

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 809 774**

51 Int. Cl.:

A01K 67/027 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 18150822 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.06.2020 EP 3326458**

54 Título: **Roedores con alelos mutantes de *Acvr1* condicionales**

30 Prioridad:

13.03.2013 US 201361778814 P

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

05.03.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ECONOMIDES, ARIS N. y
HATSELL, SARAH JANE**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 809 774 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Roedores con alelos mutantes de *Acvr1* condicionales

5 **Campo**

Animales no humanos, modificados por ingeniería genética, que tienen un alelo mutante de un gen *Acvr1*; construcciones de ácido nucleico que comprenden mutantes condicionales de un gen *Acvr1*; animales no humanos que presentan una característica fenotípica de fibrodysplasia osificante progresiva (FOP). Ratones modificados por ingeniería genética que presentan formación ósea ectópica. Animales no humanos que contienen alelos *ACRV1* mutantes condicionales que se expresan fuera del útero pero no en el útero.

Antecedentes

15 *Acvr1* es un receptor de tipo I para proteínas morfogénicas óseas (PMO). Determinadas mutaciones en el gen *Acvr1* humano, que incluyen mutaciones que dan lugar a la mutación R206H por modificación de aminoácidos, están muy asociadas con la enfermedad fibrodysplasia osificante progresiva (FOP) (véase, por ejemplo la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º. 2009/0253132; véase también, Pignolo, R. J. (2011) Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: Clinical and Genetic Aspects, Orphanet Journal of Rare Diseases, 6:80,1-6). Se cree que la mutación R206H, entre otras, aumenta la sensibilidad del receptor a la activación y lo hace más resistente al silenciamiento. Los ratones quiméricos que llevan una mutación R206H en *Acvr1* desarrollan un fenotipo similar a FOP (véase, por ejemplo, Chakkalakal *et al.* (2012). An *Acvr1* R206H knock-in mouse has fibrodysplasia ossificans progressiva, J. Bone and Mineral Res. 27:1746-1756).

25 Determinadas mutaciones en el *Acvr1*, por ejemplo, las que dan como resultado una mutación R206H de la proteína *Acvr1*, son letales perinatales en ratones. Cuando una mutación es letal perinatal, no es posible pasar una genosustitución (*knock-in gene*) que comprende la mutación a través de la línea germinal de un animal no humano. Por ejemplo, los estudios mencionados anteriormente requieren trabajar con ratones quiméricos que poseen en algunas células la mutación indicada pero que no pueden transmitir la mutación en la línea germinal; por lo tanto, no se ha establecido una línea de ratón estable y útil que comprenda la mutación R206H en la línea germinal.

30 Sigue existiendo la necesidad de animales no humanos que puedan transmitir una mutación *ACRV1* letal perinatal o embrionaria en la línea germinal para producir descendencia que sea útil, por ejemplo, para producir un animal no humano que presente un fenotipo asociado a la mutación *ACRV1*, por ejemplo, FOP, una característica de FOP, o una característica de un trastorno relacionado, o un trastorno relacionado.

Resumen

40 La presente invención es como se expone en las reivindicaciones. Por tanto, la presente invención proporciona una construcción de ácido nucleico que comprende: i) Un exón 5 de *Acvr1* que codifica una secuencia de tipo silvestre a nivel de proteína, flanqueado cadena arriba y cadena abajo por un primer par de sitios de reconocimiento de recombinasas específicas de sitio; y (ii) un exón 5 mutante de un gen *Acvr1* en orientación antisentido flanqueado cadena arriba y cadena abajo por un segundo par de sitios de reconocimiento de recombinasas específicas de sitio que son diferentes del primer par de sitios de reconocimiento de recombinasas específicas de sitio e incompatibles con el mismo, en donde el primer y segundo par de sitios de reconocimiento de recombinasas específicas de sitio están orientados de manera que una recombinasa puede invertir el exón 5 mutante en orientación sentido, y delecionar el exón 5 de *Acvr1* que codifica la secuencia tipo silvestre. La presente invención también proporciona un gen *Acvr1* que comprende una construcción de ácido nucleico de la invención. La presente invención proporciona además un roedor que comprende un genoma que comprende un gen *Acvr1* que comprende una construcción de ácido nucleico de la invención. La presente invención se describe más adelante.

55 Se proporcionan roedores modificados por ingeniería genética como se define en las reivindicaciones, que comprenden, en su línea germinal, una secuencia de ácido nucleico que comprende una modificación de un gen *Acvr1*.

Se proporcionan roedores modificados por ingeniería genética que comprenden, en su línea germinal, una secuencia de ácido nucleico que comprende una modificación genética condicional de un gen *Acvr1*, en donde la modificación genética hace que el roedor sea susceptible a la formación de hueso ectópico.

60 Se proporcionan roedores modificados por ingeniería genética que comprenden, en su línea germinal, una secuencia de ácido nucleico que comprende una modificación genética condicional que comprende un exón *Acvr1* mutante condicional, en donde la inducción de la expresión del exón *Acvr1* mutante condicional, confiere al roedor una susceptibilidad a la formación de hueso ectópico. El exón *Acvr1* mutante es el exón 5. En una realización específica, la mutación expresa una proteína codificada por *Acvr1* que tiene un exón 5 con una mutación R2026H.

65 Se proporcionan roedores que expresan condicionalmente un alelo de *Acvr1* mutante. En diversos aspectos, el alelo

de *Acvr1* mutante es un alelo que confiere un fenotipo patológico en el roedor que expresa el alelo. En diversos aspectos, los roedores comprenden un exón mutante de un alelo de *Acvr1* flanqueado cadena arriba y cadena abajo con sitios de reconocimiento de recombinasas específicas de sitio (SRRS), y el roedor comprende una recombinasa que reconoce los SRRS, en donde la recombinasa es inducible.

5 Se proporcionan roedores que comprenden una modificación de un alelo de *Acvr1* que causa (en una realización, en un heterocigoto; en una realización, en un homocigoto), promueve, o hace que el roedor sea susceptible a osificación ectópica.

10 Se proporcionan roedores que comprenden una mutación condicional de un alelo *Acvr1*, en donde el alelo de *Acvr1* mutante no se expresa en el útero, y no se expresa perinatalmente, y en donde los roedores expresan el alelo de *Acvr1* mutante de una manera condicional, en donde la expresión condicional se induce al roedor mediante la administración de un compuesto de interés.

15 En el presente documento también se describen locus *Acvr1* que comprenden una modificación que comprende un exón mutante condicional, en donde el exón mutante condicional se expresa después de una inducción inducida experimentalmente.

20 En un aspecto, se describe un locus *Acvr1* modificado por ingeniería genética, que comprende un exón mutante en orientación antisentido, flanqueado cadena arriba y cadena abajo por los SRRS. En un caso, el locus está presente en un animal no humano que comprende además un gen de recombinasa inducible que reconoce los SRRS que flanquean al exón mutante.

25 Se proporciona un roedor, como se expone en las reivindicaciones, que comprende un locus *Acvr1* modificado que comprende un exón mutante en orientación antisentido, en donde el exón mutante está flanqueado cadena arriba y cadena abajo por SRRS, que está orientado a dirigir una inversión cuando actúa mediante una recombinasa que reconoce los SRRS. En una realización, el exón mutante tras la inversión reemplaza al exón de tipo silvestre correspondiente del locus *Acvr1*. En una realización, el roedor comprende además un gen de recombinasa inducible, en donde la recombinasa del gen de recombinasa inducible reconoce los SRRS. En una realización específica, los SRRS son sitios lox o variantes de los mismos, la recombinasa es Cre, y la recombinasa es inducible por tamoxifeno. En una realización específica, la recombinasa es una Cre-ER^{T2}. En una realización, el roedor es un ratón o una rata. En una realización específica, el roedor es una rata

35 En un aspecto, se proporciona un ratón modificado por ingeniería genética que comprende una construcción de ácido nucleico que comprende un exón 5 (e5) mutante que codifica una mutación R206H, en donde el e5 mutante está presente en orientación antisentido y está flanqueado cadena arriba y cadena abajo por SRRS orientados a dirigir una inversión del mutante e5; y el ratón comprende un gen de recombinasa inducible que codifica una recombinasa que es capaz de invertir la orientación antisentido del exón e5 mutante en orientación en sentido.

40 En un aspecto, se proporciona un ratón modificado por ingeniería genética que comprende una construcción de ácido nucleico en un locus *Acvr1* en la línea germinal del ratón, en donde la construcción de ácido nucleico comprende, con respecto a la dirección de transcripción del gen *Acvr1*, una construcción que comprende un gen e5 de tipo silvestre en orientación en sentido y un alelo e5 mutante en orientación antisentido, en donde cadena arriba del alelo e5 del tipo silvestre, está un primer SRRS (SRRS1) que es compatible con un segundo SRRS (SRRS2) situado justo cadena abajo (con respecto a la dirección transcripcional del gen *Acvr1*) del e5 mutante antisentido, en donde SRRS1 y SRRS2 están orientados para dirigir una inversión. La construcción comprende además un tercer SRRS (SRRS3) dispuesto entre el e5 de tipo silvestre y el e5 antisentido mutante, y la construcción comprende además un cuarto SRRS (SRRS4) que es compatible con SRRS3, y que está situado cadena abajo (con respecto a la dirección de orientación del gen *Acvr1*) de SRRS2, en donde SRRS3 y SRRS4 están orientados para dirigir una inversión. Cada SRRS (1-4) es reconocido por la misma recombinasa inducible.

En una realización la recombinasa inducible está en la línea germinal del ratón.

En una realización, los sitios SRRS son reconocibles por una recombinasa Cre.

55 En una realización, SRRS1 y SRRS2 son sitios lox2372; SRRS3 y SRRS4 son sitios loxP y la recombinasa inducible es una CreER^{T2} (véase, por ejemplo, la FIG. 1).

60 En una realización, SRRS1 y SRRS2 son sitios loxP; SRRS3 y SRRS4 son sitios lox2372 y la recombinasa inducible es una CreER^{T2} (véase por ejemplo la FIG. 1).

En una realización, la CreER^{T2} está presente en el locus *ROSA26* (por ejemplo, *Gt(ROSA26)Sor^{CreERT2/+}*).

65 En un aspecto, se proporciona un ratón modificado por ingeniería genética que comprende el genotipo *Acvr1^{[R206H]COIN/+}; Gt(ROSA26)Sor^{CreERT2/+}*.

- 5 En un aspecto, se proporciona un roedor modificado por ingeniería genética que expresa un exón 5 normal en el locus *Acvr1* en el útero y perinatalmente, en donde tras el tratamiento de los roedores modificados por ingeniería genética con una recombinasa, el ratón expresa una proteína codificada por *Acvr1* que comprende una mutación codificada por el exón 5. En una realización, la mutación es una mutación del exón 5 que codifica una mutación R206H.
- 10 En un aspecto, se proporciona un roedor adulto que expresa un producto génico *Acvr1* mutante caracterizado por una modificación R206H, en donde al menos el 99 % de las células del ratón comprende un gen *Acvr1* mutante que codifica la modificación R206H.
- 15 En un aspecto, se proporciona un roedor modificado por ingeniería genética que comprende un producto génico *Acvr1* mutante caracterizado por una modificación R206H, en donde el gen *Acvr1* mutante está presente en al menos 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % o más de las células del roedor modificado por ingeniería genética.
- 20 En un aspecto, se proporciona un roedor modificado por ingeniería genética, en donde el roedor comprende un locus *Acvr1* en su línea germinal que, tras la exposición a una recombinasa, expresa una proteína codificada por el locus *Acvr1* que comprende una modificación R206H.
- 25 En un aspecto, se proporciona un roedor que expresa una proteína mutante que comprende una mutación R206H, en donde el ratón es un ratón no quimérico. En una realización, el grado de quimerismo del roedor no es mayor del 1 %.
- 30 En un aspecto, se proporciona un ratón que expresa una proteína mutante de un locus *Acvr1* modificado en la línea germinal del ratón, en donde todas las células del ratón que expresan *Acvr1* ratón comprenden un gen *Acvr1* modificado que codifica una proteína *Acvr1* que comprende una modificación R206H. En una realización, todas las células germinales del ratón comprenden un locus *Acvr1* modificado que comprende una modificación genética condicional que codifica una proteína *Acvr1* con una modificación R206H.
- 35 En un aspecto, se proporciona un ratón modificado por ingeniería genética que comprende un alelo *Acvr1*^{[R206H]COIN} modificado genéticamente, en donde el primer codón del exón 5 de *ACVR1* humano (isoforma 003) se modifica para codificar E (ácido glutámico), en donde a nivel de proteína, el exón humanizado es idéntico al exón 5 de *Acvr1* de ratón de tipo silvestre (isoforma 001).
- 40 En un aspecto, se proporciona un ratón que comprende una modificación genética condicional de un gen *Acvr1*, en donde la modificación cambia un aminoácido en una hélice α de *ACVR1* que comprende los aminoácidos 198-206 de *ACVR1* y da como resultado una activación constitutiva de la proteína codificada por el locus *Acvr1*.
- 45 En una realización, la modificación genética condicional está en un aminoácido seleccionado de los aminoácidos 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206 y una combinación de los mismos. En una realización específica, el aminoácido es el 206, y la modificación es un cambio de nucleótido que forma un codón para histidina.
- 50 En una realización, el ratón es heterocigoto para la modificación genética condicional. En una realización, el ratón es homocigoto para la modificación genética condicional.
- 55 En diversos aspectos de la divulgación, el animal no humano es un mamífero. En un caso, el mamífero es un roedor. En un caso, el roedor se selecciona del grupo que consiste en un ratón, una rata y un hámster. En un caso, el roedor es un ratón. El animal no humano de la presente invención es un roedor, por ejemplo, un ratón, una rata o un hámster.
- 60 La presente invención proporciona un roedor modificado por ingeniería genética como se expone en las reivindicaciones, que comprende una serie de SRRS que están dispuestos para dirigir una delección de un exón 5 de *Acvr1* de tipo silvestre y colocar un exón 5 mutante desde una orientación antisentido a una orientación en sentido.
- 65 En diversos aspectos, el roedor modificado por ingeniería genética comprende además una recombinasa inducible que actúa sobre una construcción de ácido nucleico en el locus *Acvr1* para deleccionar el exón de tipo silvestre y reemplazarlo por el exón mutante. En una realización la recombinasa inducible es CreERT².
- En diversos aspectos, los roedores modificados por ingeniería genética, tras la expresión del alelo de *Acvr1* mutante, son capaces de expresar el alelo alternativo (de tipo silvestre).
- En diversos aspectos, el roedor modificado por ingeniería genética que expresa el alelo de *Acvr1* mutante es un modelo para un trastorno de osificación ectópica. En una realización, el trastorno de osificación ectópica es fibrodysplasia osificante progresiva (FOP).
- En diversos aspectos, se proporcionan roedores modificados por ingeniería genética que expresan condicionalmente un alelo de *Acvr1* mutante que comprende un exón 5 mutante (por ejemplo, que expresa una proteína que

comprende una mutación R206H) tras la exposición a tamoxifeno, en donde los roedores comprenden una recombinasa inducible por tamoxifeno que convierte un exón 5 de tipo silvestre en un exón 5 mutante dentro del gen *Acvr1*.

5 **Breve descripción de los dibujos**

La FIG. 1 ilustra el diseño de un alelo condicional en un locus *Acvr1* que convierte, por ejemplo, un exón 5 de *Acvr1* de ratón en un exón R206H humano usando los sitios loxp y lox2372.

10 La FIG. 2 ilustra el diseño de un alelo condicional del gen del receptor mutante de FOP clásico *Acvr1 R206H* clásico. El exón 5 de ratón (e5 en la isoforma 001) se reemplaza por el exón 5 humano (en la isoforma 003 de ACVR1 humano); un exón mutante de ratón se introduce simultáneamente en la cadena antisentido junto con un casete de selección (hUB-Neo) flanqueado por FRT (*FRT'ed*); el e5 humano está flanqueado con los sitios loxP y lox2372 orientados a la derecha, y otros sitios loxP y lox2372 se colocan cadena abajo del e5(R206H) de ratón y la delección del e5 humano, tras la exposición a Cre, es como se detalla esquemáticamente en la FIG.1.

15 La FIG. 3 ilustra la activación del alelo *Acvr1^{R206H}COIN* que da como resultado un fenotipo similar a FOP en ratones modificados por ingeniería genética con el alelo condicional.

La FIG. 4 ilustra la formación de hueso ectópico en ratones modificados por ingeniería genética que comprenden el alelo condicional inducido en ratones a los que se administra tamoxifeno; en el panel de la derecha se indica con flechas blancas un ejemplo de formación de hueso ectópico en el esternón. En ausencia de tamoxifeno (panel de la izquierda), no se detecta formación de hueso ectópico.

20 La FIG. 5 proporciona otra ilustración de formación de hueso ectópico en ratones modificados por ingeniería genética que comprenden el alelo condicional inducido en ratones a los que se administra tamoxifeno; en el panel de la derecha se indica con flechas blancas un ejemplo de formación de hueso ectópico en el esternón. En ausencia de tamoxifeno (panel de la izquierda), no se detecta la formación de hueso ectópico.

25 La FIG. 6 proporciona otra ilustración más de formación de hueso ectópico en ratones modificados por ingeniería genética que comprenden el alelo condicional inducido en ratones a los que se administra tamoxifeno; en el panel de la derecha se indica con flechas blancas un ejemplo de formación de hueso ectópico en el esternón. En ausencia de tamoxifeno (panel de la izquierda), no se detecta la formación de hueso ectópico.

30 La FIG. 7 ilustra ratones de control (paneles de la izquierda, ID 840095); y formación de hueso ectópico en ratones modificados por ingeniería genética que comprenden el alelo condicional inducido en ratones a los que administra tamoxifeno (tamoxifeno n°. 2, ID: 845202); el panel superior de la derecha muestra la formación de hueso ectópico en las esterneras; el panel inferior de la derecha muestra la formación de hueso ectópico en la articulación coxofemoral y en las vértebras caudales.

35 La FIG. 8 ilustra la formación de hueso ectópico en las esterneras (panel de la izquierda) y en las vértebras caudales (panel de la derecha) de ratones modificados por ingeniería genética que comprenden el alelo condicional inducido en ratones a los que se administra tamoxifeno (tamoxifeno n°. 3, ID: 915546).

La FIG. 9 ilustra la ausencia de formación de hueso ectópico en ratones modificados por ingeniería genética que comprenden el alelo condicional inducido con tamoxifeno (tamoxifeno n°. 4, ID: 904067).

40 La FIG. 10 ilustra la formación de hueso ectópico en las esterneras (panel de la izquierda) en ratones modificados por ingeniería genética que comprenden el alelo condicional inducido por la administración de tamoxifeno (tamoxifeno n°. 5, ID: 840098).

La FIG. 11 ilustra la formación de hueso ectópico en las esterneras (panel de la izquierda) y en la articulación de la rodilla (panel de la derecha) en ratones modificados por ingeniería genética que comprenden el alelo condicional inducido por la administración de tamoxifeno (tamoxifeno n°. 6, ID: 863713).

45 La FIG. 12 ilustra cebadores y sondas que se utilizan en un ensayo de pérdida de alelos para el genotipado de ratones modificados por ingeniería genética que comprenden la mutación condicional en el gen *Acvr1*; las SEQ ID NO son, de arriba a abajo: para el cebador directo, de arriba a abajo, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2; para el cebador inverso, de arriba a abajo, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4; para la sonda SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6.

50 **Descripción detallada**

La fibrodiasplasia osificante progresiva (FOP) es un trastorno autosómico dominante de formación de hueso ectópico. Estudios de parentesco en familias afectadas revelan que el gen FOP se localiza en el mapa del cromosoma 2q23-24 donde se encontró una mutación de 617G por A (R206 a H) en el dominio de activación del gen del receptor de activina A de tipo I (*Acvr1*) en todos los individuos afectados examinados en los estudios (Shore *et al.*, (2006) A recurrent mutation in the BMP type I receptor *Acvr1* causes inherited and sporadic fibrodiasplasia ossificans progressiva, Nat. Genet. 38:525-527), en consonancia con FOP ocasionada por la activación constitutiva de *Acvr1* (*Id.*).

60 Se proporcionan ratones modificados por ingeniería genética tal como se expone en las reivindicaciones, que después de exponerse a una recombinasa, expresan una proteína *Acvr1* que comprende una modificación que da como resultado un trastorno caracterizado por la formación de hueso ectópico, por ejemplo, FOP. Los ratones que expresan la proteína *Acvr1* modificada incluyen ratones que no son quiméricos, por ejemplo, ratones cuyos genomas llevan una modificación (condicional) de la proteína *Acvr1* que da como resultado la formación de hueso ectópico en un ratón que expresa la proteína *Acvr1* modificada.

Determinadas mutaciones en la proteína *Acvr1*, por ejemplo, la mutación R206H asociada a FOP, son difíciles, si no imposibles, de crear en la línea germinal de ratones debido a la mortalidad embrionaria o perinatal asociada a la mutación. Se proporcionan ratones modificados por ingeniería genética que comprenden un diseño COIN que proporciona una inversión condicional y delección de un exón de tipo silvestre y el reemplazo del exón de tipo silvestre por un exón mutante. Este diseño COIN permite la formación de un alelo condicional colocando una secuencia de ácido nucleico que codifica un exón mutante invertido que se colocará junto a un exón de tipo silvestre que se va a deleccionar. A través de la selección de sitios de reconocimiento de recombinasas (SRR), el exón mutante invertido se invierte para colocarlo en el marco de lectura, mientras que el exón de tipo silvestre se delecciona. Esta estrategia COIN se basa en la colocación de SRR incompatibles (por ejemplo, lox2372 y loxp) que rodean los exones de tipo silvestre y mutante. Por lo tanto, esta estrategia COIN no permite la expresión de la mutación letal (perinatal/embrionaria) a menos que se actúe sobre el alelo COIN mediante la(s) recombinasa(s) seleccionada(s). Otra ventaja de esta estrategia COIN es la retirada permanente del exón de tipo silvestre tras la exposición a la recombinasa seleccionada, y por lo tanto, no queda ninguna repetición invertida en el genoma después de la inversión. Esto es ventajoso porque elimina la posibilidad de que se produzca una reinversión, ya que los sitios de recombinasa restantes son incompatibles (por ejemplo, lox2372 y loxP). En este caso, la humanización del exón de tipo silvestre de ratón también minimiza la secuencia de repetición invertida, facilitando así las etapas de clonación y atenuando las cuestiones de reordenamientos durante y después del direccionamiento.

Si un ratón portador del alelo COIN se cruza con un ratón que contiene recombinasa, la mutación letal (perinatal/embrionaria) se expresará en la descendencia en el útero, confundiendo así el objetivo de producir un animal que pueda estudiarse y que exprese el alelo. Por lo tanto, el ratón portador del alelo COIN no se cruza con un ratón que contiene una recombinasa no regulada. En cambio, el ratón se cruza con un ratón que contiene una proteína Cre-ER que esta modificada con mutaciones T2 (un ratón Cre-ER^{T2}), o modificada para que contenga un alelo Cre-ER^{T2}. La proteína Cre-ER^{T2} es una proteína Cre modificada con una secuencia receptora de estrógenos que comprende mutaciones T2 que vuelven inactiva a la proteína Cre (véase, Indra, A. *et al.* (1999) Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER^T and Cre-ER^{T2} recombinases, *Nucleic Acids Res.* 27(22): 4324-4327; Feil, R. *et al.* (1997) Regulation of Cre Recombinase Activity by Mutated Estrogen Receptor Ligand-Binding Domains, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237: 752-757; Patente de Estados Unidos nº. 7.112.715). Un ratón que comprende un alelo condicional construido con SRR sensibles a Cre, como se describe en el presente documento, y que contiene un alelo Cre-ER^{T2}, expresaría por lo tanto el alelo de tipo silvestre a menos y hasta que el ratón fuera expuesto a tamoxifeno para inducir actividad Cre. De esta forma, se construyen ratones que contienen un alelo de *Acvr1* mutante en su línea germinal pero que no expresan una proteína *Acvr1* mutante a menos que y hasta que los ratones fueran expuestos a tamoxifeno. Después de la exposición a tamoxifeno, la proteína de fusión Cre-ER^{T2} se activa y el alelo condicional se convierte en un alelo mutante y, en diversas realizaciones, la conversión al alelo mutante es irreversible, con delección del alelo de tipo silvestre. De esta manera, una línea de ratón que contiene una mutación *Acvr1* que de otro modo sería letal puede mantenerse esencialmente por tiempo indefinido, produciendo la lesión genética deseada y el fenotipo acompañante cuando se desee. En diversas realizaciones, un ratón modificado por ingeniería genética que comprende el alelo COIN *Acvr1* se construye modificando una célula madre embrionaria, ME, de ratón para que contenga el alelo COIN, y modifique la misma célula ME para que contenga un gen que codifique la recombinasa Cre-ER^T o Cre-ER^{T2} inducible por tamoxifeno, y usando la célula ME como célula donadora para producir un ratón que contenga el alelo COIN y el gen Cre modificado.

Modificación genética de un alelo de *Acvr1* condicional que es transmisible a la línea germinal

Con el fin de modificar genéticamente un modelo de ratón de Fibrodisplasia Osificante Progresiva (FOP), la mutación R206H "FOP clásica" de *Acvr1* humano (Shore *et al.* (2006)) se modificó genéticamente en el gen de ratón correspondiente, *Acvr1*. Esta mutación ya se ha modelado de manera no condicional en el ratón, pero los ratones quiméricos resultantes (que surgen de la microinyección de blastocitos de las células ME dirigidas) no pudieron transmitir la mutación a través de la línea germinal, posiblemente debido a la letalidad embrionaria o perinatal (Chakkalakal, S. A. *et al.* (2012) An *Acvr1* R206H knock-in mouse had fibrodysplasia ossificans progressiva, *J. Bone and Mineral Res.* 27: 1746-1756). Antes del conocimiento de este fenotipo, y basándose en el fenotipo de ratones homocigotos nulos *Acvr1*, que revela un profundo papel de *Acvr1* durante el desarrollo (Mishina *et al.* (1999) Multiple roles for activin-like kinase-2 signaling during mouse embryogenesis, *Dev. Biol.* 212: 314-326) se decidió modificar genéticamente la mutación *Acvr1*^[R206H] de manera condicional en el ratón, utilizando una variación en los métodos FIEEx (Schnutgen, F. *et al.* (2003) A directional strategy for monitoring Cre-mediated recombination at the cellular level in the mouse, *Nat. Biotech.* 21: 562-565) y COIN (Patente de Estados Unidos n. ° 7.205.148).

FIEEx emplea un par de sitios Lox mutantes, conocidos como matriz FIEEx, que son reconocidos por la misma recombinasa Cre pero que no reaccionan entre sí, y se presentan en una configuración A-B/[AB], en donde la "[A-B]" está en la cadena opuesta con respecto a la "A-B", para permitir la inversión de la secuencia de ADN flanqueada por las matrices. En esta realización publicada, FIEEx utilizó los sitios LoxP y Lox511. Sin embargo, es menos conocido que en presencia de Cre se produce un bajo nivel de recombinación entre LoxP y Lox511. Por lo tanto, se ensayaron diferentes combinaciones de variantes de sitios Lox, y la combinación LoxP-Lox2372 se seleccionó para el alelo condicional descrito en este documento, debido a que estos dos sitios no mostraron ninguna reactividad cruzada. Una característica adicional de la matriz FieX es que la secuencia que está contenida dentro de cada matriz, es

decir, entre los sitios LoxP-Lox2372 de cada matriz, se eliminará después de la actuación de Cre. La modificación genética del alelo de la invención (alelo *Acvr1*^{[R206H]COIN}) tiene en cuenta estas dos propiedades de FIEEx. En la FIG.2 se muestra una realización de un alelo condicional.

5 El *Acvr1* de ratón muestra una diversidad de variantes de corte y empalme (por ejemplo, 201, 202, 001, 003, 004). El exón 5, que está mutado en FOP, lo comparten todas las variantes de corte y empalme de *Acvr1* que codifican la proteína. En una realización, el ratón modificado por ingeniería genética comprende una modificación del exón 5 de una isoforma seleccionada del grupo que consiste en 201, 202, 001, 003 y 004.

10 El alelo *Acvr1*^{[R206H]COIN} se modificó genéticamente colocando la versión mutante del exón codificante de R206 de *Acvr1* de ratón (ENSMUSE00001021301) en la cadena antisentido, de modo que no se incorpora en el transcrito de *Acvr1*. Como la secuencia codificada por el exón 5 es necesaria para la función de *Acvr1*, esto requirió que en el diseño también se incorporase un exón codificante de la secuencia del exón 5 de tipo silvestre (el exón 5 lo comparten todas las variantes de corte y empalme de *Acvr1* que codifican la proteína). Además, dado que los exones no se reconocen como tales sin secuencias intrónicas accesorias, tanto cadena arriba como cadena abajo del exón, tenían que incorporarse en el exón que codifica R206 tanto mutante como de tipo silvestre. Sin embargo, hacer esto generaría una gran repetición invertida, y dichas estructuras de ADN son intrínsecamente propensas a la recombinación tanto durante las etapas de modificación por ingeniería genética necesarias para construir el vector de direccionamiento como también después del direccionamiento, *in vivo* (Holkers, M. *et al.* (2012). Nonspaced inverted DNA repeats are potential targets for homology-directed gene repair in mammalian cells, *Nucleic Acids Res.* 40:1984-1999). Además, si la secuencia de ratón de tipo silvestre del exón que codifica R206 y la secuencia intrónica cadena arriba y cadena abajo asociada con este se conservan intactas, y preceden al exón mutante, entonces esta región de tipo silvestre podría actuar como un brazo de homología y utilizarse durante el direccionamiento en las células ME de ratón, lo que da como resultado la exclusión del exón mutado del alelo diana. Por tanto, para abordar todos estos problemas, se diseñó el alelo *Acvr1*^{[R206H]COIN} de tal manera que:

(a) Se impide que se produzca una gran repetición invertida. Para realizar esto, el exón que codifica R206 (ENSMUSE00001021301) así como las secuencias intrónicas cadena arriba y cadena abajo asociadas, se reemplazaron por la región correspondiente de *ACVR1* humano.

(b) La secuencia de ratón de tipo silvestre del exón que codifica R206 (ENSMUSE00001021301) se preserva al nivel de proteína. Dado que la secuencia de proteína humana y de ratón codificada respectivamente por los exones ENSMUSE00001021301 y ENSE00001009618 difiere en un aminoácido, la secuencia humana del exón ENSE00001009618 se alteró para emparejarse con la secuencia proteica de ratón del exón ENSMUSE00001021301.

(c) La secuencia humana introducida se retiró por completo tras actuar con Cre. Por lo tanto, en el estado "condicional-activado"- en el que se transcribe el gen mutante *Acvr1*^[R206H] - no quedan secuencias humanas y, por lo tanto, cualquier fenotipo resultante no puede atribuirse a la presencia de una secuencia extraña.

Más específicamente, la región delimitada por los nucleótidos 58474046 a 58474368 en *mmuAcvr1* (es decir, los nucleótidos 58474046 a 58474368 del cromosoma 2 de ratón), se reemplazó por los nucleótidos 15863048 a 158630803 de *hsaACVR1* (es decir, los nucleótidos 15863048 a 158630803 del cromosoma 2 humano) de tal manera que la secuencia introducida, que incluye el exón *hsaACVR1* ENSE00001009618, se transcribe como parte del locus *Acvr1*^{[R206H]COIN} resultante modificado. Además, la secuencia codificante del primer aminoácido del exón humano ENSE00001009618 se reemplazó de ácido aspártico (D) a ácido glutámico (E) para corresponder al nivel de proteína con exactamente la misma secuencia de proteína que la codificada por el exón ENSMUSE00001021301 de ratón. (Esta secuencia humana introducida se denomina en lo sucesivo en este documento *hsa_e5+*). Por lo tanto, antes de la inversión del elemento COIN (exón ENSMUSE00001021301 mutado y secuencias intrónicas cadena arriba y cadena abajo asociadas, véase más adelante), el locus resultante, *Acvr1*^{[R206H]COIN}, debería funcionar como un locus de tipo silvestre.

La mutación R206H se modeló a través de mutación del exón ENSMUSE00001021301 en la posición correspondiente, alterando el codón definido por los nucleótidos 5847419 a 58474200 de CGC (que codifica la arginina) a CAC (que codifica la histidina). El exón mutante resultante, junto con secuencias intrónicas flanqueantes cadena arriba y cadena abajo, se colocaron en 3' en la secuencia *hsa_e5+* y en la cadena antisentido de *mmuAcvr1*, reemplazando los nucleótidos 58473775 a 58473879 de *mmuAcvr1* para producir también una pequeña delección y dar cabida a sondas LOA (Gomez-Rodriguez, J. *et al.* (2008) Advantages of q-PCR as a method of screening for gene targeting in mammalian cells using conventional and whole BAC-based constructs, *Nucleic Acids Res.* 36: e117; Valenzuela, D. *et al.* (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, *Nat. Biotech.* 21: 652-659). (Esta secuencia de ratón mutada introducida se denomina en lo sucesivo en el presente documento *mmu_e5R206H+*).

Para permitir la inversión dependiente de Cre de la secuencia *mmu_e5R206H+* y la delección simultánea de *hsa_e5+*, se usó una combinación de matrices Lox similares a FIEEx de tal manera que:

(a) la secuencia hsa_e5+ está precedida por un sitio LoxP y seguida por un sitio Lox2372. A este respecto, hsa_e5+ está contenida con la matriz 5' LoxP-Lox2372 similar a FIEx.

(b) la secuencia mmu_e5R206H+ está seguida por la matriz 3' LoxP-Lox2372 similar a FIEx, pero esta matriz está modificada genéticamente de tal manera que está en una configuración de imagen especular con respecto a la matriz 5' LoxP-Lox2372 similar a FIEx. Esto permite la inversión permanente de mmu_e5R206H+ en la cadena en sentido mediante Cre.

Cuando el alelo *Acvr1^{[R206H]COIN}* resultante se expone a Cre, la secuencia hsa_e5+ se deletionará y la mmu_e5R206H+ se invertirá en la cadena en sentido. Como resultado, se expresará *Acvr1^[R206H]* en lugar de *Acvr1*.

Los ratones modificados por ingeniería genética eran genotipos que empleaban un ensayo de pérdida de alelos (véase, por ejemplo, Valenzuela *et al.*, (2003), citados anteriormente). Los cebadores y sondas eran los que se muestra en la FIG. 12 (Tabla 5).

15 Fenotipo de ratones *Acvr1^{R206HCOIN/+}*

Los ratones *Acvr1^{R206HCOIN/+}* son fenotípicamente normales pero desarrollan FOP después de la activación de la mutación condicional R206H.

Basándose en los resultados publicados con un ratón quimérico de activación *Acvr1* R206H sencilla, no condicional (Chakkalal *et al.*, 2012), así como en el hecho de que la FOP es un trastorno autosómico dominante (para una revisión véase (Pignolo *et al.*, 2011)), se formuló la hipótesis de que:

(a) A diferencia del alelo *Acvr1^{R206H}* no condicional (Chakkalal *et al.*, 2012), las células ME dirigidas a *Acvr1^{[R206H]COIN}* producirán VELOCIMICE®, es decir, ratones F0 que proceden completamente de las células ME dirigidas (Poueymirou *et al.* (2007) F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses, *Nat. Biotech.*, 25: 91-99).

(b) A diferencia de los ratones quiméricos *Acvr1^{R206H/+}* no condicionales (Chakkalal *et al.*, 2012), los ratones F0 *Acvr1^{[R206H]COIN/+}* serán fenotípicamente normales y transmitirán el alelo *Acvr1^{[R206H]COIN}* a la siguiente generación.

(c) Después de la inversión del exón mutante portador de la mutación R206H en la cadena con sentido, una acción mediada por las células con recombinasa Cre, que se han convertido al genotipo *Acvr1^{[R206H]INV/+}*, expresará también el alelo *Acvr1^[R206H]* mutante así como el alelo de tipo silvestre, reflejando la situación en pacientes con FOP. En la misma línea, los ratones *Acvr1^{[R206H]INV/+}* resultantes deberían desarrollar con el tiempo síntomas similares a FOP.

Todas estas hipótesis se confirmaron. Por ejemplo, el clon de células ME 1649C-A2 dio lugar a 16 VELOCIMICE® de 19 ratones generados usando este clon (Tabla 1).

Tabla 1. Las células ME *Acvr1^{[R206H]COIN/+}* dan lugar principalmente a ratones macho F0 que proceden completamente de células ME Donadoras

ID de Ratón	Quimerismo (%)
1649C-A2/758470	100
1649C-A2/758471	100
1649C-A2/758472	100
1649C-A2/758473	100
1649C-A2/758474	100
1649C-A2/758475	100
1649C-A2/758476	100
1649C-A2/758477	100
1649C-A2/758478	100
1649C-A2/758479	100
1649C-A2/758480	100
1649C-A2/758481	100
1649C-A2/758482	100
1649C-A2/758483	100
1649C-A2/758484	100
1649C-A2/758485	100
1649C-A2/758486	80
1649C-A2/758487	70
1649C-A2/758488	30

Además, estos ratones no tenían ningún fenotipo discernible y fueron capaces de reproducir y engendrar ratones de generación F1 *Acvr1^{[R206H]COIN/+}* (Tabla 2).

Nombre del Clon/ID	Genotipo	Género
1649C-A2/2251A-C6/840095	1649 Het 2251 Het	M
1649C-A2/2251A-C6/840098	1649 Het 2251 Het	M
1649C-A2/2251A-C6/845202	1649 Het 2251 Het	M
1649C-A2/2251A-C6/845203	1649 Het 2251 Het	H
1649C-A2/2251A-C6/845204	1649 Het 2251 Het	H
1649C-A2/2251A-C6/845205	1649 Het 2251 WT	H
1649C-A2/2251A-C6/845809	1649 Het 2251 WT	H
1649C-A2/2251A-C6/863706	1649 Het 2251 WT	H
1649C-A2/2251A-C6/863707	1649 Het 2251 WT	H
1649C-A2/2251A-C6/863713	1649 Het 2251 Het	M
1649C-A2/2251A-C6/863714	1649 Het 2251 WT	M
1649C-A2/2251A-C6/897113	1649 Het 2251 WT	H
1649C-A2/2251A-C6/897115	1649 Het 2251 WT	H
1649C-A2/2251A-C6/897117	1649 Het 2251 Het	H
1649C-A2/2251A-C6/904065	1649 Het 2251 WT	M
1649C-A2/2251A-C6/904067	1649 Het 2251 Het	M
1649C-A2/2251A-C6/904069	1649 Het 2251 WT	H
1649C-A2/2251A-C6/904783	1649 Het 2251 WT	M
1649C-A2/2251A-C6/904785	1649 Het 2251 WT	H
1649C-A2/2251A-C6/907167	1649 Het 2251 WT	H
1649C-A2/2251A-C6/915545	1649 Het 2251 WT	M
1649C-A2/2251A-C6/915546	1649 Het 2251 Het	M
1649C-A2/2251A-C6/964988	1649 Het 2251 Het	H
1649C-A2/2251A-C6/964989	1649 Het 2251 Het	H

Generación F1 $Acvr1^{[R206H]COIN+}$; ratones $Gt(ROSA26)Sor^{CreERT2/+}$ nacidos de padres F0 $Acvr1^{[R206H]COIN+}$

Desde un punto de vista fenotípico, los ratones $Acvr1^{[R206H]COIN+}$ parecen normales y no muestran fenotipos discernibles. Lo mismo se aplica a ratones $Acvr1^{[R206H]COIN+}; Gt(ROSA26)Sor^{CreERT2/+}$, que además del alelo $Acvr1^{[R206H]COIN}$ también llevan un transgén CreERT² genosustituido en el locus $Gt(ROSA26)Sor$. Esto permite la expresión ubicua de una versión inactiva de Cre, una que depende del tamoxifeno para la activación (Feil *et al.* (1997) Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237: 752-757). Esto permite la activación de Cre en un punto específico en el tiempo, y por lo tanto, no solo permite evitar la letalidad embrionaria experimentada con la genosustitución de $Acvr1^{[R206H]}$ convencional, sino que también permite al investigador elegir el momento de la activación de la expresión de $Acvr1^{[R206H]}$ en los ratones correspondientes.

Para investigar si los ratones $Acvr1^{[R206H]COIN+}; Gt(ROSA26)Sor^{CreERT2/+}$ desarrollan FOP después de la exposición a tamoxifeno, se generó una pequeña cohorte y se trató con tamoxifeno comenzando aproximadamente cuando los ratones tenían un año (Tabla 3); cabe destacar que a esta edad los ratones han completado su desarrollo, y por lo tanto, no existen mecanismos de modelado o relacionados con el desarrollo que estén en juego, y por lo tanto no pueden contribuir al proceso patológico. La administración de tamoxifeno se realizó por inyección en el peritoneo utilizando una solución de 10 mg/ml en aceite de maíz. Las inyecciones se realizaron diariamente durante 8 días. En tres ratones (Ratones 1, 2 y 3 de la Tabla 3) se reseco una pequeña porción de músculo para inducir una lesión.

Tabla 3. Protocolo para la Activación Dependiente de Tamoxifeno Mediada por Cre del Alelo $Acvr1^{[R206H]COIN}$ en Ratones $Acvr1^{[R206H]COIN+}; Gt(ROSA26)CreERT2/+$

Ratón	ID de Ratón	Inyección Diaria	Día de Inicio	Edad al Inicio (años)	Día de Finalización	Día del Sacrificio	Edad del Sacrificio (años)
1	840095	aceite de maíz	1	0,9	8	143	1,3
2	845202	TAM*	1	0,9	8	143	1,3
3	915546	TAM	1	0,56	8	143	1,0
4	904067	TAM	1	0,61	8	143	1,0
5	840098	TAM	1	0,90	8	143	1,3
6	863713	TAM	1	0,80	8	143	1,2

TAM: tamoxifeno

Todos los ratones menos uno, tratados con tamoxifeno, desarrollaron osificación ectópica, reflejando lo que se había observado en FOP (Tabla 4). Aunque el tipo (o los tipos) de célula específica que puede estar contribuyendo al

proceso de la enfermedad no se determinó en este experimento debido a que la expresión de CreER¹² es ubicua (una propiedad conferida por el hecho de que se expresa desde el locus *Gt(ROSA26)Sor*), uno de los aspectos importantes de este trabajo es que elimina los aspectos de desarrollo de FOP (que no son los más importantes para la patología de FOP, ya que no contribuyen a la pérdida devastadora en la calidad de vida que experimentan los pacientes con FOP), y muestra que la formación de hueso ectópico, que es el principal sello posnatal de la patología FOP, es independiente de los procesos de desarrollo.

Tabla 4. Cuatro Ratones *Acvr1*^{[R206H]COIN⁺}; *Gt(ROSA26)*^{CreER¹²+} Expuestos a Tamoxifeno Desarrollaron Patología Esquelética Similar a FOP

Ratón	ID de Ratón	Formación de Hueso Ectópico
1	840095	Ninguna*
2	845202	esternebras, articulación coxofemoral, vértebras caudales
3	915546	esternebras, articulación coxofemoral, vértebras caudales
4	904067	ninguno
5	840098	esternebras
6	863713	esternebras, articulación de la rodilla

* Tratados solo con aceite de maíz (vehículo), y no con tamoxifeno

La osificación ectópica se muestra en imágenes de ratones modificados por ingeniería genética, como se describe en el presente documento, expuestos a tamoxifeno (que presentan osificación ectópica). Los ratones que están modificados por ingeniería genética, como se describe en el presente documento, pero que no están expuestos a tamoxifeno, no muestran osificación ectópica. Véase, por ejemplo, la FIG. 3, FIG. 4, FIG. 5, FIG. 6, FIG. 7, FIG. 8, FIG. 10 y FIG. 11. La osificación ectópica quedo demostrada en diversas zonas del cuerpo. Como se muestra en la FIG. 9, un ratón no mostró formación de hueso ectópico aparente.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Economides, Aris N.
Hatsell, Sarah Jane

<120> ROEDORES CON ALELOS MUTANTES DE *ACVR1* CONDICIONALES

<130> 057766/439616

<150> 61/778.814
<151> 13-03-2013

<160> 6

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada

<400> 1
ggctgactga tctgaaggaa atgg 24

<210> 2
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintetizada

<400> 2

ES 2 809 774 T3

	tgaaggaaat gggcttctgg atag	24
5	<210> 3 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sintetizada	
	<400> 3 agaggaagga gacgctaaga atc	23
15	<210> 4 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Sintetizada	
	<400> 4 catactcact ctctctgta gagga	25
25	<210> 5 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Sintetizada	
35	<400> 5 tctggatagt aaggtcagtt gctgcg	26
40	<210> 6 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Sintetizada	
	<400> 6 aaggtcagtt gctgcttccc	23

REIVINDICACIONES

1. Una construcción de ácido nucleico que comprende:

- 5 (i) un exón 5 de *Acvr1* que codifica una secuencia de tipo silvestre a nivel de proteína, flanqueado cadena arriba y cadena abajo por un primer par de sitios de reconocimiento de recombinasas específicas de sitio; y
(ii) un exón 5 mutante de un gen *Acvr1* en orientación antisentido flanqueado cadena arriba y cadena abajo por un segundo par de sitios de reconocimiento de recombinasas específicas de sitio que son diferentes del primer par de sitios de reconocimiento de recombinasas específicas de sitio e incompatibles con el mismo,

10 en donde el primer y segundo pares de sitios de reconocimiento de recombinasas específicas de sitio están orientados de manera que una recombinasa puede invertir el exón 5 mutante en orientación sentido, y delecionar el exón 5 de *Acvr1* que codifica la secuencia tipo silvestre.

15 2. La construcción de ácido nucleico de la reivindicación 1, en donde el exón 5 mutante codifica una mutación R206H.

20 3. La construcción de ácido nucleico de la reivindicación 2, en donde el exón 5 mutante es un exón 5 de ratón que codifica una mutación R206H.

4. La construcción de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el exón 5 de *Acvr1* es un exón 5 humano que en el primer codón codifica ácido glutámico en lugar de ácido aspártico.

25 5. La construcción de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la recombinasa es una recombinasa Cre.

6. La construcción de ácido nucleico de una la reivindicación 5, en donde la recombinasa Cre es una recombinasa Cre-ER^T o Cre-ER^{T2} inducible por tamoxifeno.

30 7. La construcción de ácido nucleico de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el primer y segundo pares de sitios de reconocimiento de recombinasas específicas de sitio son Lox2372 y LoxP, respectivamente, o viceversa.

35 8. Un gen *Acvr1* que comprende una construcción de ácido nucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. Un roedor que comprende un genoma que comprende un gen *Acvr1* que comprende una construcción de ácido nucleico como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

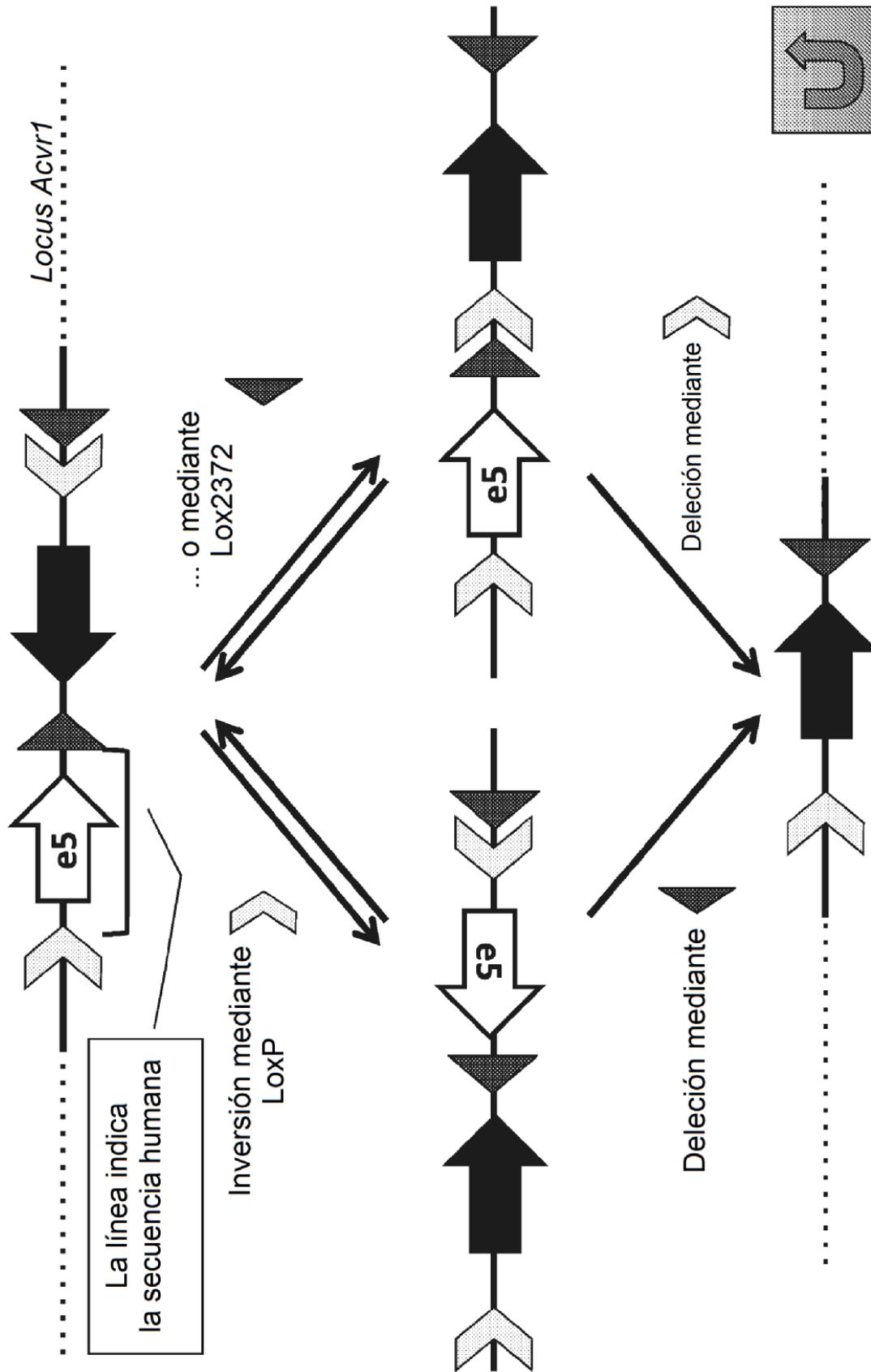


FIG. 1

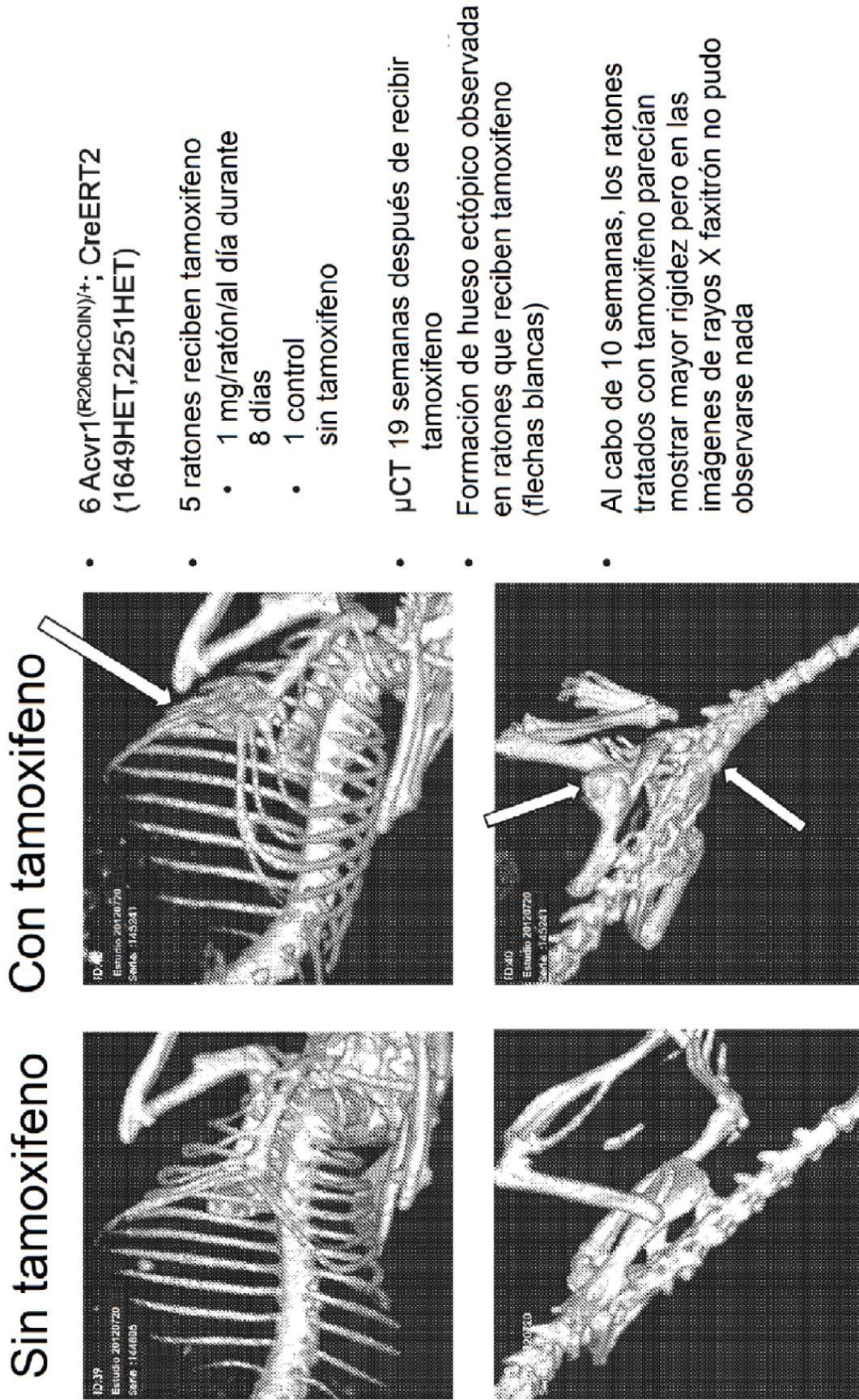
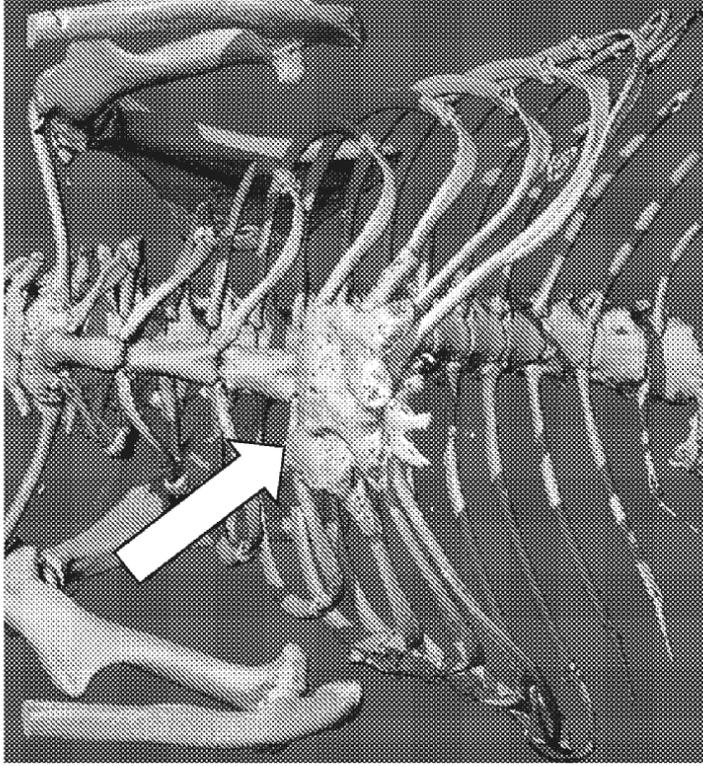


FIG. 3

Con tamoxifeno



Sin tamoxifeno

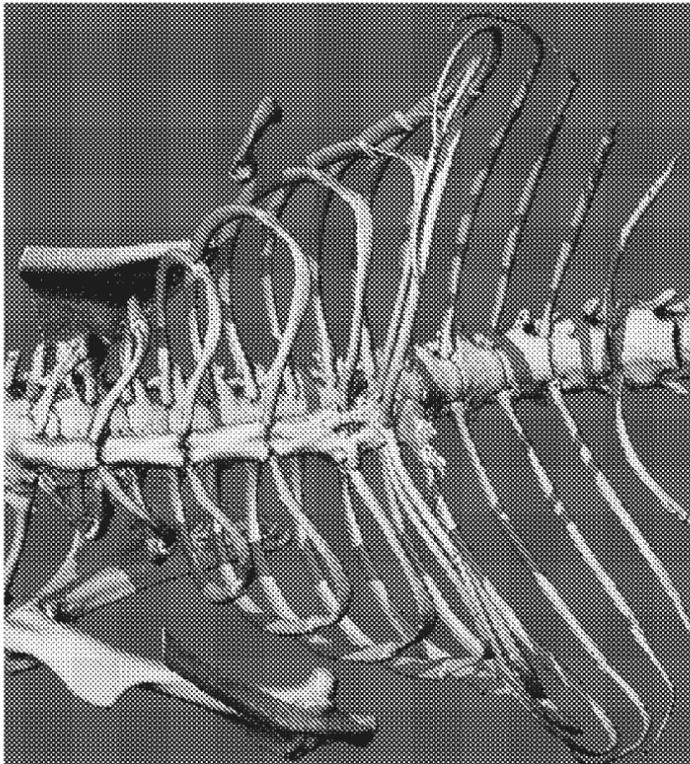
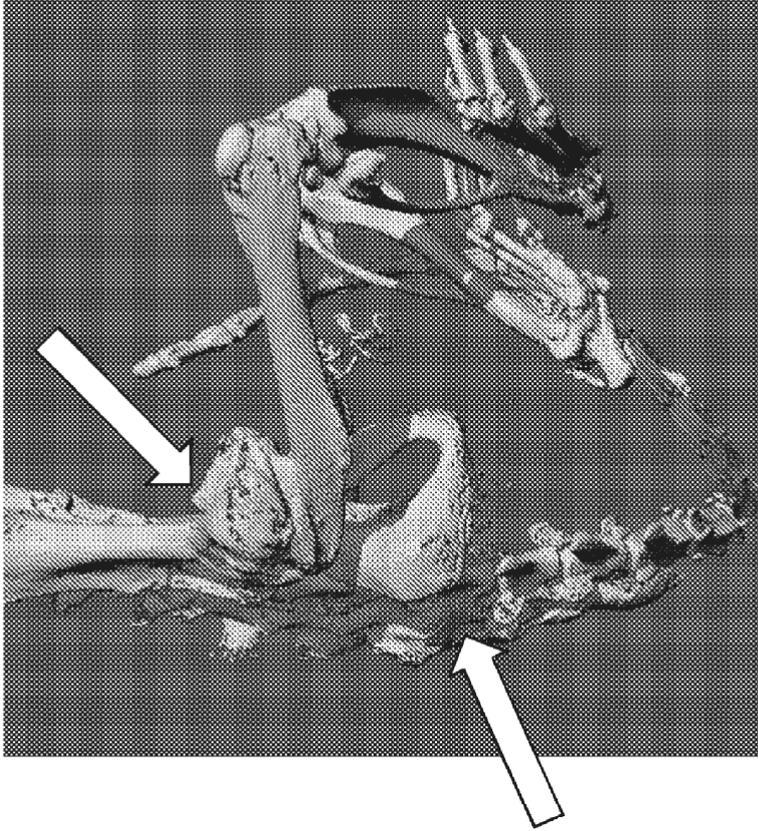


FIG. 4

Con tamoxifeno



Sin tamoxifeno

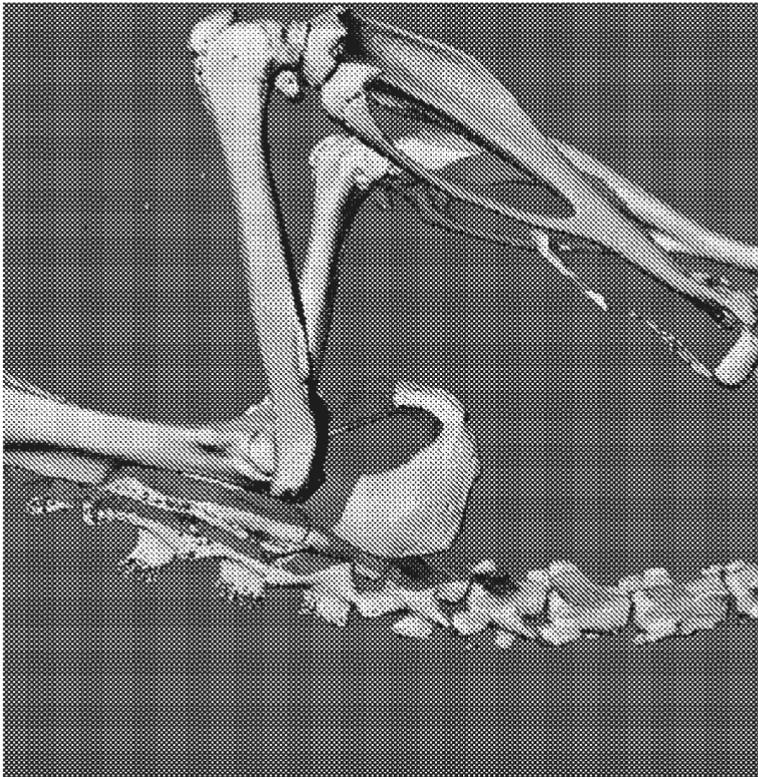


FIG. 5

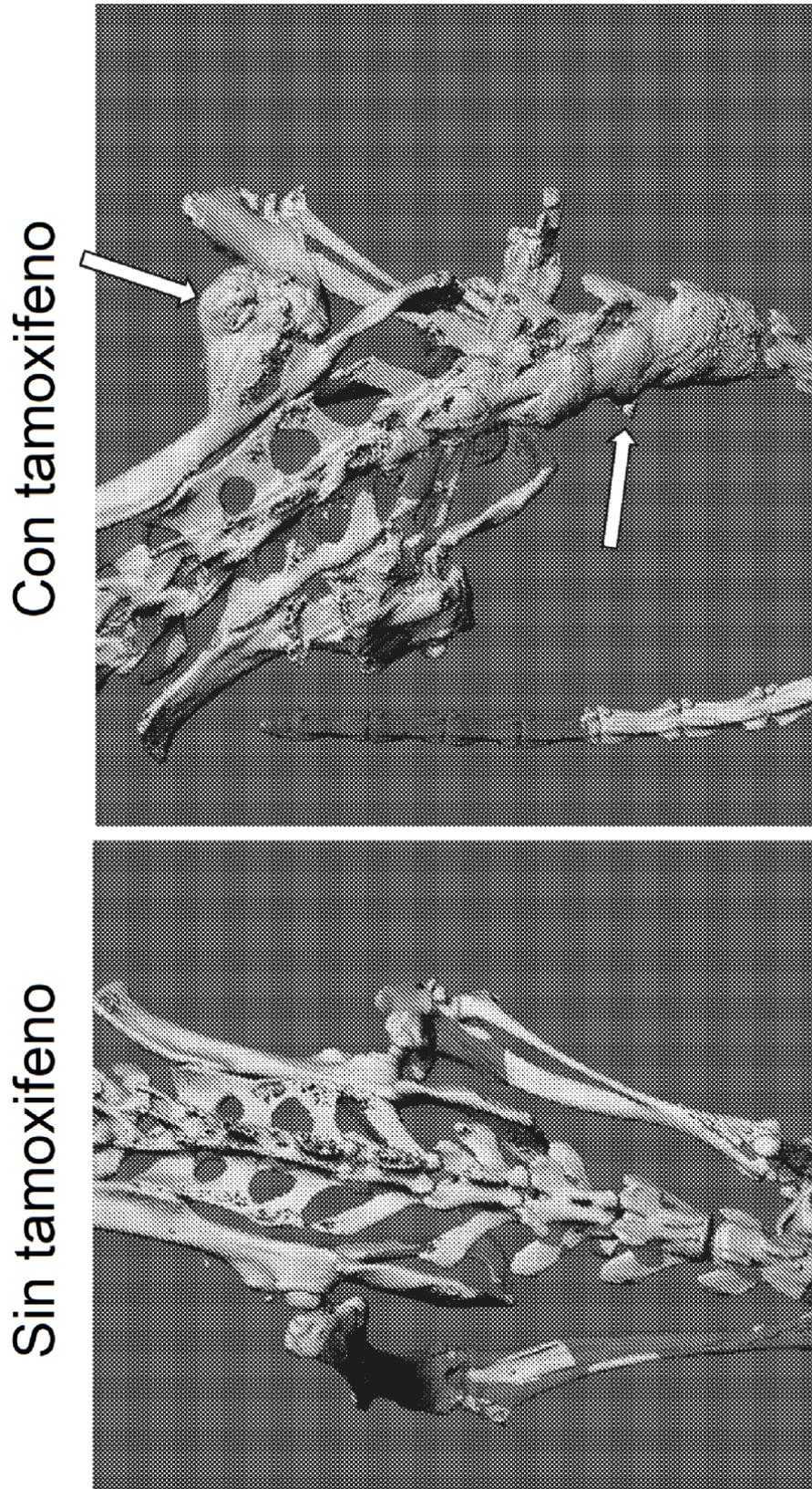
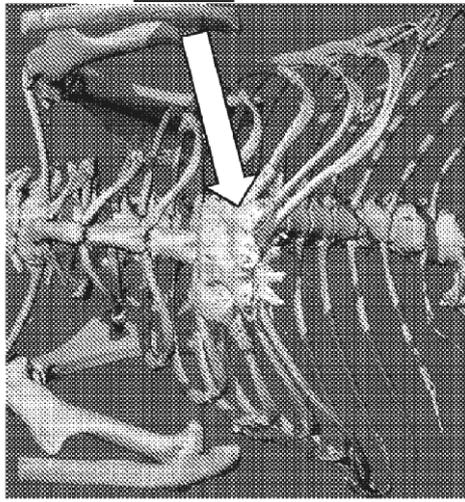


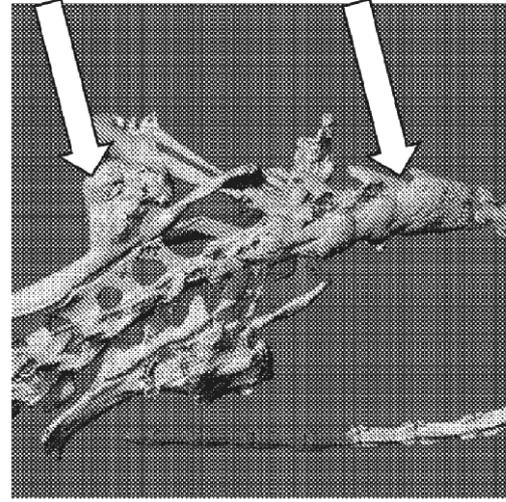
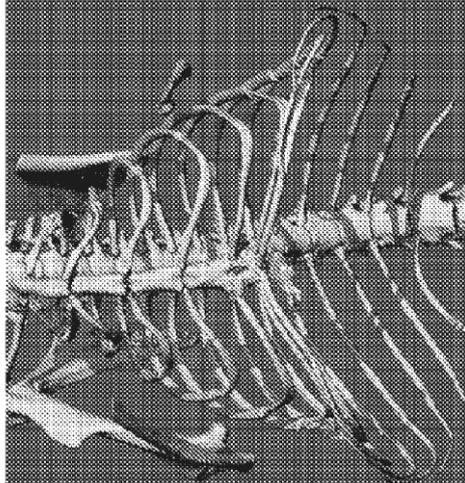
FIG. 6

Tamoxifeno N.º 2
ID: 845202



Formación de hueso ectópico: esternebras

Control N.º 1
ID: 840095



Formación de hueso ectópico:
Articulación coxofemoral

Formación de hueso ectópico:
vértebras caudales

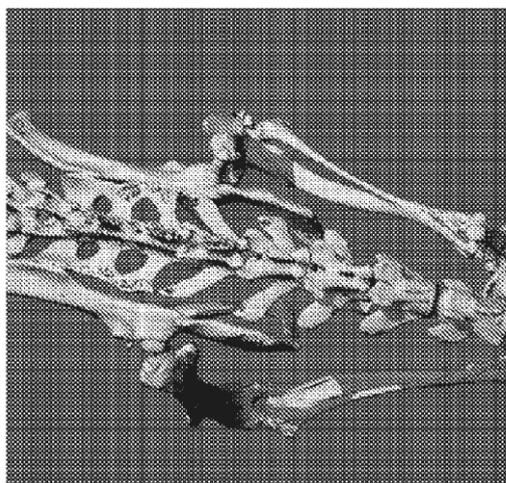
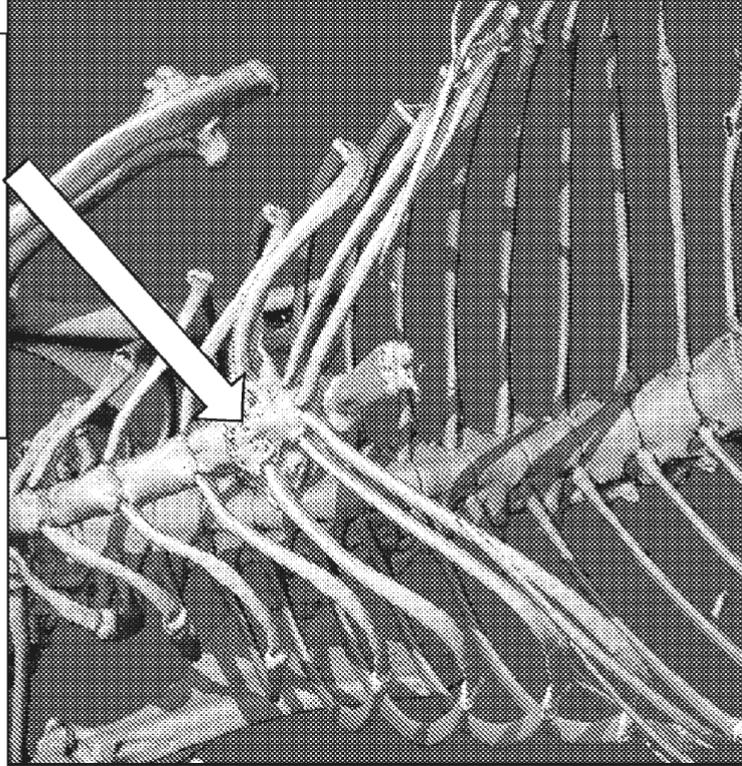


FIG. 7

Tamoxifeno N.º 3
ID: 915546

Formación de hueso ectópico: esternebras



Formación de hueso ectópico: vértebras caudales

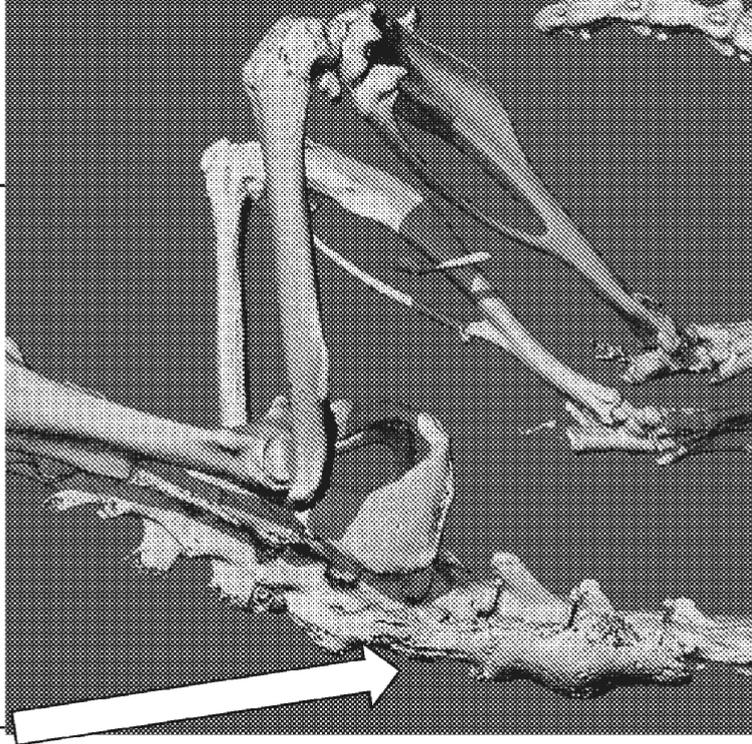


FIG. 8

Tamoxifeno N.º 4
ID: 904067

Formación de hueso ectópico no aparente

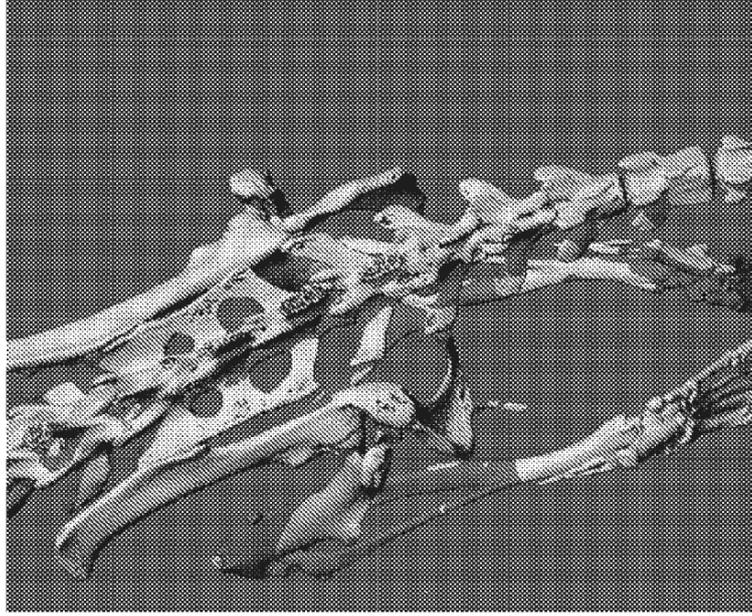
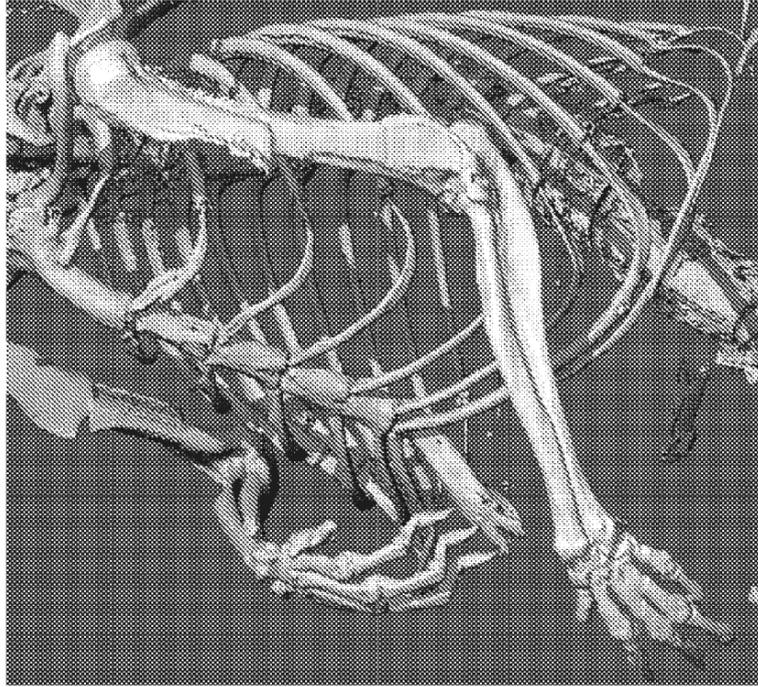


FIG. 9

Tamoxifeno N.º 5
ID: 840098

Formación de hueso
ectópico: esternebras

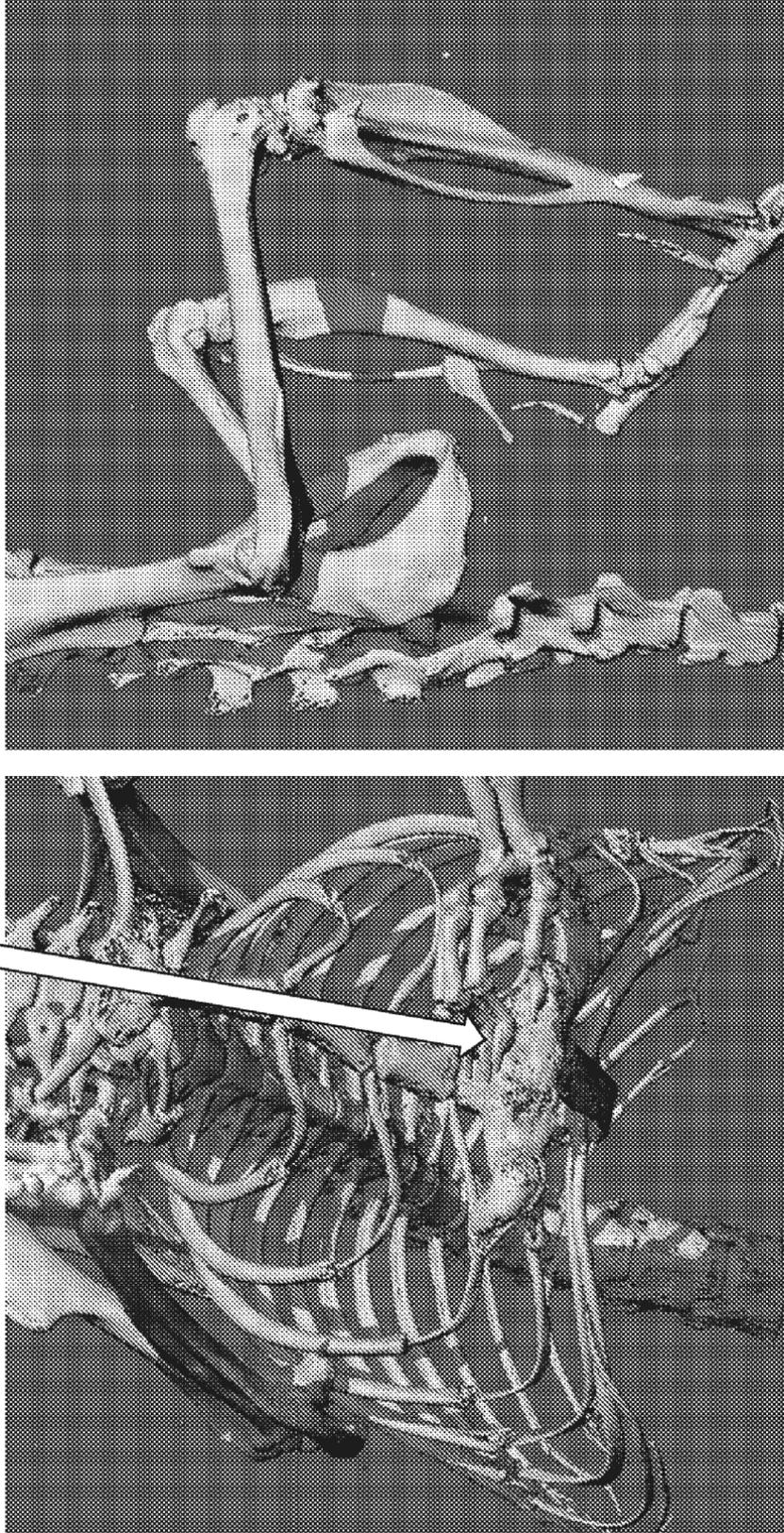


FIG. 10

Tamoxifeno N.º 6

ID: 863713

Formación de hueso ectópico: esternobras

Formación de hueso ectópico: articulación de la rodilla

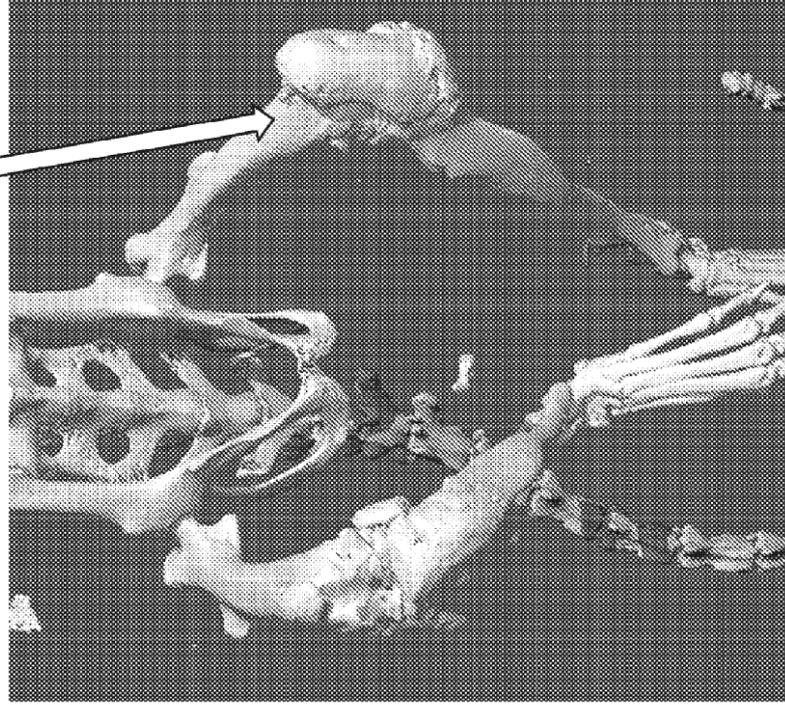
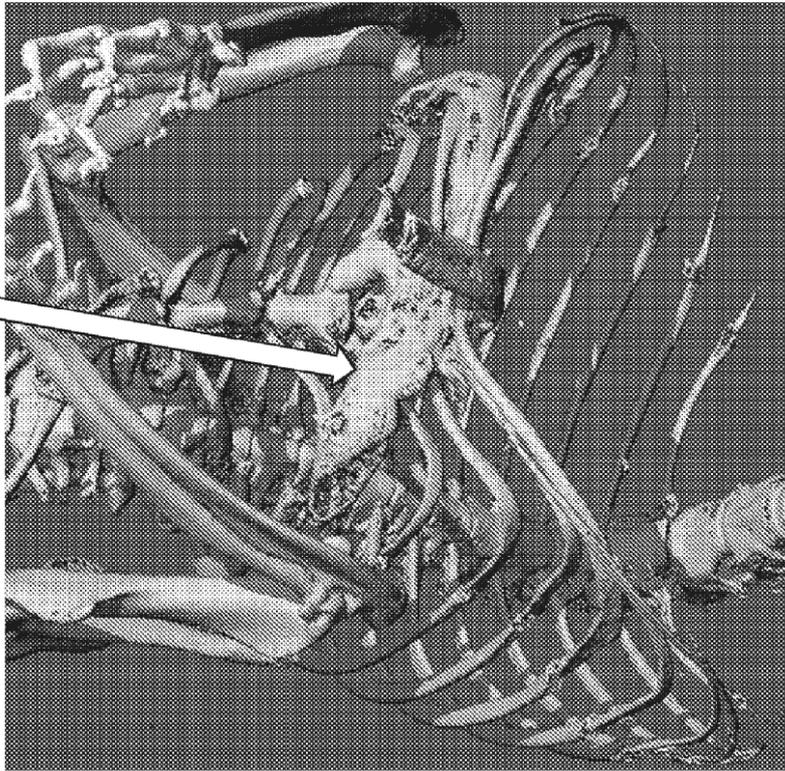


FIG. 11

Tabla 5. Cebadores y sondas para el genotipado de ratones modificados por ingeniería genética

Nombre	Diana	Ensayo ID	Ajuste paramétrico	Cebador o sonda	Cadena o marcador	5Pos	3Pos	Longitud	Tm
AcvF1 IS TU	S13080836	51	Más restrictivo v2.0	Cebador directo	S	175	198	24	66,94
			Menos restrictivo v2.0	TGAAGGAAAT GGGCTTCTGG ATAG					
AcvF1 IS TD	S13081203	6	Más restrictivo v2.0	Cebador inverso	S	4	27	24	67,16
			Menos restrictivo v2.0	AGAGGAAGGA GACGCTAAGA ATC					
AcvF1 IS TU	S13080836	51	Más restrictivo v2.0	AS	AS	260	238	23	65,4
			Menos restrictivo v2.0						
AcvF1 IS TD	S13080836	6	Más restrictivo v2.0	Sonda	FAM-BHQ-1	S	202	227	26
			Menos restrictivo v2.0						
AcvF1 IS TD	S13080836	6	Más restrictivo v2.0	FAM-BHQ-1	S	29	51	23	69,81
			Menos restrictivo v2.0						

FIG. 12