat2^{cpfl3}* en homocigosis o alternativamente se identifica al menos un ratón que presenta una mutación *Gnat2^{cpfl3}* en heterocigosis.

45 Se realizaron experimentos de fenotipación visual en los que se valoró la respuesta electroretinográfica (ERG) de ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI, los resultados mostraron que al menos en un 40% de sus individuos presentaban registros electroretinográficos alterados, relativos a la respuesta de los fotorreceptores conos a un flash de luz y a estímulos repetidos (*flicker*, a 20 Hz) obtenidos en condiciones fotópicas. En todos estos casos se observó una disminución importante o ausencia de señal eléctrica, indicativa de funcionamiento anómalo de los conos. Los contajes de conos realizados utilizando procedimientos de inmunohistoquímica, sobre preparaciones de neuroretina entera de ratón, corroboraron que los individuos con una respuesta ERG anómala de conos contenían menos conos en su retina. Adicionalmente, observaciones de la estructura celular de la retina en ratones HsdWin:NMRI, realizadas con microscopía óptica o microscopía electrónica permitían constatar la existencia de desorganización de los segmentos externos de los fotorreceptores, aumento de la presencia de vacuolas de aspecto vacío o con material detritico, en el epitelio pigmentado de la retina, en individuos con ERG alterada, parámetros que no aparecían en los ratones con ERG normal. Al fenotipo alterado de retina en ratones HsdWin:NMRI se le denomina fenotipo "*coneless*".

60 Con objeto de identificar la mutación y el gen responsables de este fenotipo de retina alterada en ratones HsdWin:NMRI se utilizó un panel MD de Illumina con 1449 polimorfismos genéticos (SNPs) aplicado sobre casi un centenar de muestras de ADN provenientes de otros tantos ratones fenotipados y agrupados en nueve pedigrís, parcialmente independientes, con individuos de hasta tres generaciones. Con todo ello se logró acotar la región del genoma portadora de la mutación en un segmento del cromosoma 3 murino, delimitado por los marcadores SNP denominados rs13477309 y rs13477448, que describían una región de 34,34 Mb, localizada

(Ensembl, release 66) entre las siguientes coordenadas del genoma del ratón: 3:105,273,322-139,617,214. Esta región del genoma de ratón contiene más de 300 genes de los que aproximadamente 200 se expresan en retina. Por ello, la caracterización posterior de la mutación se abordó mediante la obtención de exomas a partir de ratones representativos de los genotipos mutantes, portadores y silvestres. Los kits de captura de exomas que se utilizaron fueron *Agilent SureSelect Mouse All Exon* (50Mb, 50x).

El análisis bioinformático posterior determinó que, de las 97 variaciones genéticas de un solo nucleótido (SNVs) presentes en la región delimitada con un patrón similar al esperado (mutaciones en homocigosis en los individuos mutantes, en heterocigosis en individuos portadores y equivalentes a la secuencia de referencia en individuos silvestres), 55 eran variantes conocidas (asociados a polimorfismos SNPs conocidos, denotados como rsXXXXXXXX) y 42 eran variantes nuevas, previamente no descritas (denotadas como snpXXXXX). De las 97 SNVs, 10 correspondían a mutaciones sin sentido (esto es, asociadas a cambios de aminoácidos en la proteína resultante) en regiones codificantes de 8 genes (*Ovgp1* [MGI:10661], *Slc16a4* [MGI:2385183], *Eps8l3* [MGI:2139743], *Gstm2* [MGI:95861], *Gnat2* [MGI:95779], *Celsr2* [MGI:1858235], *Rwdd3* [MGI:1920420] y *Cenpe* [MGI:1098230]) (Tabla 1). Esta tabla contiene la lista de las 97 variaciones genéticas de un solo nucleótido (SNVs) encontradas frente al genoma de referencia, que aparecen en homocigosis en los ratones mutantes y en heterocigosis en los ratones portadores, siguiendo pues el patrón esperado. De todas ellas, las más relevantes son las que están asociadas a cambios significativos en la zona codificante de los genes, las mutaciones denominadas sin sentido, puesto que están asociadas a cambios de aminoácidos en la proteína resultante, la cual puede conducir al acúmulo de proteínas mutantes, carentes de función.

Tabla 1. Análisis de las variaciones genéticas de un solo nucleótido (SNVs) detectadas en la región delimitada. Listado de las 97 variaciones genéticas de un solo nucleótido (SNVs) identificadas en la región delimitada del cromosoma 3 cuyo comportamiento sigue el esquema esperado (mutaciones en homocigosis en los individuos mutantes, en heterocigosis en individuos portadores y equivalentes a la secuencia de referencia en individuos silvestres). De las 97 variaciones genéticas de un solo nucleótido (SNVs), 10 corresponden a mutaciones sin sentido (esto es, asociadas a cambios de aminoácidos en la proteína resultante) en regiones codificantes de 8 genes (*Ovgp1*, *Slc16a4*, *Eps8l3*, *Gstm2*, *Gnat2*, *Celsr2*, *Rwdd3* y *Cenpe*). Se han resaltado en negrita las 10 posiciones. La primera columna contiene la coordenada de la mutación/polimorfismo en el cromosoma 3 del genoma de ratón. La segunda columna contiene información sobre el tipo de mutación/polimorfismo. Este listado se ha obtenido con el programa IGV 2.1 (Robinson JT, et al. 2011).

Coordenada en Cromosoma 3	Identificación del polimorfismo/mutación, y tipo de polimorfismo/mutación
105467819	ID=snp17763; estado=nuevo; ref=G; alelos=A/G; apoyo=6/4; Tipo de mutación=Heterocigota; nombre=Kcnd3; identificación del transcrito=CCDS17708.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón; nombre=Kcnd3; identificación del transcrito=CCDS17709.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
105731614	ID=snp17088; estado=nuevo; ref=G; alelos=G/A; apoyo=36/33; Tipo de mutación=Heterocigota; nombre=l830077J02Rik; identificación del transcrito=CCDS17713.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
105789429	ID=snp17478; estado=nuevo; ref=G; alelos=T/T; apoyo=156; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Ovvp1; identificación del transcrito=CCDS17716.1; mRNAaCrom='+'; número de codón=533; cambio de codón='GGG=>GGT'; Cambio de residuo de aminoácido='G=>G'; función=codificante-sinónima;
105789485	ID=snp17056; estado=nuevo; ref=T; alelos=T/C; apoyo=36/21; Tipo de mutación=Heterocigota; nombre= Ovvp1 ; identificación del transcrito=CCDS17716.1; mRNAaCrom='+'; número de codón=552; cambio de codón='ATC=>ACC'; Cambio de residuo de aminoácido='I=>T'; función=cambio de aminoácido;
106078716	ID=snp17715; estado=nuevo; ref=C; alelos=C/T; apoyo=43/19; Tipo de mutación=Heterocigota; función=intergénica;
106083045	ID=snp17242; estado=nuevo; ref=A; alelos=A/G; apoyo=183/12; Tipo de mutación=Heterocigota; función=intergénica;
106101572	ID=snp17387; estado=nuevo; ref=T; alelos=T/G; apoyo=46/19; Tipo de mutación=Heterocigota; función=intergénica;
106101811	ID=snp17523; estado=nuevo; ref=G; alelos=G/C; apoyo=83/14; Tipo de mutación=Heterocigota; función=intergénica;
107018693	ID=rs30081184; estado=conocido; ref=C; alelos=G/G; apoyo=12; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Cym; identificación del transcrito=CCDS51041.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
107040081	ID=snp17815; estado=nuevo; ref=A; alelos=G/G; apoyo=20; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Prok1; identificación del transcrito=CCDS38589.1; mRNAaCrom='-'; número de codón=41; cambio de codón='AGT=>AGC'; Cambio de residuo de aminoácido='S=>S'; función=codificante-sinónima;

ES 2 448 090 B1

107042372	ID=snp18184; estado=nuevo; ref=T; alelos=C/C; apoyo=12; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Prok1; identificación del transcrito=CCDS38589.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
107042517	ID=snp17636; estado=nuevo; ref=G; alelos=A/A; apoyo=34; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Prok1; identificación del transcrito=CCDS38589.1; mRNAaCrom='-'; número de codón=17; cambio de codón='TCC=>TCT'; Cambio de residuo de aminoácido='S=>S'; función=codificante-sinónima;
107042583	ID=snp17383; estado=nuevo; ref=C; alelos=T/T; apoyo=15; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Prok1; identificación del transcrito=NM_001044382; mRNAaCrom='-'; función=5-UTR;
107084793	ID=snp16893; estado=nuevo; ref=T; alelos=C/C; apoyo=19; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Hbxip; identificación del transcrito=CCDS51042.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
107084843	ID=rs33758220; estado=conocido; ref=G; alelos=C/C; apoyo=25; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Hbxip; identificación del transcrito=CCDS51042.1; mRNAaCrom='+'; número de codón=92; cambio de codón='TCG=>TCC'; Cambio de residuo de aminoácido='S=>S'; función=codificante-sinónima;
107084888	ID=snp18094; estado=nuevo; ref=T; alelos=C/C; apoyo=28; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Hbxip; identificación del transcrito=CCDS51042.1; mRNAaCrom='+'; número de codón=107; cambio de codón='GCT=>GCC'; Cambio de residuo de aminoácido='A=>A'; función=codificante-sinónima;
107085035	ID=rs33759076; estado=conocido; ref=C; alelos=T/T; apoyo=10; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Hbxip; identificación del transcrito=CCDS51042.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
107086506	ID=rs33760849; estado=conocido; ref=A; alelos=T/T; apoyo=28; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Hbxip; identificación del transcrito=CCDS51042.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
107086623	ID=rs33761735; estado=conocido; ref=T; alelos=C/C; apoyo=34; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Hbxip; identificación del transcrito=NM_026774; mRNAaCrom='+'; función=3-UTR;
107095429	ID=snp17769; estado=nuevo; ref=C; alelos=T/T; apoyo=75; Tipo de mutación=Homocigota; nombre= Slc16a4 ; identificación del transcrito=CCDS17736.1; mRNAaCrom='+'; número de codón=25; cambio de codón='CTT=>TTT'; Cambio de residuo de aminoácido='L=>F'; función=cambio de aminoácido;
107095556	ID=snp17696; estado=nuevo; ref=C; alelos=T/T; apoyo=8; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Slc16a4; identificación del transcrito=CCDS17736.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
107100868	ID=rs33758778; estado=conocido; ref=T; alelos=C/C; apoyo=33; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Slc16a4; identificación del transcrito=CCDS17736.1; mRNAaCrom='+'; número de codón=31; cambio de codón='AAT=>AAC'; Cambio de residuo de aminoácido='N=>N'; función=codificante-sinónima;
107101006	ID=rs33758781; estado=conocido; ref=G; alelos=A/A; apoyo=29; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Slc16a4; identificación del transcrito=CCDS17736.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
107101647	ID=snp18125; estado=nuevo; ref=C; alelos=T/T; apoyo=22; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Slc16a4; identificación del transcrito=CCDS17736.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
107101674	ID=rs33759563; estado=conocido; ref=G; alelos=A/A; apoyo=34; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Slc16a4; identificación del transcrito=CCDS17736.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
107101750	ID=snp18007; estado=nuevo; ref=G; alelos=T/T; apoyo=53; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Slc16a4; identificación del transcrito=CCDS17736.1; mRNAaCrom='+'; función=spliceSite;
107101780	ID=rs33760369; estado=conocido; ref=G; alelos=A/A; apoyo=49; Tipo de mutación=Homocigota; nombre= Slc16a4 ; identificación del transcrito=CCDS17736.1; mRNAaCrom='+'; número de codón=83; cambio de codón='GTA=>ATA'; Cambio de residuo de aminoácido='V=>I'; función=cambio de aminoácido;
107102198	ID=snp18041; estado=nuevo; ref=A; alelos=G/G; apoyo=28; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Slc16a4; identificación del transcrito=CCDS17736.1; mRNAaCrom='+'; número de codón=175; cambio de codón='ACA=>ACG'; Cambio de residuo de aminoácido='T=>T'; función=codificante-sinónima;
107103789	ID=rs33762803; estado=conocido; ref=G; alelos=T/T; apoyo=65; Tipo de mutación=Homocigota; nombre= Slc16a4 ; identificación del transcrito=CCDS17736.1; mRNAaCrom='+'; número de codón=232; cambio de codón='AAG=>AAT'; Cambio de

ES 2 448 090 B1

	residuo de aminoácido='K=>N'; función=cambio de aminoácido;
107104154	ID=snp17521; estado=nuevo; ref=T; alelos=G/G; apoyo=10; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Slc16a4; identificación del transcrito=CCDS17736.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
107106210	ID=snp17839; estado=nuevo; ref=A; alelos=G/G; apoyo=9; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Slc16a4; identificación del transcrito=CCDS17736.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
107106215	ID=snp16895; estado=nuevo; ref=T; alelos=C/C; apoyo=8; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Slc16a4; identificación del transcrito=CCDS17736.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
107107232	ID=snp16923; estado=nuevo; ref=C; alelos=G/G; apoyo=11; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Slc16a4; identificación del transcrito=CCDS17736.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
107107299	ID=rs33760649; estado=conocido; ref=C; alelos=T/T; apoyo=91; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Slc16a4; identificación del transcrito=CCDS17736.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
107407100	ID=snp18064; estado=nuevo; ref=G; alelos=A/A; apoyo=14; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Alx3; identificación del transcrito=CCDS17739.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
107417523	ID=rs33780503; estado=conocido; ref=C; alelos=T/T; apoyo=171; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Fam40a; identificación del transcrito=CCDS51043.1; mRNAaCrom='-'; número de codón=752; cambio de codón='GCG=>GCA'; Cambio de residuo de aminoácido='A=>A'; función=codificante-sinónima;
107421351	ID=rs33784745; estado=conocido; ref=C; alelos=T/T; apoyo=17; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Fam40a; identificación del transcrito=CCDS51043.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
107468531	ID=rs13470813; estado=conocido; ref=A; alelos=G/G; apoyo=45; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Ahcyl1; identificación del transcrito=CCDS38593.1; mRNAaCrom='-'; número de codón=497; cambio de codón='TTA=>CTA'; Cambio de residuo de aminoácido='L=>L'; función=codificante-sinónima;
107470973	ID=rs33781058; estado=conocido; ref=G; alelos=C/C; apoyo=26; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Ahcyl1; identificación del transcrito=CCDS38593.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
107471297	ID=rs33781827; estado=conocido; ref=A; alelos=G/G; apoyo=39; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Ahcyl1; identificación del transcrito=CCDS38593.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
107471774	ID=rs33782596; estado=conocido; ref=A; alelos=G/G; apoyo=8; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Ahcyl1; identificación del transcrito=CCDS38593.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
107476461	ID=rs33782721; estado=conocido; ref=G; alelos=A/A; apoyo=159; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Ahcyl1; identificación del transcrito=CCDS38593.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
107476804	ID=snp17031; estado=nuevo; ref=G; alelos=A/A; apoyo=31; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Ahcyl1; identificación del transcrito=CCDS38593.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
107476818	ID=snp18004; estado=nuevo; ref=C; alelos=T/T; apoyo=37; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Ahcyl1; identificación del transcrito=CCDS38593.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
107476870	ID=snp17975; estado=nuevo; ref=G; alelos=A/A; apoyo=79; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Ahcyl1; identificación del transcrito=CCDS38593.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
107476876	ID=snp17006; estado=nuevo; ref=T; alelos=C/C; apoyo=85; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Ahcyl1; identificación del transcrito=CCDS38593.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
107550122	ID=rs33788295; estado=conocido; ref=C; alelos=A/A; apoyo=37; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Csf1; identificación del transcrito=CCDS17740.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón; nombre=Csf1; identificación del transcrito=CCDS51044.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
107684046	ID=snp17067; estado=nuevo; ref=G; alelos=A/A; apoyo=47; Tipo de mutación=Homocigota; nombre= Eps8I3 ; identificación del transcrito=CCDS38594.1; mRNAaCrom='+'; número de codón=44; cambio de codón='GTC=>ATC'; Cambio de residuo de aminoácido='V=>I'; función=cambio de aminoácido;
107695394	ID=rs29589980; estado=conocido; ref=C; alelos=A/A; apoyo=60; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Eps8I3; identificación del transcrito=CCDS38594.1;

ES 2 448 090 B1

	mRNAaCrom='+'; función=intrón;
107785020	ID=snp17963; estado=nuevo; ref=G; alelos=A/A; apoyo=17; Tipo de mutación=Homocigota; nombre= Gstm2 ; identificación del transcrito=CCDS17746.1; mRNAaCrom='-'; número de codón=202; cambio de codón='CGC=>TGC'; Cambio de residuo de aminoácido='R=>C'; función=cambio de aminoácido;
107819538	ID=snp18133; estado=nuevo; ref=G; alelos=T/T; apoyo=39; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Gstm1; identificación del transcrito=CCDS17747.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
107901236	ID=snp17481; estado=nuevo; ref=G; alelos=A/A; apoyo=39; Tipo de mutación=Homocigota; nombre= Gnat2 ; identificación del transcrito=CCDS17750.1; mRNAaCrom='+'; número de codón=200; cambio de codón='GAT=>AAT'; Cambio de residuo de aminoácido='D=>N'; función=cambio de aminoácido;
108112921	ID=snp18022; estado=nuevo; ref=C; alelos=T/T; apoyo=12; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Sort1; identificación del transcrito=CCDS17756.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
108113152	ID=rs29602502; estado=conocido; ref=G; alelos=A/A; apoyo=48; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Sort1; identificación del transcrito=CCDS17756.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
108113199	ID=rs29603465; estado=conocido; ref=A; alelos=G/G; apoyo=25; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Sort1; identificación del transcrito=CCDS17756.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
108128871	ID=rs29607496; estado=conocido; ref=A; alelos=G/G; apoyo=16; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Sort1; identificación del transcrito=CCDS17756.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
108134962	ID=snp17033; estado=nuevo; ref=C; alelos=T/T; apoyo=44; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Sort1; identificación del transcrito=CCDS17756.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
108148759	ID=rs29604124; estado=conocido; ref=T; alelos=C/C; apoyo=48; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Sort1; identificación del transcrito=CCDS17756.1; mRNAaCrom='+'; número de codón=532; cambio de codón='ATT=>ATC'; Cambio de residuo de aminoácido='I=>I'; función=codificante-sinónima;
108178526	ID=snp17184; estado=nuevo; ref=G; alelos=A/A; apoyo=31; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Mybphl; identificación del transcrito=CCDS17757.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
108178721	ID=snp18049; estado=nuevo; ref=A; alelos=G/G; apoyo=14; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Mybphl; identificación del transcrito=CCDS17757.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
108196395	ID=rs29605696; estado=conocido; ref=A; alelos=G/G; apoyo=139; Tipo de mutación=Homocigota; nombre= Celsr2 ; identificación del transcrito=CCDS17759.1; mRNAaCrom='-'; número de codón=2787; cambio de codón='CTG=>CCG'; Cambio de residuo de aminoácido='L=>P'; función=cambio de aminoácido;
108206319	ID=snp17190; estado=nuevo; ref=G; alelos=A/A; apoyo=11; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Celsr2; identificación del transcrito=CCDS17759.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
108215494	ID=rs29609217; estado=conocido; ref=T; alelos=G/G; apoyo=30; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Celsr2; identificación del transcrito=CCDS17759.1; mRNAaCrom='-'; número de codón=973; cambio de codón='ATA=>ATC'; Cambio de residuo de aminoácido='I=>I'; función=codificante-sinónima;
108231352	ID=rs29636905; estado=conocido; ref=G; alelos=A/A; apoyo=20; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Sars; identificación del transcrito=CCDS17760.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
108248202	ID=snp18220; estado=nuevo; ref=A; alelos=G/G; apoyo=9; Tipo de mutación=Homocigota; función=intergénica;
108274171	ID=rs29638587; estado=conocido; ref=C; alelos=T/T; apoyo=20; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=5330417C22Rik; identificación del transcrito=CCDS17761.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
108275613	ID=rs29642177; estado=conocido; ref=A; alelos=G/G; apoyo=16; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=5330417C22Rik; identificación del transcrito=CCDS17761.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
108275642	ID=rs29642180; estado=conocido; ref=C; alelos=G/G; apoyo=24; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=5330417C22Rik; identificación del transcrito=CCDS17761.1; mRNAaCrom='-'; número de codón=304; cambio de codón='TCG=>TCC'; Cambio de residuo de aminoácido='S=>S'; función=codificante-sinónima;

ES 2 448 090 B1

108275699	ID=rs29643052; estado=conocido; ref=G; alelos=A/A; apoyo=28; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=5330417C22Rik; identificación del transcrito=CCDS17761.1; mRNAaCrom='-'; número de codón=285; cambio de codón='TTC=>TTT'; Cambio de residuo de aminoácido='F=>F'; función=codificante-sinónima;
108283765	ID=rs29643172; estado=conocido; ref=C; alelos=A/A; apoyo=14; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=5330417C22Rik; identificación del transcrito=CCDS17761.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
108291705	ID=snp17199; estado=nuevo; ref=G; alelos=A/A; apoyo=19; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=5330417C22Rik; identificación del transcrito=CCDS17761.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
108295064	ID=rs29645508; estado=conocido; ref=C; alelos=T/T; apoyo=18; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=5330417C22Rik; identificación del transcrito=NM_001033304; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
108795770	ID=snp17582; estado=nuevo; ref=T; alelos=C/C; apoyo=22; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Fam102b; identificación del transcrito=CCDS51051.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
112956286	ID=snp17000; estado=nuevo; ref=G; alelos=A/A; apoyo=14; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Amy2b; identificación del transcrito=NM_001190403; mRNAaCrom='-'; función=intrón; nombre=Amy2b; identificación del transcrito=NM_001190404; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
113797688	ID=rs52303614; estado=conocido; ref=G; alelos=T/T; apoyo=8; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Col11a1; identificación del transcrito=CCDS17778.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
113815490	ID=rs37394251; estado=conocido; ref=G; alelos=A/A; apoyo=9; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Col11a1; identificación del transcrito=CCDS17778.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
115819209	ID=rs48509152; estado=conocido; ref=A; alelos=G/G; apoyo=9; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Vcam1; identificación del transcrito=CCDS17785.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
116295576	ID=rs30904387; estado=conocido; ref=C; alelos=T/T; apoyo=10; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Ccdc76; identificación del transcrito=CCDS38612.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
116308452	ID=rs30458354; estado=conocido; ref=A; alelos=G/G; apoyo=8; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Sass6; identificación del transcrito=CCDS17789.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
116491388	ID=rs51800716; estado=conocido; ref=A; alelos=C/C; apoyo=12; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Agl; identificación del transcrito=CCDS38613.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
116491395	ID=rs49254062; estado=conocido; ref=T; alelos=G/G; apoyo=12; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Agl; identificación del transcrito=CCDS38613.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
116491402	ID=rs47064350; estado=conocido; ref=T; alelos=C/C; apoyo=11; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Agl; identificación del transcrito=CCDS38613.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
120874590	ID=rs31263694; estado=conocido; ref=A; alelos=G/G; apoyo=9; Tipo de mutación=Homocigota; nombre= Rwdd3 ; identificación del transcrito=CCDS17798.1; mRNAaCrom='-'; número de codón=2; cambio de codón='GTG=>GCG'; Cambio de residuo de aminoácido='V=>A'; función=cambio de aminoácido;
121158050	ID=rs48754017; estado=conocido; ref=G; alelos=A/A; apoyo=8; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Cnn3; identificación del transcrito=CCDS17802.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
121866875	ID=rs37306060; estado=conocido; ref=G; alelos=A/A; apoyo=19; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Abca4; identificación del transcrito=CCDS38617.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
129514764	ID=rs46852139; estado=conocido; ref=G; alelos=A/A; apoyo=10; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Rrh; identificación del transcrito=CCDS38633.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
129561581	ID=rs48850901; estado=conocido; ref=C; alelos=T/T; apoyo=9; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Cfi; identificación del transcrito=CCDS17835.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
129714859	ID=rs30315905; estado=conocido; ref=A; alelos=C/C; apoyo=9; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Sec24b; identificación del transcrito=CCDS17840.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;

130220685	ID=rs3672484; estado=conocido; ref=T; alelos=C/C; apoyo=8; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Col25a1; identificación del transcrito=CCDS38636.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón; nombre=Col25a1; identificación del transcrito=CCDS38637.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
130298202	ID=rs36297072; estado=conocido; ref=G; alelos=C/C; apoyo=11; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Col25a1; identificación del transcrito=CCDS38636.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
130399427	ID=rs48034183; estado=conocido; ref=C; alelos=T/T; apoyo=11; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Ostc; identificación del transcrito=CCDS38639.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
134898266	ID=snp18105; estado=nuevo; ref=G; alelos=T/T; apoyo=10; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Cenpe; identificación del transcrito=CCDS51072.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
134900620	ID=rs38055141; estado=conocido; ref=G; alelos=A/A; apoyo=15; Tipo de mutación=Homocigota; nombre= Cenpe ; identificación del transcrito=CCDS51072.1; mRNAaCrom='+'; número de codón=814; cambio de codón='GGC=>AGC'; Cambio de residuo de aminoácido='G=>S'; función=cambio de aminoácido;
137778357	ID=rs46121470; estado=conocido; ref=T; alelos=C/C; apoyo=9; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Mttp; identificación del transcrito=CCDS38650.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón; nombre=Mttp; identificación del transcrito=CCDS51080.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
137778370	ID=rs47719544; estado=conocido; ref=G; alelos=A/A; apoyo=8; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Mttp; identificación del transcrito=CCDS38650.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón; nombre=Mttp; identificación del transcrito=CCDS51080.1; mRNAaCrom='-'; función=intrón;
137884596	ID=rs30512262; estado=conocido; ref=G; alelos=C/C; apoyo=9; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=Adh7; identificación del transcrito=CCDS38651.1; mRNAaCrom='+'; función=intrón;
138875277	ID=rs30981496; estado=conocido; ref=T; alelos=C/C; apoyo=17; Tipo de mutación=Homocigota; nombre=B930007M17Rik; identificación del transcrito=CCDS17871.1; mRNAaCrom='+'; número de codón=57; cambio de codón='GAT=>GAC'; Cambio de residuo de aminoácido='D=>D'; función=codificante-sinónima;

De los ocho genes resaltados en la tabla 1, el que mostraba una expresión significativa en retina, utilizando datos de transcriptomas (RNA-seq) publicados (Brooks MJ. *et al* 2011) y disponibles en GEO series (GSE33141), era el gen *Gnat2* (*Guanine nucleotide binding protein, alpha transducing 2*, MGI:95770), homólogo del gen humano GNAT2 (OMIM: #139340), asociado a la enfermedad congénita rara acromatopsia de tipo 4 (OMIM: #613856) (FIGURA 1).

La mutación detectada en el gen *Gnat2* de ratones HsdWin:NMRI corresponde a un cambio de un solo nucleótido (G/A) en posición 598 del exon 6 de este locus, asociado al cambio del aminoácido codificado en el codon 200 (de GAT a AAT), que produce un cambio de Asp200Asn (D200N) (FIGURA 2). Esta misma mutación, denominada *Gnat2*^{cpfl3} (MGI:3588845), había sido descrita en ratones de la cepa ALS/LtJ (Chang B, *et al.* 2006) pero se desconocía su presencia en ratones HsdWin:NMRI. La presencia de la mutación en ratones HsdWin:NMRI puede detectarse mediante un sencillo test de PCR, descrito inicialmente en el estado de la técnica (Chang B, *et al.* 2006). Realizado el experimento con varios ratones HsdWin:NMRI de cada uno de los tres genotipos se constata la presencia de los fragmentos analíticos y polimórficos esperados, asociados a la mutación (FIGURA 3).

Los ratones HsdWin:NMRI, portadores de la mutación *Gnat2*^{cpfl3} constituyen un nuevo modelo animal de retinopatías, preferentemente de la enfermedad rara denominada acromatopsia, y más preferentemente de la acromatopsia de tipo IV, asociada a mutaciones en el locus GNAT2 (OMIM: #613856).

Esta invención tiene las siguientes aplicaciones:

Una primera aplicación de la invención es el uso de ratones HsdWin:NMRI como modelo animal de una retinopatía, preferentemente de acromatopsia, y más preferentemente de acromatopsia de tipo IV, para estudios de esta patología y para el desarrollo y evaluación de posibles estrategias de terapia. Los ratones HsdWin:NMRI se utilizan ampliamente en biomedicina como modelo de experimentación animal (a fecha 6/6/2012 es posible localizar 1962 referencias bibliográficas, a través de PubMed, que reportan el uso de ratones HsdWin:NMRI) mucho más que los ratones ALS/LtJ (3 citas en PubMed). A diferencia de los ratones de la cepa ALS/Ltj, cuyo uso es muy poco frecuente en biomedicina, los ratones de la colonia comercial (*stock* en inglés) no consanguínea HsdWin:NMRI son de uso muy común y se utilizan como ratones albinos no consanguíneos en

multitud de experimentos, en todo el mundo, gracias a su buen comportamiento, excelente capacidad de cría y a que pueden ser obtenidos fácilmente desde diversos distribuidores: Harlan, Charles River, Taconic.

Los ratones ALS/Ltj (Mathews et al. 2004) pueden obtenerse comercialmente (The Jackson Laboratory: <http://jaxmice.jax.org/strain/003072.html>). Sin embargo, son ratones genéticamente complejos que, además de la mutación *Gnat2^{cpfl3}* portan también mutaciones en homocigosis en los loci *Tyr^c*, *Asp^a* y *Cdh23^{ahl}*. La mutación *Tyr^c* corresponde al fenotipo albino (también presente en los ratones HsdWin:NMRI), mientras que la mutación *Cdh23^{ahl}* está asociada a una sordera progresiva que debuta a partir de los 3 meses de edad. Los ratones ALS/Ltj no serán habitualmente una primera elección para los investigadores en biomedicina interesados en el estudio de retinopatías, puesto que fueron diseñados en combinación con otra cepa, denominada ALR/Ltj (The Jackson Laboratory <http://jaxmice.jax.org/strain/003070.html>), para estudios de diabetes, obesidad, alteraciones del metabolismo e investigación toxicológica. La diferencia entre los ratones ALS/Ltj y ALR/Ltj es su sensibilidad "S" o resistencia "R" al tratamiento con alloxano "AL" (o estreptozotocina), que causa la muerte de las células beta del páncreas y resulta en una severa hiperglicemia e hipoinsulinemia, siendo ratones adecuados para estudios de diabetes. Ambas dos cepas, ALS/Ltj y ALR/Ltj, fueron creadas en Japón, a partir de ratones Crj:CD-1 (ICR) mediante cruzamientos consanguíneos selectivos, analizando la susceptibilidad al desarrollo de la diabetes tras el tratamiento con alloxano. Los ratones ALS/Ltj fueron transferidos a The Jackson Laboratory en 1996 y puestos en producción y disponibles comercialmente solamente desde 1998.

Por el contrario, los ratones HsdWin:NMRI tienen un origen anterior a los ratones ALS/Ltj, lo que explica su utilización habitual en biomedicina. A partir de los datos aportados por el proveedor (Harlan) podemos resumir que la colonia de ratones no consanguíneos albinos Swiss en USA se originó a partir de nueve ratones que Clara Lynch se trajo en 1926 desde Lausanne (Suiza). En 1937, estos ratones se pasaron de los investigadores Lynch a Piley que los convirtió en ratones consanguíneos y los denominó NIH/PI. En la generación F51 fueron trasladados al US Naval Medical Research Institute y a partir de entonces fueron denominados NMRI. En 1955 se adquirieron por parte de la Bundes-Forschungsanstalt für Viruskrankheiten alemana y, finalmente, desde 1958, fueron producidos, como ratones albinos no consanguíneos, desde el Central Institute for Laboratory Breeding, Hannover (Alemania). En 1981 fueron trasladados a Winkelmann (Win) y en 1998 pasaron desde Harlan-Winkelmann a Harlan Laboratories, constituyendo los ratones actualmente denominados y comercialmente disponibles como HsdWin:NMRI (Harlan: <http://www.harlan.com>). El hecho de que desde 1958 estuvieran disponibles en Europa como ratones albinos no consanguíneos (y anteriormente en USA), y debido a las características intrínsecas de estos ratones (buen comportamiento, excelente capacidad de cría) contribuyeron decisivamente a su popularidad y difusión en biomedicina, en múltiples campos de investigación, incluyendo el estudio de retinopatías, popularidad y difusión que siguen en vigor en la actualidad.

Todos los ratones "*coneless*" son portadores de la mutación *Gnat2<cpfl3>*. Es decir, todos los ratones que presentan el fenotipo *coneless* son portadores de la mutación en el gen *Gnat2* en homocigosis. Los ratones homocigóticos mutantes se distinguen de los ratones heterocigóticos (que no presentan el fenotipo *coneless*, pues la mutación es recesiva) mediante el test de PCR descrito en Chang et al. 2006 e ilustrado en la figura 3, que permite distinguir fácilmente un animal silvestre, de un animal portador de la mutación (heterocigótico) de un animal mutante (homocigoto para la mutación).

Una segunda aplicación industrial derivada de la invención es que ahora es posible distinguir y derivar dos subcepas de ratones HsdWin:NMRI, seleccionando individuos portadores, o no, de la mutación. Una primera subcepa, en la que los ratones porten la mutación identificada, establemente, en homocigosis (HsdWin:NMRI-*Gnat2^{cpfl3}*) y otra, en la que los ratones porten solamente la variante silvestre del mismo gen (HsdWin:NMRI-*Gnat2⁺*). La primera de las cepas será de interés para investigadores que estén estudiando acromatopsia de tipo IV, como un nuevo modelo animal de esta retinopatía y la segunda cepa será de todavía mayor interés en investigadores que necesiten utilizar ratones HsdWin:NMRI en investigaciones del sistema visual, para lo cual deberán usar aquellos individuos que no porten esta mutación *Gnat2^{cpfl3}* aquí identificada, para evitar posibles interferencias con sus investigaciones.

La presencia de individuos portadores de la mutación *Gnat2^{cpfl3}* entre los ratones HsdWin:NMRI es fácilmente identificable mediante un sencillo experimento de PCR con oligonucleótidos específicos que amplifican una región del exon 6 del gen *Gnat2* en la que se encuentra la mutación, seguido de la digestión enzimática del producto de ADN resultante con el enzima de restricción MseI, dado que la mutación *Gnat2^{cpfl3}* genera un sitio de corte adicional para este enzima, resultando en un patrón de bandas de ADN, tras la digestión, analítico, que permite distinguir, perfectamente, y sin ningún género de dudas, animales portadores de la mutación (heterocigotos), animales mutantes (con la mutación en homocigosis, y, por lo tanto, con el fenotipo alterado de retina *coneless*) y animales normales (con la variante alélicas normal, silvestre, para el gen, también en homocigosis) (ver figura 3). El método de genotipación y los oligonucleótidos específicos están descritos en el trabajo que describe originalmente la mutación *Gnat2^{cpfl3}* (Chang et al. 2006). Todos los ratones de la colonia albina no consanguínea HsdWin:NMRI que manifiestan un fenotipo *coneless* son portadores de la mutación *Gnat2^{cpfl3}*, sin excepción, siendo por lo tanto portadores de las bandas analíticas específicas del alelo mutante *Gnat2^{cpfl3}* en homocigosis, de acuerdo al test de genotipación aquí descrito.

La creación y distribución de estas dos subcepas derivadas de ratones HsdWin:NMRI (HsdWin:NMRI- *Gnat2*^{cpfl3} y HsdWin:NMRI- *Gnat2*⁺) constituye una tercera aplicación industrial en sí misma.

5 Los ratones de la subcepa HsdWin:NMRI-*Gnat2*<+> no coinciden con los ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI distribuidos en el mercado. Actualmente las empresas que distribuyen estos ratones NMRI, distribuyen ratones de esta colonia desconociendo la existencia de una mutación, *Gnat2*^{cpfl3} que segrega en la población de dichos ratones, por lo tanto lo que actualmente están vendiendo son ratones mezclados o mixtos, entre los que se encuentran no solo individuos de las dos subcepas derivadas de ratones HsdWin:NMRI (HsdWin:NMRI- *Gnat2*^{cpfl3} y HsdWin:NMRI- *Gnat2*⁺), sino también los ratones heterocigotos, más dañinos si cabe, pues no presentan el fenotipo *coneless* (al ser heterocigotos) pero siguen dispersando y transmitiendo el alelo mutante entre la población de ratones HsdWin:NMRI, de ahí que actualmente exista la necesidad de discriminar las dos subcepas derivadas de ratones HsdWin:NMRI (HsdWin:NMRI- *Gnat2*^{cpfl3} y HsdWin:NMRI- *Gnat2*⁺).

15 Una cuarta aplicación es la utilización de estos ratones HsdWin:NMRI- *Gnat2*^{cpfl3} para el desarrollo y validación de terapias experimentales (génicas o no) encaminadas al tratamiento o mejora de las anomalías/déficits visuales asociados a la acromatopsia, en particular a la acromatopsia de tipo IV. El uso de este ratón no está limitado a las terapias génicas, sino a cualquier otro tipo de terapia (p.e. inyección intraocular de un compuesto con actividad neuroprotectora, con la esperanza de limitar el daño de los conos), esta no es una terapia génica, y sin embargo sí que es una terapia experimental.

20 En la presente invención, el término: "ratón albino no consanguíneo HsdWin:NMRI" hace referencia a los ratones albinos no consanguíneos NMRI obtenidos comercialmente del distribuidor Harlan (<http://www.harlan.com>).

25 En la presente invención, el término: "fenotipo alterado de retina *coneless*" hace referencia al fenotipo presentado por algunos ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI que muestran registros electroretinográficos (ERG) alterados, relativos a la respuesta de los fotorreceptores conos a un flash de luz y a estímulos repetidos (*flicker*, a 20 Hz) obtenidos en condiciones fotópicas, con una disminución importante o ausencia de señal eléctrica, indicativa de funcionamiento anómalo de los conos. Este fenotipo *coneless* se correlaciona también con ratones con menos fotorreceptores conos en su retina, detectados mediante procedimientos histológicos y de inmunohistoquímica. Adicionalmente, el fenotipo *coneless* se complementa con observaciones de la estructura celular de la retina realizadas con microscopía óptica o microscopía electrónica que permiten constatar la existencia de desorganización de los segmentos externos de los fotorreceptores, aumento de la presencia de vacuolas de aspecto vacío o con material detritico en el epitelio pigmentado de la retina, en individuos con ERG alterada, parámetros que no aparecen en los ratones con ERG normal. Todos los ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI con fenotipo *coneless* son portadores de la mutación *Gnat2*^{cpfl3} en homocigosis.

30 En la presente invención, el término: "gen *Gnat2*" hace referencia al gen que codifica para la subunidad α de la proteína-G transducina, implicada en el proceso de la fototransducción en los segmentos externos de los fotorreceptores de la retina.

35 En la presente invención, el término: "mutación *Gnat2*^{cpfl3}" hace referencia a la mutación descrita por Chang et al. (2006) correspondiente a un cambio del nucleótido G por A, en la posición 598 (exon 6) de la región codificante del gen *Gnat2*, asociada al cambio de aminoácido Asp por Asn en el residuo 200 de la proteína, lo cual resulta en una proteína mutante, no funcional.

40 En la presente invención, el término: "mutación *Gnat2*^{cpfl3} en homocigosis" hace referencia a la presencia de los dos alelos del gen *Gnat2* en su variante mutante, portadores de la mutación *Gnat2*^{cpfl3}.

45 En la presente invención, el término: "mutación *Gnat2*cpfl3 en heterocigosis" hace referencia a la presencia de un alelo del gen *Gnat2* en su variante mutante, portador de la mutación *Gnat2*^{cpfl3} mientras que el otro alelo mantiene la variante normal, silvestre, del gen *Gnat2*, es decir, *Gnat2*⁺.

50 En la presente invención, el término: "modelo animal" hace referencia a cualquier animal usado en experimentación científica en biomedicina con objeto de reproducir y así poder estudiar la etiología, los síntomas y desarrollar posibles aproximaciones terapéuticas para una determinada enfermedad o patología que afecta a los humanos.

55 En la presente invención, el término: "retinopatía" hace referencia a cualquier patología que curse con alteraciones estructurales y/o funcionales en la retina.

60 En la presente invención, el término: "acromatopsia" hace referencia a un subconjunto de retinopatías globalmente caracterizada por presentar una visión alterada de los colores, debida a la falta de función, completa o incompleta, de los fotorreceptores de tipo cono.

En la presente invención, el término: “acromatopsia tipo IV” hace referencia a un subtipo de acromatopsia asociada a mutaciones en el gen *GNAT2*.

5 En la presente invención, el término: “tratamiento y/o prevención de anomalías y/o déficits visuales asociados a una retinopatía” hace referencia a cualquier experimento, tratamiento o procedimiento terapéutico encaminado a prevenir, tratar y/o curar cualquiera de las anomalías y/o déficits y/o síntomas asociados a una retinopatía.

10 En la presente invención, el término: “terapia génica” hace referencia a cualquier intervención terapéutica que involucre la transferencia o introducción o resulte en la sustitución de nuevas secuencias de ADN portadoras de la secuencia correcta, sin mutaciones, de los genes en cuestión, asociados a alguna de las patologías a tratar, en las células afectadas por la mutación génica a corregir. Este término engloba tanto las transferencias génicas realizadas mediante vectores virales (retrovirus, lentivirus, adenovirus, adenoasociados, etc.) como las transferencias génicas realizadas mediante procedimientos no virales.

15 En la presente invención, el término: “validar protocolos de terapia experimental, génica o no, para tratamiento y/o prevención de los síntomas clínicos asociados a la acromatopsia de tipo IV” hace referencia a la utilización de los ratones de la colonia albina no consanguínea HsdWin:NMRI portadores de la mutación *Gnat2^{cpfl3}* en homocigosis como modelo animal sobre el que realizar experimentos pre-clínicos de sustitución o corrección génica, de terapia génica, o procedimientos terapéuticos de cualquier tipo que tengan por objeto paliar, tratar o curar alguna de las anomalías, síntomas y déficits asociados a la retinopatía acromatopsia de tipo IV, presente en este modelo animal, procedimientos que, de validarse en estos ratones, podrían ser considerados para un futuro tratamiento de esta patología en humanos, de ahí el término de validación de protocolos de terapia experimental.

25 En la presente invención, el término: “estudios de la retina o del sistema visual” hace referencia a cualquier tipo de experimento o procedimiento analítico cuyo objeto es explorar, documentar o analizar la estructura y/o función de la retina y del sistema visual, en cualquiera de sus aspectos o detalles. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, estudios histológicos, inmunohistoquímicos, procedimientos no invasivos como electroretinografía y el test optocinético, exploración de fondo de retina, análisis de agudeza visual, etc.

30 En la presente invención, el término: “método para identificar al menos un ratón albino no consanguíneo HsdWin:NMRI, caracterizado por presentar una mutación en el gen *Gnat2*, causante del fenotipo alterado de retina *coneless*, en una colonia de ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI” hace referencia al procedimiento de genotipación específico para cada caso (secuenciación de ADN, PCR, Southern Blot, ensayo con enzimas de restricción, etc.) que permita detectar cualquier mutación en la secuencia de ADN del gen *Gnat2*.

35 En la presente invención, el término: “método para identificar al menos un ratón que presenta una mutación *Gnat2^{cpfl3}* en una colonia de ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI” hace referencia al procedimiento de genotipación descrito por Chang et al. 2006, mediante un sencillo experimento de PCR con oligonucleótidos específicos que amplifican una región del exon 6 del gen *Gnat2* en la que se encuentra la mutación, seguido de la digestión enzimática del producto de ADN resultante con el enzima de restricción MseI, dado que la mutación *Gnat2^{cpfl3}* genera un sitio de corte adicional para este enzima, resultando en un patrón de bandas de ADN, tras la digestión, analítico, que permite distinguir, perfectamente, y sin ningún género de dudas, animales portadores de la mutación (heterocigotos), animales mutantes (con la mutación en homocigosis, y, por lo tanto, con el fenotipo alterado de retina *coneless*) y animales normales (con la variante alélica normal, silvestre, para el gen, también en homocigosis) (ver figura 3). El método de genotipación y los oligonucleótidos específicos están descritos en el trabajo que describe originalmente la mutación *Gnat2^{cpfl3}* (Chang et al. 2006). Todos los ratones de la colonia albina no consanguínea HsdWin:NMRI que manifiestan un fenotipo *coneless* son portadores de la mutación *Gnat2^{cpfl3}*, sin excepción, siendo por lo tanto portadores de las bandas analíticas específicas del alelo mutante *Gnat2^{cpfl3}* en homocigosis, de acuerdo al test de genotipación aquí descrito.

40 En la presente invención, el término: “método para identificar al menos un ratón que presenta una mutación *Gnat2^{cpfl3}* en heterocigosis en una colonia de ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI” hace referencia al procedimiento de genotipación descrito por Chang et al. 2006, mediante un sencillo experimento de PCR con oligonucleótidos específicos que amplifican una región del exon 6 del gen *Gnat2* en la que se encuentra la mutación, seguido de la digestión enzimática del producto de ADN resultante con el enzima de restricción MseI, dado que la mutación *Gnat2^{cpfl3}* genera un sitio de corte adicional para este enzima, resultando en un patrón de bandas de ADN, tras la digestión, analítico, que permite distinguir, perfectamente, y sin ningún género de dudas, animales portadores de la mutación (heterocigotos), como aquellos que portan una copia alélica de la variante normal del locus *Gnat2* y una copia alélica de la mutación *Gnat2^{cpfl3}* (ver figura 3), resultando en un patrón de bandas de ADN, tras el procedimiento de genotipación indicado, con tamaños de 258, 156, 102, 83 y 21 pares de bases. Habitualmente, por su pequeño tamaño, la banda de 21 pares de bases no logra distinguirse en un gel estándar de electroforesis horizontal de agarosa teñido con Bromuro de Etidio.

65

En la presente invención, el término: "método para identificar al menos un ratón que presenta una mutación *Gnat2*^{*cpfl3*} en homocigosis en una colonia de ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI" hace referencia al procedimiento de genotipación descrito por Chang et al. 2006, mediante un sencillo experimento de PCR con oligonucleótidos específicos que amplifican una región del exon 6 del gen *Gnat2* en la que se encuentra la mutación, seguido de la digestión enzimática del producto de ADN resultante con el enzima de restricción MseI, dado que la mutación *Gnat2*^{*cpfl3*} genera un sitio de corte adicional para este enzima, resultando en un patrón de bandas de ADN, tras la digestión, analítico, que permite distinguir, perfectamente, y sin ningún género de dudas, animales mutantes, homocigotos para la mutación, como aquellos que portan las dos copia alélicas de la mutación *Gnat2*^{*cpfl3*} (ver figura 3), resultando en un patrón de bandas de ADN, tras el procedimiento de genotipación indicado, con tamaños de 156, 102, 83 y 21 pares de bases. Habitualmente, por su pequeño tamaño, la banda de 21 pares de bases no logra distinguirse en un gel estándar de electroforesis horizontal de agarosa teñido con Bromuro de Etidio.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1. Una manera de determinar si un determinado gen se expresa, funciona, en un determinado tejido es analizando el transcriptoma de ese tejido, metodología actualmente abordable mediante el protocolo NGS de RNA-seq. En esta figura se correlaciona un transcriptoma de retina de ratón con los 8 genes seleccionados de la tabla 1, comprobándose que solamente uno de ellos, *Gnat2*, tiene una expresión significativa en retina, tejido donde se observan las alteraciones en el ratón HsdWin:NMRI mutante.

FIGURA 2. Análisis bioinformático de los exomas obtenidos de ratones seleccionados, de los tres genotipos: mutantes, portadores y silvestres. Aparece indicada la mutación en el gen *Gnat2*.

FIGURA 3. Genotipación de la mutación en el gen *Gnat2* en ratones HsdWin:NMRI.

FIGURA 4. Electrorretinogramas ilustrativos de animales con una respuesta ERG normal de conos y una estructura de retina normal y, por otro lado, los animales con una respuesta ERG alterada de conos y una estructura de retina alterada de la colonia de ratones HsdWin:NMRI.

FIGURA 5. Microfotografías de células del epitelio pigmentado de la retina de animales con el fenotipo ERG de conos normal y con la retina alterada de la colonia de ratones HsdWin:NMRI, obtenidas al microscopio electrónico, mostrando las alteraciones características.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

EJEMPLO 1.

1.1 - Experimentos de fenotipado visual y observación de la estructura celular de la retina en ratones HsdWin:NMRI.

Se realizaron experimentos de fenotipación visual en los que se valoró las características del sistema visual de ratones albinos no consanguíneos comerciales HsdWin:NMRI, se obtuvieron patrones electrorretinográficos (ERG) alterados en 20 de 45 individuos analizados. La alteración observada correspondía a la ausencia de respuesta eléctrica de conos a un flash de luz y, de forma equivalente, a la ausencia de respuesta de conos frente a estímulos repetidos (flicker) en condiciones fotópicas (FIGURA 4). Estas alteraciones electrofisiológicas en la retina de determinados individuos fueron correlacionadas con unos recuentos inferiores de conos en la retina de estos animales con ERG anormal y, finalmente, coincidieron con toda una serie de alteraciones morfológicas distinguibles al microscopio óptico y, sobre todo, al microscopio electrónico (FIGURA 5). Las alteraciones asociadas a esta aparente retinopatía eran similares a las observadas en otras retinopatías, como la acromatopsia, e incluyen engrosamiento de la membrana de Bruch, con depósitos electrodensos y núcleos picnóticos, aparición de numerosas vacuolas citoplasmáticas de aspecto vacío o lipídico, en las células del epitelio pigmentado de la retina y separación de las uniones íntimas entre células.

1.2 - Identificar la mutación y el gen responsables del fenotipo “*coneless*” de retina alterada en ratones HsdWin:NMRI

Con objeto de determinar la identidad genética de la mutación observada en la retina de algunos ratones HsdWin:NMRI se establecieron nueve pedigríes, tres de ellos independientes y los seis restantes en los que se compartía uno de los progenitores familiares, dando lugar a 157 ratones de tres generaciones consecutivas, de los cuales se seleccionaron 93 representativos de los nueve pedigríes para analizar el ligamiento genético con un panel de 1449 marcadores polimórficos SNPs (MD, Illumina).

1.3 – Análisis bioinformático

Mediante el análisis bioinformático realizado con los programas Merlin y Simwalk (con los cuales se llegó a la misma conclusión) se pudo concluir que el fenotipo de retina mutante correlacionaba con una distribución característica de marcadores delimitada exactamente por los SNPs rs13477309 y rs13477448, presentes en el cromosoma 3 del genoma del ratón. Las coordenadas exactas (versión Ensembl 66, Build 37) de la región corresponden a 3:105,273,322-3:139,617,214, una región de 34,343,892 nucleótidos. Utilizando el programa Biomart de Ensembl se analizó la región descubriéndose la existencia de 357 genes con identificadores Ensembl (ID), de los cuales solamente 293 contaban con su correspondiente identificador MGI. Con estos últimos, y utilizando el programa aGEM 3.1 (Jiménez-Lozano N, *et al.* 2012) se determinó que 185 de estos genes se expresaban en retina, de los cuales 6 de ellos tenían una expresión muy fuerte en retina, 88 tenían una expresión moderada y 90 una expresión relativamente baja.

1.4 – Análisis masivo de secuenciación de exomas

La gran cantidad de genes existentes, potencialmente candidatos para ser los responsables de la mutación observada en ratones HsdWin:NMRI, propició su análisis mediante procedimientos masivos, de NGS, utilizando la secuenciación de exomas de individuos seleccionados de la colonia: mutantes, silvestres y portadores. Se abordó la secuenciación de todo el exoma del genoma de ratón con la tecnología Illumina HiSeq2000 (el kit de captura: *Agilent SureSelect Mouse Exon*, 50 Mb, 50X por muestra). Se secuenciaron seis muestras de ADN: dos ratones homocigotos silvestres, dos ratones heterocigotos y dos ratones homocigotos mutantes (“*coneless*”). La visualización de los resultados de los exomas se realizó con el programa IGV 2.1 (Robinson JT. *et al.* 2011). Se compararon los resultados obtenidos de la región acotada por el análisis de ligamiento genético anterior en los seis ratones con un archivo que contenía los SNPs polimórficos del genoma de referencia. Se buscaron aquellas variaciones genéticas de un solo nucleótido (SNVs) que aparecían en los ratones mutantes “*coneless*” (aa) pero no en los ratones homocigotos silvestres (AA), en relación al genoma de ratón de referencia. Se localizaron 97 variaciones genéticas de un solo nucleótido (SNVs) (SNPs) que estaban presentes en los dos ratones mutantes “*coneless*” (aa) y que no aparecían en los dos ratones silvestres (AA), en relación al genoma de referencia de ratón. De estas 97 variaciones genéticas de un solo nucleótido (SNVs) 55 estaban ya descritas como SNPs mientras que el resto, 42, eran nuevas. De estos 97 SNVs: 66 se localizan en regiones intrónicas, 1 en regiones UTR5’, 1 en regiones UTR3’, 14 son sinónimas (no hay cambio de aminoácido asociado), 5 están en regiones intergénicas y 10 son “sin sentido” (asociadas a cambios de aminoácido en regiones codificantes de genes). Los 10 SNVs “sin sentido” se localizan en las regiones codificantes de 8 genes (*Ovgp1* [MGI:10661], *Slc16a4* [MGI:2385183], *Eps8l3* [MGI:2139743], *Gstm2* [MGI:95861], *Gnat2* [MGI:95779], *Celsr2* [MGI:1858235], *Rwdd3* [MGI:1920420] y *Cenpe* [MGI:1098230]) (Tabla 1).

1.5 – Análisis del nivel de expresión génica

Para conocer los niveles de expresión de estos genes se utilizaron los perfiles de expresión de transcriptomas de retinas de ratón, obtenidos por ultrasecuenciación y ya publicados en GEO Series GSE33141 (Brooks MJ *et al.* 2011). Con el programa IGV 2.1 se visualizaron los transcriptomas de retinas de ratón y se fue buscando el nivel de expresión de los 8 genes. De los 10 genes seleccionados, el que muestra expresión en retina, de forma significativa, es el gen *Gnat2* (Figura 1).

La mutación en el gen *Gnat2* (señalada su posición con una flecha en la Figura 2) sigue el patrón esperado: la mutación está ausente en los ratones homocigotos silvestres (AA), en los ratones heterocigotos (Aa), aproximadamente, está presente en la mitad de las lecturas y en los ratones homocigotos mutantes “*coneless*” (aa) está en todas las lecturas (rectángulos grises de la Figura 2). La mutación es un cambio de solo un nucleótido (G/A), localizada en la posición 598, en el exón 6 del gen *Gnat2*. Este cambio de una base produce el cambio del codón 200 de GAT a AAT (cambio de ácido aspártico a asparragina, Asp200Asn). Esta mutación ya había sido descrita anteriormente en otra cepa de ratón (ALS/Ltj) (Chang *et al.* 2006). El gen *Gnat2* codifica para la subunidad α de la transducina (proteína G), proteína clave en el mecanismo de fototransducción (Larhammar D, *et al.* 2009). Mutaciones en este gen han sido asociadas a acromatopsia; enfermedad rara de humanos que se caracteriza por la pérdida de la funcionalidad de los conos, encargados de la visión de los colores (Simunovic MP. 2010).

1.6 – Validación de la mutación en el gen *Gnat2*

5 Una vez identificada la mutación en el gen *Gnat2* se procedió a validar su presencia de forma directa mediante PCR y posterior digestión enzimática (Figura 3) en diversos ratones HsdWin:NMRI previamente fenotipados, incluidos los que se enviaron para la secuenciación de los exomas: dos ratones homocigotos silvestres, dos ratones heterocigotos y dos ratones homocigotos mutantes; más tres muestras adicionales. Para ello primero se amplificó un fragmento de 362 pb y a continuación se hizo la digestión con *MseI* siguiendo protocolos previamente establecidos (Chang y col., 2006). Los ratones homocigotos silvestres mostraron dos bandas producto de la digestión enzimática (21, 83 y 258 pb), los ratones heterocigotos cuatro bandas (21, 83, 102, 156 y 258 pb) y los ratones homocigotos mutantes solamente tres (21, 83, 102 y 156 pb). En todos los casos, la banda correspondiente a 21 pb, al ser de muy pequeño tamaño, no se aprecia en el gel de agarosa (figura 3).

10

BIBLIOGRAFÍA

- 5 Alexander JJ, Umino Y, Everhart D, Chang B, Min SH, Li Q, Timmers AM, Hawes NL, Pang JJ, Barlow RB, Hauswirth WW. Restoration of cone vision in a mouse model of achromatopsia. *Nat Med*. 2007 Jun;13(6):685-7.
- 10 Aligianis IA, Forshew T, Johnson S, Michaelides M, Johnson CA, Trembath RC, Hunt DM, Moore AT, Maher ER. Mapping of a novel locus for achromatopsia (ACHM4) to 1p and identification of a germline mutation in the alpha subunit of cone transducin (GNAT2). *J Med Genet*. 2002 Sep;39(9):656-60
- Biel M, Seeliger M, Pfeifer A, Kohler K, Gerstner A, Ludwig A, Jaissle G, Fauser S, Zrenner E, Hofmann F. Selective loss of cone function in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNG3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Jun 22;96(13):7553-7
- 15 Brooks MJ, Rajasimha HK, Roger JE, Swaroop A. Next-generation sequencing facilitates quantitative analysis of wild-type and *Nrl(-/-)* retinal transcriptomes. *Mol Vis*. 2011;17:3034-54
- 20 Carvalho LS, Xu J, Pearson RA, Smith AJ, Bainbridge JW, Morris LM, Fliesler SJ, Ding XQ, Ali RR. Long-term and age-dependent restoration of visual function in a mouse model of CNGB3-associated achromatopsia following gene therapy. *Hum Mol Genet*. 2011 Aug 15;20(16):3161-75.
- 25 Chang B, Dacey MS, Hawes NL, Hitchcock PF, Milam AH, Atmaca-Sonmez P, Nusinowitz S, Heckenlively JR. Cone photoreceptor function loss-3, a novel mouse model of achromatopsia due to a mutation in *Gnat2*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Nov;47(11):5017-21.
- Chang B, Hawes NL, Hurd RE, Davisson MT, Nusinowitz S, Heckenlively JR. Retinal degeneration mutants in the mouse. *Vision Res*. 2002 Feb;42(4):517-25.
- 30 De la Villa P, Barhoum R, Zurita E y Montoliu L. Functional cone deficit in albino outbred NMRI/Ha mice. 2007 ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) annual meeting, abstract book 1284/B340, May 2007, Fort Lauderdale, FL, USA.
- 35 Ding XQ, Harry CS, Umino Y, Matveev AV, Fliesler SJ, Barlow RB. Impaired cone function and cone degeneration resulting from CNGB3 deficiency: down-regulation of CNGA3 biosynthesis as a potential mechanism. *Hum Mol Genet*. 2009 Dec 15;18(24):4770-80
- Hofmann KP, Scheerer P, Hildebrand PW, Choe HW, Park JH, Heck M, Ernst OP. A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model. *Trends Biochem Sci*. 2009 Nov;34(11):540-52.
- 40 Jeffery G, Brem G, Montoliu L. Correction of retinal abnormalities found in albinism by introduction of a functional tyrosinase gene in transgenic mice and rabbits. 1997 *Dev. Brain Research* 99 95-102.
- 45 Jiménez-Lozano N, Segura J, Macías JR, Vega J, Carazo JM. Integrating human and murine anatomical gene expression data for improved comparisons. *Bioinformatics*. 2012 Feb 1;28(3):397-402
- Kohl S, Jäggle H, Sharpe LT, Wissinger B. En: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, Adam MP, editors. *GeneReviews™* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-.2004 Jun 24 [updated 2010 Dec 23]. PMID:20301591.

- Kohl S, Marx T, Giddings I, Jägle H, Jacobson SG, Apfelstedt-Sylla E, Zrenner E, Sharpe LT, Wissinger B. Total colourblindness is caused by mutations in the gene encoding the alpha-subunit of the cone photoreceptor cGMP-gated cation channel. *Nat Genet.* 1998 Jul;19(3):257-9.
- 5 Kohl S, Varsanyi B, Antunes GA, Baumann B, Hoyng CB, Jägle H, Rosenberg T, Kellner U, Lorenz B, Salati R, Jurklies B, Farkas A, Andreasson S, Weleber RG, Jacobson SG, Rudolph G, Castellan C, Dollfus H, Legius E, Anastasi M, Bitoun P, Lev D, Sieving PA, Munier FL, Zrenner E, Sharpe LT, Cremers FP, Wissinger B. CNGB3 mutations account for 50% of all cases with autosomal recessive achromatopsia. *Eur J Hum Genet.* 2005 Mar;13(3):302-8.
- 10 Komáromy AM, Alexander JJ, Rowlan JS, Garcia MM, Chiodo VA, Kaya A, Tanaka JC, Acland GM, Hauswirth WW, Aguirre GD. Gene therapy rescues cone function in congenital achromatopsia. *Hum Mol Genet.* 2010 Jul 1;19(13):2581-93.
- 15 Larhammar D, Nordström K, Larsson TA. Evolution of vertebrate rod and cone phototransduction genes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2009 Oct 12;364(1531):2867-80
- Lavado A, Jeffery G, Tovar V, de la Villa P, Montoliu L. Ectopic expression of tyrosine hydroxylase in the pigmented epithelium rescues the retinal abnormalities and visual function common in albinos in the absence of melanin. *2006 J. Neurochem,* 96, 1201-1211.
- 20 Mathews CE; Bagley R; Leiter EH. ALS/Lt: a new type 2 diabetes mouse model associated with low free radical scavenging potential. *Diabetes* 2004, 53 Suppl 1:S125-9.
- 25 Mattapallil MJ, Wawrousek EF, Chan CC, Zhao H, Roychoudhury J, Ferguson TA, Caspi RR. The Rd8 Mutation of the *Crb1* Gene Is Present in Vendor Lines of C57BL/6N Mice and Embryonic Stem Cells, and Confounds Ocular Induced Mutant Phenotypes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2012 May 17;53(6):2921-7.
- 30 Michalakis S, Mühlfriedel R, Tanimoto N, Krishnamoorthy V, Koch S, Fischer MD, Becirovic E, Bai L, Huber G, Beck SC, Fahl E, Büning H, Paquet-Durand F, Zong X, Gollisch T, Biel M, Seeliger MW. Restoration of cone vision in the *CNGA3*^{-/-} mouse model of congenital complete lack of cone photoreceptor function. *Mol Ther.* 2010 Dec;18(12):2057-63
- 35 Pang JJ, Alexander J, Lei B, Deng W, Zhang K, Li Q, Chang B, Hauswirth WW. Achromatopsia as a potential candidate for gene therapy. *Adv Exp Med Biol.* 2010;664:639-46.
- Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol.* 2011 Jan;29(1):24-6
- 40 Simunovic MP. Colour vision deficiency. *Eye (Lond).* 2010 May;24(5):747-55
- Thiadens AA, den Hollander AI, Roosing S, Nabuurs SB, Zekveld-Vroon RC, Collin RW, De Baere E, Koenekoop RK, van Schooneveld MJ, Strom TM, van Lith-Verhoeven JJ, Lotery AJ, van Moll-Ramirez N, Leroy BP, van den Born LI, Hoyng CB, Cremers FP, Klaver CC. Homozygosity mapping reveals PDE6C mutations in patients with early-onset cone photoreceptor disorders. *Am J Hum Genet.* 2009 Aug;85(2):240-7.
- 45 Varela C, Igartu I, De la Rosa E, De la Villa P. Functional modifications in rod bipolar cells in a mouse model of retinitis pigmentosa. *2003 Vision Research* 43 879-885.

Zurita E, Fernandez A, Cantero M, Ramirel L, de la Villa P, Benitez J, Montoliu L. A new animal model of age-related macular degeneration (AMD). IV Reunión científica anual del CIBERER, Madrid 2010, libro de resúmenes, página 39.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un ratón albino no consanguíneo HsdWin:NMRI, caracterizado por presentar una mutación en el gen *Gnat2* causante del fenotipo electroretinográfico (ERG) de conos alterado de retina *coneless*.
2. El ratón según la reivindicación 1, caracterizado por presentar una mutación *Gnat2*^{cpfl3}.
3. El ratón según la reivindicación 2, caracterizado por presentar una mutación *Gnat2*^{cpfl3} en homocigosis.
- 10 4. Uso del ratón descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1-3, como modelo animal de una retinopatía.
5. Uso según la reivindicación 4, caracterizado por que la retinopatía es acromatopsia.
- 15 6. Uso según la reivindicación 5, caracterizado por que la acromatopsia es de tipo IV.
7. Uso del ratón descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para el tratamiento y/o prevención de anomalías y/o déficits visuales asociados a una retinopatía.
- 20 8. Uso según la reivindicación 7, caracterizado por que la retinopatía es acromatopsia.
9. Uso según la reivindicación 8, caracterizado por que la acromatopsia es de tipo IV.
10. Uso del ratón descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para terapia génica.
- 25 11. Uso del ratón descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para validar protocolos de terapia experimental, génica o no, para tratamiento y/o prevención de los síntomas clínicos asociados a la acromatopsia de tipo IV.
- 30 12. Uso del ratón descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para estudios de la retina o del sistema visual.
- 35 13. Un método mediante PCR para identificar al menos un ratón albino no consanguíneo HsdWin:NMRI, caracterizado por presentar una mutación en el gen *Gnat2*, causante del fenotipo electroretinográfico (ERG) de conos alterado de retina *coneless*, en una colonia de ratones albinos no consanguíneos HsdWin:NMRI.
- 40 14. El método según la reivindicación 13, caracterizado por que se identifica al menos un ratón que presenta una mutación *Gnat2*^{cpfl3}.
15. El método según la reivindicación 14, caracterizado por que se identifica al menos un ratón que presenta una mutación *Gnat2*^{cpfl3} en homocigosis.
16. El método según la reivindicación 14, caracterizado por que se identifica al menos un ratón que presenta una mutación *Gnat2*^{cpfl3} en heterocigosis.

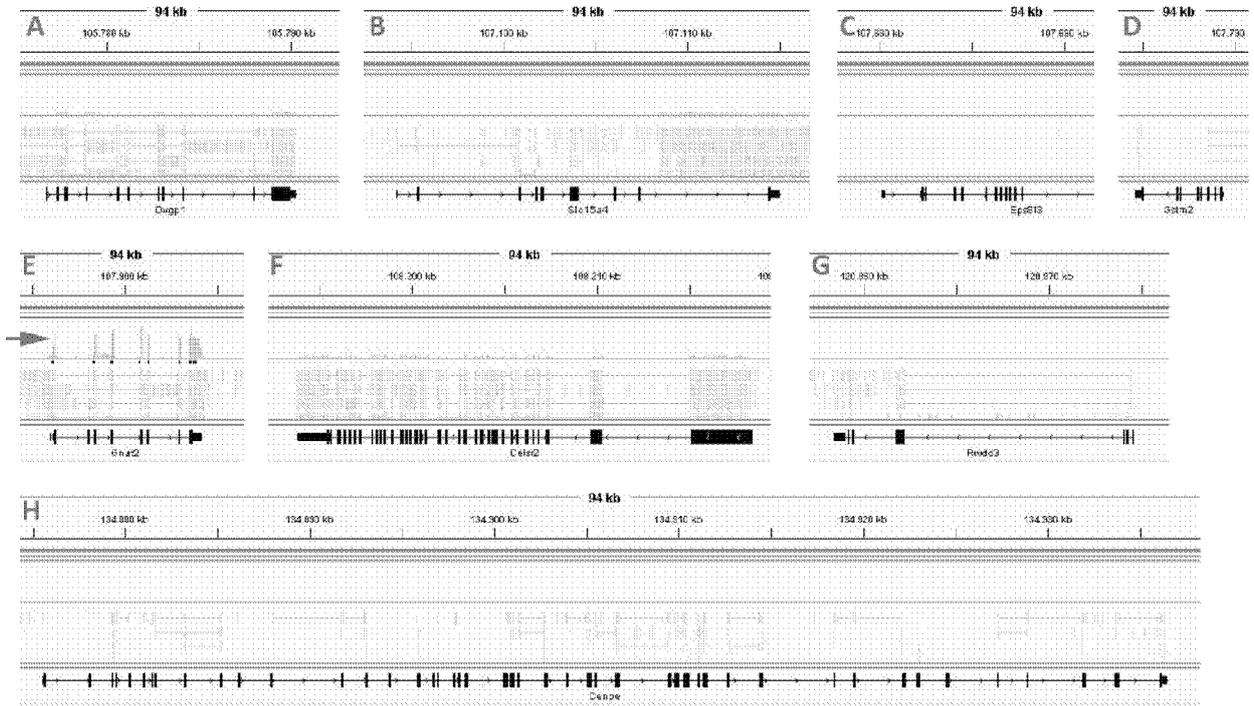


FIGURA 1

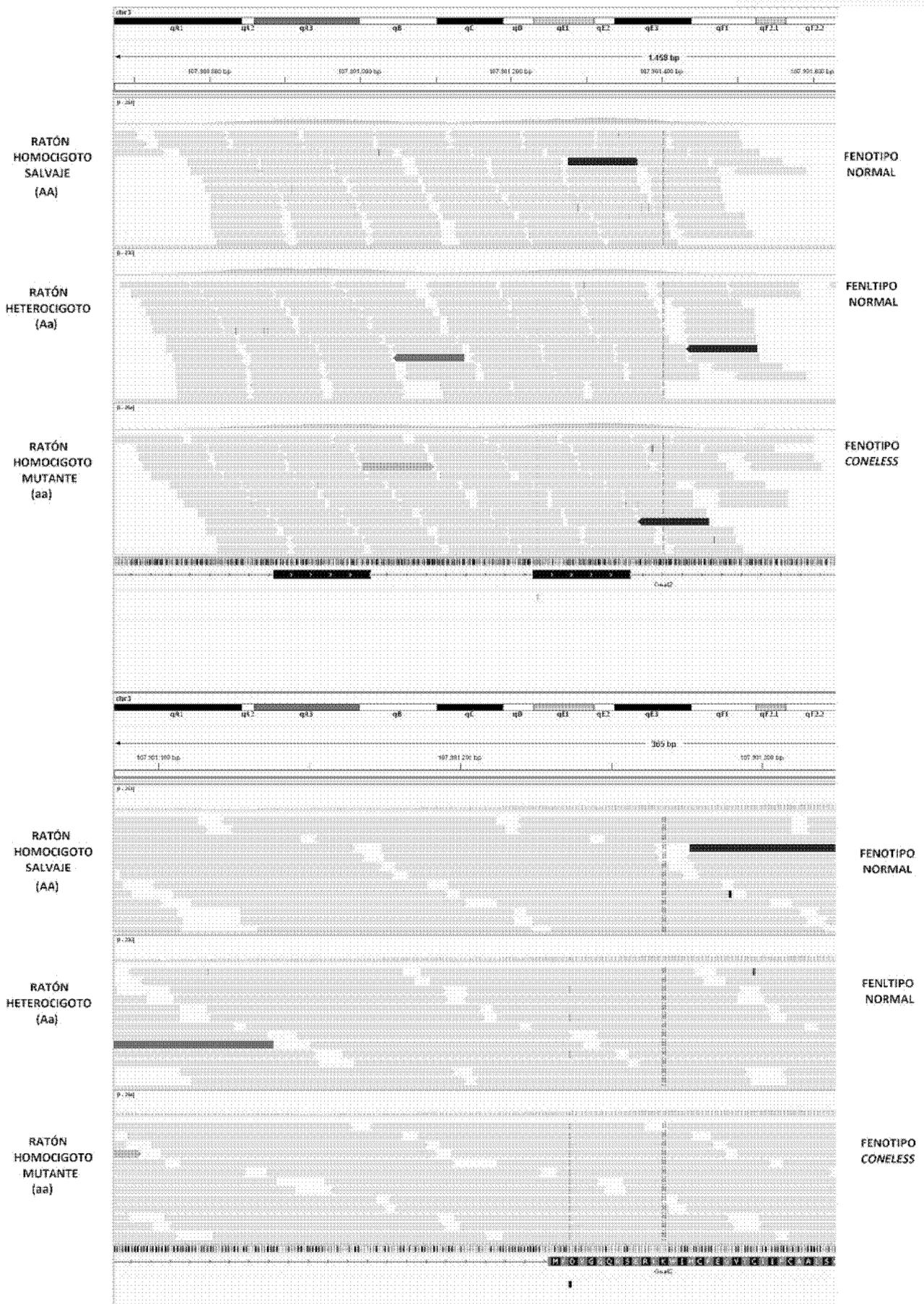


FIGURA 2

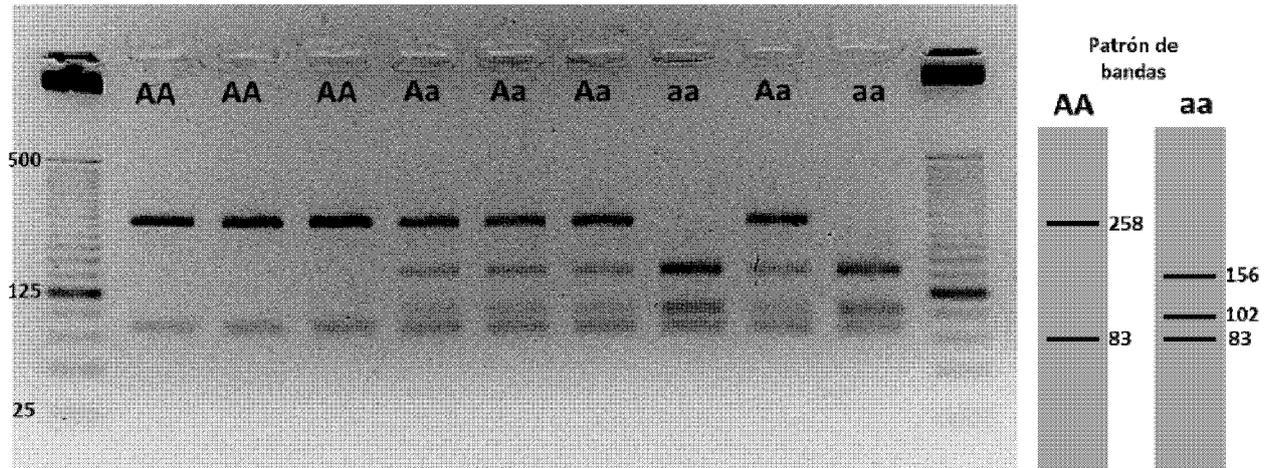
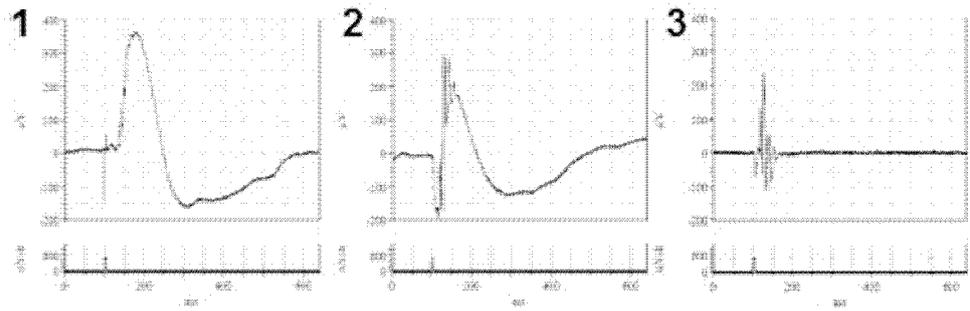


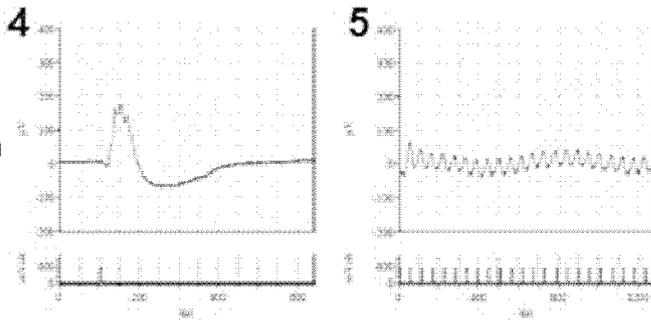
FIGURA 3

A

Registros adaptados a la oscuridad

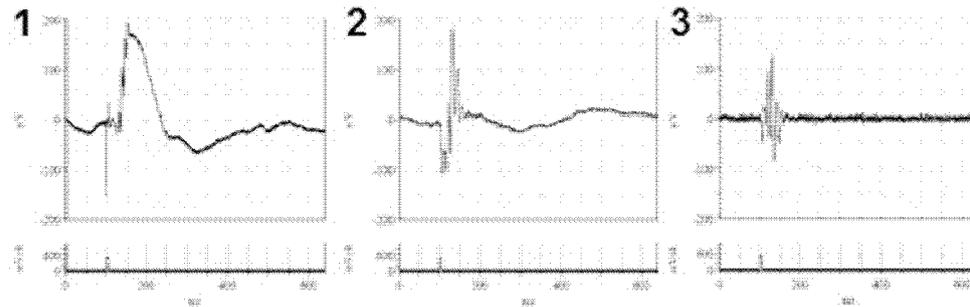


Registros adaptados a la luz



B

Registros adaptados a la oscuridad



Registros adaptados a la luz

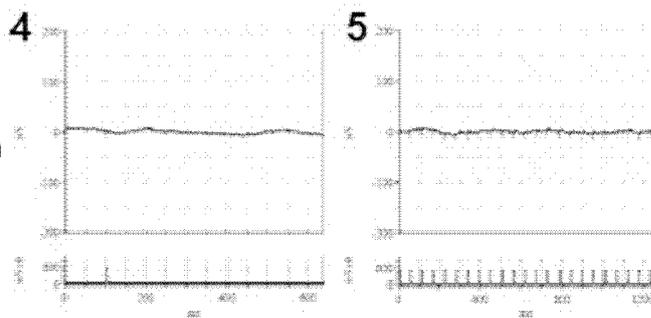


FIGURA 4

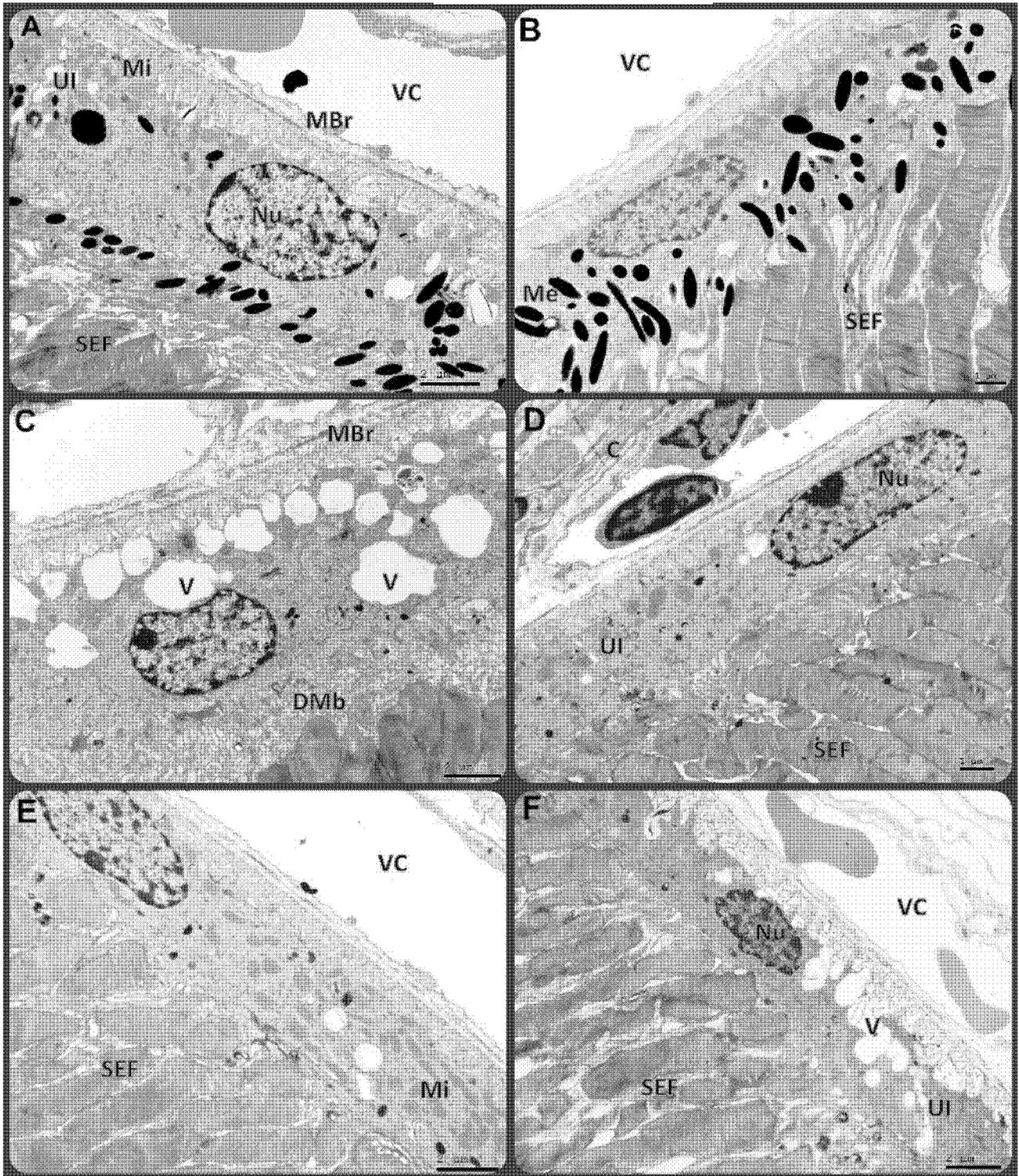


FIGURA 5

Listado de Secuencias

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
 CIBERER
 UNIVERSIDAD DE ALCALA DE HENARES
 FUNDACION CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES ONCOLOGICAS

<120> NUEVO MODELO ANIMAL DE ACROMATOPSIA

<130> 5120116 LLUIS MONTOLIU

<160> 1

<170> BISSAP 1.0

<210> 1
 <211> 1065
 <212> DNA
 <213> Mus musculus domesticus

<220>
 <221> source
 <222> 1..1065
 <223> /mol_type="DNA"
 /note="DNA codificante para Gnat2 subunidad alfa de transducina"
 /organism="Mus musculus domesticus"

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 598..599
 <223> /note="la G en posicion 598 muta a A en el fenotipo coneless"

<400> 1
 atggggagtg gcatcagtgc ttaggacaaa gaacttgcca ggaggtccaa ggagctggag 60
 aagaagctgc aggaggatgc tgacaaggaa gccaagactg tcaagctgct gttgctcggt 120
 gcgggagctg caggaagag cactatcgtc aaacagatga agatcattca ccaggatggc 180
 tactcaccg aagagtgcct agagttcaag tctgtcatct atgggaacgt gctgcagtcc 240
 atcctggcca tcatcagagc catgtccaca ctaggcattg actatgcaga gccaagctgt 300
 gcggatgccg ggagacagct caacaacctg gctgactcca ccgaggagg gaccatgcct 360
 cctgagttgg tggacgtcat caggaagttg tggaaggacg gtggagttca agcctgcttt 420
 gacagagctg cagagttcca gctcaatgac tcggcatctt actacctgaa ccagctggac 480
 cggattacag accctaacta cctccctaac gagcaggacg tgcttcgatc cagagtcaag 540
 acaacaggca tcatcgagac caagttttct gttaaagatt tgaatttcag gatgtttgat 600
 gtgggagggc agagatcaga gaggaagaaa tggatccact gcttcgaggg agtcacctgc 660
 atcattttct gtgcggcct cagtgcctac gacatggtgc tggaggagga tgacgaagtg 720
 aatcgcatgc acgagtcttt gcatctgttc aacagcatct gcaaccacaa gttctttgcg 780
 gctacgtcca tcgttctctt tctcaacaag aaggacctct ttgaggaaaa aattaagaaa 840
 gtccacctca gtatctgttt tccggagtat gacggaaaca actcctatga ggatgccggg 900
 aattatatca agagtcagtt ccttgacctc aacatgagga aagatgtcaa agaaatctac 960
 agtcacatga cctgtgctac agacacacag aacgtcaaat tcgtgttcga tgcagttaca 1020
 gacatcatca tcaaagaaaa cctcaaggac tgtgggctct tttaa 1065



- ②¹ N.º solicitud: 201231296
 ②² Fecha de presentación de la solicitud: 13.08.2012
 ③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤¹ Int. Cl.: **A01K67/027** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤ ⁶ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	NIH Swiss Outbred Mice.Datasheet [en línea]. HarlanLaboratories [recuperado el 18.10.2013]. Recuperado de Internet: <URL:www.harlan.com/products_and_services/research_models_and_sevices/research_models/nih_swiss_outbred_mice.hl	1-3
X	CHANG B, et al., "Cone photoreceptor function loss-3, a novel mouse model of achromatopsia due to a mutation in Gnat2. Invest Ophthalmol Vis Sci. (2006) vol. 47(11), pág-5017-21, todo el documento. Citado en la solicitud	13-16
Y		4-12
Y	DE LA VILLA P et al., "Functional cone deficit in albino outbred NMRI/Ha mice. 200730 ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) annual meeting, abstract book 1284/B340, Mayo 2007, todo el documento. Citado en la solicitud.	4-12
Y	ZURITA E et al., "A new animal model of agerelated macular degeneration (AMD)". IV Reunión científica anual del CIBERER, Madrid 2010, libro de resúmenes, página 39, todo el documento. Citado en la solicitud.	4-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p>Fecha de realización del informe 22.10.2013</p>	<p>Examinador M. Hernández Cuéllar</p>	<p>Página 1/4</p>
---	---	------------------------------

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 22.10.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 4-16	SI
	Reivindicaciones 1-3	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-16	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	NIH Swiss Outbred Mice.Datasheet [en línea]. Harlan Laboratories [recuperado el 18.10.2013]. Recuperado de Internet: <URL:www.harlan.com/products_and_services/research_models_and_sevices/research_models/nih_swiss_outbred_mice.hl	
D02	CHANG B, et al., "Cone photoreceptor function loss-3, a novel mouse model of achromatopsia due to a mutation in Gnat2. Invest Ophthalmol Vis Sci. (2006) vol. 47(11), pág-5017-21, todo el documento. Citado en la solicitud.	
D03	DE LA VILLA P et al., "Functional cone deficit in albino outbred NMRI/Ha mice. 200730 ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) annual meeting, abstract book 1284/B340, Mayo 2007, todo el documento. Citado en la solicitud.	
D04	ZURITA E et al., "A new animal model of agerelated macular degeneration (AMD)". IV Reunión científica anual del CIBERER, Madrid 2010, libro de resúmenes, página 39, todo el documento. Citado en la solicitud.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención hace referencia a un ratón albino no consanguíneo HsdWin:NMRI, caracterizado por presentar una mutación en el gen Gnat2 causante del fenotipo electrorretinográfico (ERG) de conos alterado de retina coneless. Preferentemente dicho ratón se caracteriza por presentar una mutación Gnat2cpfl3. Asimismo la invención hace referencia al uso del ratón descrito anteriormente descrito, como modelo animal de una retinopatía, preferentemente, acromatopsia de tipo IV. La invención también describe un método de PCR para identificar los citados ratones.

1.- NOVEDAD

El documento D01 corresponde a descripción de los ratones HsdWin:NMRI suministrados por la empresa Harlan. Como el propio solicitante indica en su memoria (pág. 18) entre estos ratones se encuentran ratones que presentan la mutación Gnat2cpfl3 en sus variantes homo y heterocigóticas. En este sentido D01 anticipa la novedad de las reivindicaciones 1-3 que por tanto no cumplen el Art 6.1 LP 11/1986.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA

El documento D02 describe la mutación Gnat2 en ratones ALS/Ltj, y el correspondiente método PCR para detectarla que incluye los oligonucleótidos específicos.

Las reivindicaciones 13-16 se refieren a un método mediante PCR para identificar al menos un ratón albino no consanguíneo HsdWin:NMRI, caracterizado por presentar una mutación en el gen Gnat2. Como el propio solicitante indica en su memoria (pág. 15), el método reivindicado es el descrito en el documento D02. En consecuencia, las reivindicaciones 13-16 carecen del requisito de actividad inventiva establecido en el Art. 8.1 LP 11/1986.

Las reivindicaciones 4-12 se refieren a distintos usos del ratón albino no consanguíneo HsdWin:NMRI, caracterizado por presentar una mutación en el gen Gnat2. Según indica el solicitante en su memoria, los ratones HsdWin:NMRI se utilizan habitualmente en experimentación animal. Los ratones de la colonia comercial (stock en inglés) no consanguínea HsdWin:NMRI son de uso muy común y se utilizan como ratones albinos no consanguíneos en multitud de experimentos, en todo el mundo, gracias a su buen comportamiento, excelente capacidad de cría y a que pueden ser obtenidos fácilmente desde diversos distribuidores: Harlan, Charles River, Taconic. De acuerdo al documento D03 (villa 2007) algunos ratones de la colonia albina no consanguínea comercial HsdWin:NMRI presentan un déficit funcional de fotorreceptores de tipo cono, medido mediante electrorretinografía, ERG, alteración que se correlaciona con un número inferior de fotorreceptores de tipo cono analizados mediante histología e inmunohistoquímica. Por su parte el documento D04 describe la existencia de individuos HsdWin:NMRI que, además de presentar las alteraciones en ERG mencionadas, asociadas a un déficit funcional de conos, fenotipo electrorretinográfico denominado "coneless", muestran además defectos degenerativos en la retina (presencia de vacuolas/drusas), similares a los que aparecen asociados a muchas otras retinopatías, como la degeneración macular asociada a la edad (DMAE). Los documentos D03 y D04 sitúan a los ratones HsdWin:NMRI como potenciales modelos de experimentación para retinopatías. A la vista de la información aportada en D02 y D03 o D04 se considera obvio para un experto en la materia intentar determinar la susceptibilidad de los ratones HsdWin:NMRI para ser empleados como modelos animales de retinopatías mediante su caracterización genética. En este sentido se considera que aplicando las técnicas habitualmente empleadas en genómica dicha caracterización se resolvería con unas expectativas razonables de éxito. En consecuencia, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 4-12 carecen del requisito de actividad inventiva establecido en el Art. 8.1 LP 11/1986.