

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 662**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.10.2010** **PCT/US2010/054654**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.05.2011** **WO2011059799**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.10.2010** **E 10774391 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017** **EP 2494047**

54 Título: **Alelos multifuncionales**

30 Prioridad:

29.10.2009 US 256078 P

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

25.05.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ECONOMIDES, ARIS, N.;
MURPHY, ANDREW, J.;
LENGYEL, PETER, MATTHEW y
YANG, PETER, H., A.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 613 662 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

Alelos multifuncionales

CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere a construcciones de ácidos nucleicos para la modificación de genomas, incluyendo construcciones inactivadas y construcciones para colocar COINs en un genoma. Se describen animales no humanos modificados genéticamente, p. ej., los ratones genéticamente modificados que tienen genes o elementos de ácido nucleico dispuestos con sitios de reconocimiento de recombinasa seleccionados que permiten la delección o inversión de los genes o elementos de ácido nucleico para formar alelos nulos, alelos seleccionables, alelos informadores y/o alelos condicionales en animales no humanos, p. ej., en ratones y ratas.

10 ANTECEDENTES

Típicamente, las inactivaciones se realizan mediante la sustitución homóloga de un gen diana con otra secuencia de elección, habitualmente una casete informadora y una casete de selección, en que esta última está flanqueada preferiblemente por sitios de recombinasa específica del sitio para fortalecer la separación de la casete de selección a través de la acción de la recombinasa cognada específica de sitio. La casete de selección se puede separar posteriormente, ya sea por tratamiento de las células con la recombinasa cognada correspondiente o por la cría de la progenie de ratones a una cepa "supresora". Por ejemplo, en el caso de los alelos "floxed" (en que la secuencia de interés está flanqueada por sitios *loxP*), la recombinasa cognada es Cre y lo que queda en el genoma es un solo sitio *loxP* y el informador.

20 Tradicionalmente se ha empleado una estrategia relacionada para generar alelos condicionales nulos. Esto implica flanquear parte del gen de interés con sitios de reconocimiento de recombinasa específica del sitio (tales como *lox* para Cre y *FRT* para Flp) de una manera tal que tras la acción de la recombinasa cognada, la región flanqueada por los sitios de reconocimiento de recombinasa específica del sitio se eliminan y el alelo resultante es un alelo nulo.

Aunque se han hecho intentos para incorporar una funcionalidad tanto nula como condicional en un vector fijador de objetivo y para llevar a cabo la construcción de los correspondientes alelos modificados en una sola etapa de fijación como objetivo, los métodos que han resultado de tales intentos tienen varios inconvenientes y han tenido un éxito contradictorio. Estos inconvenientes incluyen, por ejemplo, la falta de una funcionalidad verdadera (es decir, la versión nula no es un nulo verdadero, el alelo condicional no es un condicional verdadero, la falta de función del informador, etc.) o la incapacidad de obtener un alelo de trabajo práctico con las características deseadas.

30 Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica para la generación de organismos modificados genéticamente a través de la fijación como objetivo, en que los loci modificados por ingeniería genética son loci multifuncionales, por ejemplo, un primer alelo KO verdadero y luego un alelo nulo condicional u otro alelo mutante condicional.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La FIG. 1 ilustra el uso de sitios de reconocimiento de recombinasa para eliminar simultáneamente un elemento (U) e invertir otro (D).

35 La FIG. 2 ilustra una realización de un Alelo Multifuncional (MFA), mostrado para una secuencia de nucleótidos de interés (NSI), el empleo de un aceptor de corte y empalme con la región de corte y empalme y una secuencia de accionamiento, seguido por una señal de poliadenilación (pA), una casete de selección de fármacos (DSC; en una orientación adecuada de elección), un COIN y cinco pares de sitios de reconocimiento de recombinasa. R1/R1', R2/R2', R3/R3', R4/R4' y R5/R5' representan pares cognatos de sitios de reconocimiento de recombinasa.

40 La FIG. 3 ilustra una representación conceptual de unidades recombinables (definidas por R1/R1', R2/R2', R3/R3', R4/R4' y R5/R5') de una realización de un alelo MFA que emplea una secuencia de accionamiento (por simplicidad no se muestran el aceptor de corte y empalme y la región de corte y empalme que precede a la secuencia, y la señal poliA que sigue a la secuencia), una DSC (en una orientación adecuada de elección), una NSI y un COIN.

45 La FIG. 4 ilustra una realización particular de un MFA con sitios específicos de reconocimiento de recombinasa para fines de ilustración (parte superior) y que genera un alelo nulo "limpiado" que comprende una secuencia de accionamiento que comprende una secuencia *LacZ*, y extracción de la DSC, así como la NSI y el elemento COIN de la realización inicial de la MFA utilizando una sola etapa de recombinasa. Por simplicidad, no se muestran el aceptor de corte y empalme y la región de corte y empalme que precede a la secuencia *LacZ*, y la señal poliA que sigue a la secuencia *LacZ*.

50 La FIG. 5 ilustra una realización particular de un MFA que genera un alelo condicional que contiene/incorpora un COIN de un MFA utilizando una sola recombinasa (aquí, una recombinasa Flp que actúa primero sobre sitios *FRT3* de la realización del alelo). Por simplicidad, no se muestran el aceptor de corte y empalme y la región de corte y empalme que precede a la secuencia *LacZ*, y la señal poliA que sigue a la secuencia *LacZ*.

La FIG. 6 ilustra una realización de un MFA que genera un alelo nulo condicional que contiene/incorpora un COIN de un MFA utilizando una sola recombinasa (aquí, una recombinasa Flp que actúa primero sobre sitios *FRT* de la realización del alelo). Por simplicidad, no se muestran el aceptor de corte y empalme y la región de corte y empalme que precede a la secuencia *LacZ*, y la señal *poliA* que sigue a la secuencia *LacZ*.

- 5 La FIG. 7 ilustra una realización en donde, después del tratamiento con recombinasa (exposición de Flp tal como se muestra en la FIG. 5 o la FIG. 6), el alelo se expone a una segunda recombinasa (Cre), resultando la delección de la NSI y la colocación del COIN en la orientación sentido para la transcripción.

La FIG. 8 ilustra una realización en donde, después del tratamiento con recombinasa (exposición de Flp), el alelo se expone a una segunda recombinasa, dando como resultado la inversión del COIN y de la NSI debido a una colocación (alternativa) de un sitio de reconocimiento de recombinasa para la segunda recombinasa en una posición 5' de NSI.

- 15 La FIG. 9 ilustra la estructura exón-intrón del gen *Hprt1* de ratón en la región de los exones 2 a 4, adaptado del servidor del genoma de ratón Ensembl (panel superior - www.ensembl.org) y la región del exón 2 al exón 4 se expande en el navegador del ECR (<http://ecrbrowser.dcode.org>) para resaltar regiones de conservación. El exón 3 se destaca por un óvalo de puntos. La flecha vertical negra indica el punto de inserción de la secuencia de accionamiento y DSC, mientras que la flecha gris indica el punto de inserción del elemento COIN, todas utilizadas para diseñar el alelo *Hprt1*^{MFA}. Téngase en cuenta que ninguna de las secuencias intrónicas conservadas evolutivamente que flanquean el exón 3 se interrumpen en el alelo resultante. El paralelogramo de puntos indica la región que se convertirá en la NSI en el alelo *Hprt1*^{MFA}.

- 20 La FIG. 10 ilustra un ejemplo de un MFA, específicamente el MFA para el gen *Hprt1*. El exón 3 más secuencias intrónicas conservadas evolutivamente que flanquean el exón 3 (tal como se ilustra en la FIG. 9) de *Hprt1* se convierten en la NSI. Tras la fijación de objetivo, la NSI se coloca en la cadena antisentido con respecto a la dirección de la transcripción del gen *Hprt1*. Una secuencia de accionamiento - *SA-lacZ-poliA* - y un DSC están dispuestos aguas arriba de la NSI. La secuencia de accionamiento está dispuesta en la orientación sentido con respecto a la dirección de la transcripción del gen *Hprt1*, actuando efectivamente como un elemento de trampa de genes, y la derogación de la transcripción aguas abajo de la secuencia de accionamiento. Un elemento COIN está dispuesto aguas debajo de la NSI en la orientación antisentido con respecto a la dirección de la transcripción del gen *Hprt1*. Ni el elemento COIN ni la NSI se pueden incorporar en un ARNm de *Hprt1* productivo y, por lo tanto, el alelo resultante, *Hprt1*^{MFA}, es un alelo nulo con un informador (*LacZ*). Los elementos que comprenden el alelo *Hprt1*^{MFA} están flanqueados por sitios de reconocimiento de recombinasa específica del sitio dispuestos como sigue: *FRT*-secuencia de accionamiento-Rox-DSC-*FRT3*-(*LoxP*)-(NSI)-(Lox2372)-(FRT)-(FRT3)-(COIN)-(Lox2372)-(LoxP)-Rox, en que el paréntesis indica la colocación en la orientación antisentido con respecto a la dirección de la transcripción del gen *Hprt1*, o en el caso de sitios de recombinasa específica del sitio con orientación opuesta respecto a los pares mutuamente reconocidos.

- 35 La FIG.11 ilustra una realización de un MFA, que muestra determinadas unidades recombinables solapantes (A) y alelos resultantes que se generan por la acción de una primera recombinasa (B) o una segunda (C) y tercera (D) recombinasas.

- 40 La FIG. 12 ilustra una realización de un MFA, que muestra determinadas unidades recombinables solapantes (A) y alelos resultantes que se generan por la acción de una primera recombinasa (B) o una segunda (C) y tercera (D) recombinasas.

La FIG. 13 ilustra una realización de un MFA (A), que muestra alelos resultantes que resultan de la acción de una primera recombinasa que coloca la NSI en orientación sentido (B) y una segunda recombinasa que coloca la NSI en orientación antisentido al tiempo que coloca el COIN en orientación sentido (C).

- 45 La FIG. 14 ilustra una realización de un MFA (A), que muestra alelos resultantes que resultan de la acción de una primera recombinasa que coloca la NSI en orientación sentido (B) y una segunda recombinasa que coloca la NSI en orientación antisentido al tiempo que coloca el COIN en orientación sentido (C).

La FIG. 15 ilustra otra realización de un MFA (A), que muestra alelos resultantes que resultan de la acción de una primera recombinasa que coloca la NSI en orientación sentido (B) y una segunda recombinasa que coloca la NSI en orientación antisentido al tiempo que coloca el COIN en orientación sentido (C).

- 50 La FIG. 16 ilustra un ejemplo de una realización de MFA, en donde el informador es un SA(adml)-gtx-lacZ-pA, la DSC es Neo, la NSI es un exón crítico (*e_c*), y el COIN es Gtx-SA-HA-myc3-TM-T2A-GFP-pA (A), la colocación de NSI en orientación sentido por la acción de una recombinasa al tiempo que se mantiene el COIN en orientación antisentido (B) y, además, la escisión de la NSI con la colocación concomitante del COIN en orientación sentido (C); las flechas indican cebadores utilizados para confirmar identidades y orientaciones de sitios de recombinasa en el MFA (A), y tras el tratamiento con recombinasa (B y C).

La FIG. 17 muestra los resultados de ensayos de la viabilidad y la proliferación celular para células *Hprt1*^{+/Y}, *Hprt1*^{MFA}/Y, *Hprt1*^{COIN-INV}/Y y *Hprt1*^{COIN-INV}/Y ES, respectivamente, todas cultivadas en medio estándar de cultivo de

células ES o bien sin 6-TG (sin 6-TG; paneles superiores) o complementado con un 6-TG 10 μ M (6-TG, paneles inferiores).

La FIG. 18 muestra transferencias Western de preparaciones de proteínas totales derivadas de células *Hprt1*^{+/Y} (WT), *Hprt1*^{MFA}/Y (MFA) - es decir, las células fijadas como objetivo con el MFA de la FIG. 16A, células *Hprt1*^{COIN}/Y (MFA + FLPO) - es decir, células fijadas como objetivo con el MFA de la FIG. 16A y después tratadas con FLPO, y células *Hprt1*^{COIN-INV}/Y (MFA + FLPO + Cre) - es decir, células *Hprt1*^{COIN-INV}/Y tratadas con Cre; el panel superior muestra la detección de la proteína Hprt1, el panel central muestra la detección de la proteína LacZ (informadora) y el panel inferior muestra la detección de la proteína GAPDH como control de carga.

SUMARIO

Se proporcionan métodos y composiciones para hacer alelos nulos y alelos condicionales, y alelos que combinan características nulas y COIN. En diversas realizaciones se proporcionan métodos y composiciones para modificar por ingeniería genética alelos multifuncionales en un genoma en una sola etapa de fijación como objetivo. Se proporcionan métodos y composiciones para el análisis de complementación de la inactivación en animales no humanos modificados genéticamente, incluyendo los métodos que comprenden una sola etapa de fijación como objetivo.

Por lo tanto, la presente invención proporciona una construcción de ácido nucleico, que comprende:

- (a) brazos fijadores de objetivo para dirigir la construcción de ácido nucleico a un gen diana de un ácido nucleico de una célula;
- (b) una secuencia de accionamiento en orientación sentido con respecto a la transcripción del gen diana, y una casete de selección de fármacos (DSC) en orientación sentido o antisentido;
- (c) en orientación antisentido, una secuencia de nucleótidos de interés (NSI) y un COIN (elemento condicional mediante inversión); y
- (d) unidades recombinables,

en donde las unidades recombinables comprenden dos primeros pares de sitios de reconocimiento de recombinasa cognatos reconocidos por una primera recombinasa, comprendiendo una primera unidad recombinable la secuencia de accionamiento, la DSC y la NSI, en donde la primera unidad recombinable está flanqueada por un par de los dos primeros pares de sitios de reconocimiento de recombinasa cognatos reconocidos por la primera recombinasa, comprendiendo una segunda unidad recombinable la NSI, en donde la segunda unidad recombinable está flanqueada por un par de los dos primeros pares de sitios de reconocimiento de recombinasa cognatos reconocidos por la primera recombinasa, dos segundos pares de sitios de reconocimiento de recombinasa cognatos reconocidos por una segunda recombinasa, y un tercer par de sitios de reconocimiento de recombinasa cognatos reconocidos por una tercera recombinasa; en donde los primeros pares, los segundos pares y los terceros pares de sitios de reconocimiento de recombinasa son reconocidos por diferentes recombinasas;

en donde las unidades recombinables se recombinan tras la exposición a una primera recombinasa para formar un alelo condicional que carece de la secuencia de accionamiento y la DSC y contiene la NSI en orientación sentido y el COIN en orientación antisentido; y

en donde el alelo condicional, cuando se expone adicionalmente a la segunda recombinasa, se recombina para formar un alelo que carece de la NSI y que tiene el COIN en orientación sentido.

La presente invención proporciona, además, un método para modificar una célula no humana, que comprende:

fijar como objetivo una secuencia de nucleótidos de interés en una célula con una construcción de ácido nucleico de la invención para formar una célula fijada como objetivo, exponer la célula fijada como objetivo a la primera recombinasa para formar el alelo condicional y exponer el alelo condicional a una segunda recombinasa que escinde la NSI y coloca el COIN en orientación sentido.

La presente invención proporciona, además, una construcción de ácido nucleico, que comprende:

una casete de selección de fármacos (DSC), un informador, un COIN, una secuencia de nucleótidos de interés (NSI) y cinco pares de sitios de recombinasa dispuestos entre el informador, la DSC, el COIN y la NSI;

en donde ningún par de sitios de recombinasa es idéntico a cualquier otro par, y en donde unos primeros dos pares de sitios de recombinasa son reconocidos por la misma primera recombinasa, unos segundos dos pares de sitios de recombinasa son reconocidos por la misma segunda recombinasa y un quinto par de sitios de recombinasa es reconocido por una tercera recombinasa;

en donde la primera, segunda y tercera recombinasa no son iguales, y en donde con respecto a la dirección de transcripción, el informador se encuentra en orientación sentido, la NSI está en orientación antisentido, el COIN está en orientación antisentido y la DSC está en orientación sentido o antisentido;

5 en donde los sitios de recombinasa están dispuestos en unidades recombinables que comprenden (i) una primera unidad recombinable que comprende la secuencia de accionamiento, la DSC y la NSI, en donde la primera unidad recombinable está flanqueada por un par de los dos primeros pares de sitios de reconocimiento de recombinasa cognatos reconocidos por la primera recombinasa; y (ii) una segunda unidad recombinable que comprende la NSI, en donde la segunda unidad recombinable está flanqueada por un par de los dos primeros pares de sitios de reconocimiento de recombinasa cognatos reconocidos por la primera recombinasa; y

10 en donde los primeros dos pares y los segundos dos pares de sitios de recombinasa están dispuestos de modo que tras la exposición a la primera recombinasa, se forma un alelo modificado, en donde los primeros dos pares de sitios de recombinasa dirigen la escisión del informador, la escisión de la DSC, la inversión de la NSI a orientación sentido y el COIN se mantiene en orientación antisentido, y (a) los segundos pares de sitios de recombinasa están dispuestos de manera que, tras la exposición a la segunda recombinasa, la NSI se escinde y el COIN se coloca en orientación sentido; o (b) los segundos dos pares de sitios de recombinasa están dispuestos de manera que tras la
15 exposición a la segunda recombinasa, la NSI se coloca en orientación antisentido y el COIN se coloca en orientación sentido.

Se describe un alelo modificado, que comprende una región 3' de corte y empalme y un aceptor de corte y empalme, una secuencia de accionamiento 3' con respecto al aceptor de corte y empalme y una secuencia de nucleótidos de interés (NSI) 3' con respecto a la secuencia de accionamiento, en el que la NSI está en orientación antisentido con respecto al gen diana (o siendo modificado el locus, o con respecto a la secuencia de accionamiento).

En un caso, la secuencia de accionamiento se selecciona de un microARN, una señal de parada de la transcripción (tal como una región de poliadenilación), una secuencia de nucleótidos que codifica un ADNc, o cualquiera de sus combinaciones, y puede incluir elementos reguladores tales como operadores, potenciadores y aislantes. En un
25 caso específico, el ADNc codifica un informador (p. ej., codifica *LacZ*). En un caso, la secuencia de accionamiento comprende un exón. En un caso específico, el exón es el exón 5' más extremo de un locus.

En un caso, la NSI comprende un exón. En un caso, la NSI comprende un exón y una secuencia intrónica vecina. En un caso específico, el exón flanqueante está flanqueado en las posiciones 5' y 3' con una secuencia intrónica. En un caso, la secuencia de nucleótidos comprende dos o más exones, y en un caso específico, comprende la o las
30 secuencias intrónicas. En otro caso, la NSI carece de un exón, o carece de un fragmento de un exón.

En un caso, el alelo modificado comprende un COIN. En un caso, el COIN está en posición 3' con respecto a la NSI; en otro caso, el COIN está en posición 5' con respecto a la NSI.

En un caso, el COIN se selecciona de un informador, un elemento tipo trampa de gen (elemento tipo GT) y un informador tipo trampa de gen (informador tipo GT). En un caso específico, el elemento tipo GT se selecciona de
35 ADNc-poliA de resistencia a fármacos SA. En un caso específico, el informador de tipo GT se selecciona de SA-informador-poliA.

En un caso, el COIN comprende una región de corte y empalme 3'. En un caso específico, la región de corte y empalme 3' es seguida por una secuencia seleccionada a partir de un ADNc, una secuencia de exón-intrón, un microARN, un racimo de microARN, un ARN pequeño, un elemento de salto del codón, un IRES, una secuencia de poliadenilación o cualquier combinación de los mismos. En un caso específico, el ARN pequeño es un mirtrón. En un
40 caso específico, el elemento de salto del codón es T2A, E2A o F2A.

En un caso, el alelo modificado comprende una casete de selección de fármacos (DSC).

En un caso, el alelo modificado está en una construcción de fijación de objetivo que comprende un brazo de homología aguas arriba y un brazo de homología aguas abajo. En un caso, al menos un brazo de homología es un
45 brazo de homología de ratón. En un caso específico, los dos brazos de homología son brazos de homología de ratón.

En un caso, el alelo modificado comprende, de 5' a 3', un aceptor de corte y empalme, una secuencia de accionamiento, una DSC, una NSI y un COIN en donde la secuencia de nucleótidos de interés y el COIN están
50 ambos en orientación antisentido con respecto a la secuencia de accionamiento, y cinco pares de sitios de reconocimiento de recombinasa específica del sitio. En un caso, el alelo modificado, tras la exposición a una primera recombinasa específica del sitio que reconoce de forma independiente e invierte la secuencia entre un primer par de los sitios de reconocimiento de recombinasa específica del sitio y suprime una secuencia entre un segundo par de sitios de reconocimiento de recombinasa específica del sitio, resulta en un alelo que comprende la NSI en orientación sentido para la transcripción, que carece de la DSC, y que comprende el COIN en orientación
55 antisentido. En un caso, el alelo modificado comprende un tercer y cuarto sitio de reconocimiento de recombinasa específica del sitio dispuestos de manera que la exposición adicional del alelo a una segunda recombinasa que

reconoce independientemente el tercer y cuarto sitio de reconocimiento de recombinasa específica del sitio resulta en la supresión de la NSI y la colocación del COIN en orientación sentido para la transcripción.

5 En un aspecto, la construcción de ácido nucleico proporcionada comprende (a) un informador en orientación sentido y una DSC en una orientación adecuada de elección, y en una orientación antisentido una NSI y un COIN; (b) cinco pares de sitios de reconocimiento de recombinasa específica del sitio, en donde los cinco pares de sitios de reconocimiento de recombinasa son reconocidos por no más de tres recombinasas; en donde tras el tratamiento de la construcción de ácido nucleico con una primera recombinasa, se forma un alelo modificado en donde (i) la NSI está dispuesta en orientación sentido, (ii) el COIN permanece en orientación antisentido, (iii) se suprimen el informador y la DSC y, (iv) el alelo modificado tras el tratamiento con una segunda recombinasa suprime la NSI y
10 dispone el COIN en orientación sentido.

En una realización, los cinco pares de sitios de reconocimiento de recombinasa específica del sitio son los pares *FRT3*, *Rox*, *FRT*, *loxP* y *lox2372*.

En una realización, la primera recombinasa es una recombinasa Flp, y la segunda recombinasa es una recombinasa Cre.

15 En una realización, el alelo modificado tras el tratamiento con la segunda recombinasa resulta en un alelo que no se puede suprimir o invertir por la primera o la segunda recombinasa.

En una realización, la secuencia de nucleótidos de interés es un exón de tipo salvaje de un gen. En otra realización, la NSI es un exón de un gen que tiene una o más sustituciones, delecciones o adiciones de ácidos nucleicos.

20 En una realización, la NSI es un exón de tipo salvaje más el flanqueo intrónico de un gen. En otra realización, la NSI es un exón más la secuencia intrónica vecina de un gen que tiene una o más sustituciones, delecciones o adiciones de ácidos nucleicos.

En una realización, la NSI es un intrón de tipo salvaje de un gen. En otra realización, la NSI es un intrón de un gen que tiene una o más sustituciones, delecciones o adiciones de ácido nucleico.

25 En una realización, el COIN comprende un exón o exones de un gen que comprende una o más sustituciones, delecciones o adiciones de ácidos nucleicos. En una realización específica, el COIN comprende un exón de un mamífero. En una realización específica, el mamífero es un ser humano, ratón, mono o rata.

30 En una realización, el COIN comprende una región 3' de corte y empalme. En una realización específica, la región 3' de corte y empalme es seguida por una secuencia seleccionada de un ADNc, una secuencia de exón-intrón, un microARN, un racimo de microARN, un ARN pequeño, un elemento de salto del codón, un IRES, una secuencia de poliadenilación y una combinación de los mismos. En una realización específica, el ARN pequeño es un mirtrón. En una realización específica, el elemento de salto del codón es una T2A.

35 En una realización, el COIN se selecciona de un informador, un elemento tipo trampa de gen (elemento tipo GT) y un informador tipo trampa de gen (informador tipo GT). En una realización específica, el elemento tipo GT se selecciona de ADNc-poliA de resistencia a fármacos SA. En un caso específico, el informador de tipo GT se selecciona de SA-informador-poliA.

40 En una realización, la construcción comprende, además, un brazo de homología de aguas arriba y un brazo de homología de aguas abajo. En una realización, el brazo de homología de aguas arriba y el brazo de homología de aguas abajo son brazos de homología de ratón o de rata. En una realización específica, los brazos de homología son brazos de homología de ratón y la NSI comprende una secuencia humana. En una realización específica, la secuencia humana comprende un exón humano que es un homólogo humano de un exón de ratón.

En una realización, el informador se selecciona de: una proteína fluorescente, una proteína luminiscente o una enzima. En una realización específica, el informador se selecciona de GFP, eGFP, CFP, YFP, eYFP, BFP, eBFP, DsRed, MmGFP, luciferasa, *LacZ* y fosfatasa alcalina.

45 En una realización, la DSC comprende una secuencia que codifica una actividad seleccionada de neomicina fosfotransferasa (*neo^r*), higromicina B fosfotransferasa (*hyg^r*), puromicina-N-acetiltransferasa (*puro^r*), blastidina S deaminasa (*bsr^r*), xantina/guanina fosforribosil transferasa (*gpt*), nourseotricina acetiltransferasa (*nat1*) y el virus Herpes simplex timidina quinasa (HSV-tk).

50 En un aspecto, la construcción de ácido nucleico proporcionada comprende una secuencia de accionamiento que comprende un aceptor de corte y empalme 3', seguido de un informador en orientación sentido, DSC en una orientación adecuada de elección, una NSI en orientación antisentido y un COIN en orientación antisentido, en donde la secuencia de accionamiento y el informador están flanqueados aguas arriba por un sitio de reconocimiento de recombinasa R1, un sitio de reconocimiento de recombinasa R2 está dispuesto entre el informador y la DSC, un sitio de recombinasa R3 está dispuesto entre la DSC y la secuencia de nucleótidos de interés, un sitio de recombinasa R4 está dispuesto entre el sitio R3 y la NSI, un sitio de recombinasa R5 está dispuesto entre la NSI y el

COIN, un sitio de recombinasa R1' está dispuesto entre el sitio R5 y el COIN, un sitio de recombinasa R3' está dispuesto entre R1' y el COIN, un sitio de recombinación R5' está dispuesto aguas abajo del COIN, un sitio de recombinación R4' está dispuesto aguas abajo del sitio R5' y un sitio de recombinación R2' está dispuesto aguas abajo del sitio R4'; en donde R1 y R1' están en orientación opuesta, R2 y R2' están en la misma orientación, R3 y R3' están en orientación opuesta, R4 y R4' están en la misma orientación y R5 y R5' están en la misma orientación.

En una realización, el informador es seguido de una región de poliadenilación.

En una realización, R1 y R1' son reconocidos por una recombinasa que reconoce R3 y R3'. En una realización, R4 y R4' son reconocidos por una recombinasa que reconoce R5 y R5'. En una realización, R2 y R2' no son reconocidos por recombinasa alguna que reconoce R1/R1', R3/R3', R4/R4' o R5/R5'. En una realización, R1 y R1', R3 y R3' y R2 y R2' no son reconocidos por recombinasa alguna que reconoce R4 y R4' y R5 y R5'. En una realización, R4 y R4', R5 y R5' y R2 y R2' no son reconocidos por recombinasa alguna que reconoce R1 y R1' y R3 y R3'.

En una realización, el tratamiento con una sola recombinasa resulta en una construcción de ácido nucleico que carece de la DSC, la NSI y el COIN. En una realización específica, la construcción de ácido nucleico resultante consiste esencialmente en la secuencia de accionamiento, R1, y R2 o R2'. En una realización específica, R1 es un sitio *FRT3* y R2 (o R2') es un sitio Rox.

En una realización, el tratamiento con una sola recombinasa resulta en una construcción de ácido nucleico que comprende la secuencia de accionamiento en orientación sentido, pero que carece de la DSC, carece de la NSI y carece del COIN. En una realización específica, R2 y R2' son sitios Rox, y la sola recombinasa es recombinasa Dre.

En una realización, el tratamiento con una sola recombinasa resulta en una construcción de ácido nucleico que comprende la NSI en la orientación antisentido y el COIN en orientación antisentido. En una realización, la sola recombinasa es una recombinasa Flp, R1 y R1' son una secuencia variante *FRT* que no reacciona de forma cruzada con R3 y R3' (que son también *FRT* o variantes de *FRT*), R2 y R2' son secuencias de Rox, y R4 y R4' son secuencias de *loxP* o secuencias variantes de *lox* que no reaccionan de forma cruzada con R5 y R5', en donde R5 y R5' son secuencias variantes de *lox*.

En una realización, el tratamiento con una sola recombinasa resulta en una construcción de ácido nucleico que comprende la NSI en orientación sentido y el COIN en orientación antisentido. En una realización, la sola recombinasa es una recombinasa Flp, R1 y R1' son secuencias de *FRT3*, R2 y R2' son secuencias de Rox, R3 y R3' son secuencias de *FRT*, R4 y R4' son secuencias de *loxP*, R5 y R5' son secuencias de *lox2372*.

En una realización, la NSI es un exón de tipo salvaje de un gen. En otra realización, la NSI es un exón de un gen que tiene una o más sustituciones, deleciones o adiciones de ácidos nucleicos.

En una realización, el COIN comprende un exón o exones de un gen que comprende una o más sustituciones, deleciones o adiciones de ácidos nucleicos. En una realización específica, el COIN comprende un exón de un mamífero. En una realización, el mamífero es un ser humano, ratón, mono o rata.

En una realización, la construcción comprende, además, un brazo de homología aguas arriba de la construcción (un brazo de homología de aguas arriba) y un brazo de homología aguas abajo de la construcción (un brazo de homología de aguas abajo). En una realización, el brazo de homología de aguas arriba y el brazo de homología de aguas abajo son brazos de homología de ratón o de rata. En una realización específica, los brazos de homología son brazos de homología de ratón y la NSI comprende una secuencia humana. En una realización específica, la secuencia humana comprende un exón humano homólogo a un exón de ratón.

En una realización, el informador se selecciona de: una proteína fluorescente, una proteína luminiscente o una enzima. En una realización específica, el informador se selecciona de GFP, eGFP, CFP, YFP, eYFP, BFP, eBFP, DsRed, MmGFP, luciferasa, *LacZ* y fosfatasa alcalina. En una realización, la DSC comprende una secuencia que codifica una actividad seleccionada de neomicina fosfotransferasa (*neo^r*), higromicina B fosfotransferasa (*hyg^r*), puromicina-N-acetiltransferasa (*puro^r*), blasticidina S deaminasa (*bsr^r*), xantina/guanina fosforribosil transferasa (*gpt*), nourseotricina acetiltransferasa (*nat1*) y el virus Herpes simplex timidina quinasa (HSV-tk).

En un aspecto, la construcción de ácido nucleico proporcionada es una construcción de ácido nucleico para la modificación de un locus, que comprende una primera, segunda, tercera, cuarta y quinta unidad recombinable solapante, en donde una unidad recombinable incluye un par de sitios de reconocimiento de recombinasa específica del sitio cognatos, y en donde (a) la primera unidad recombinable está enmarcada por sitios de recombinasa R1 y R1' en orientación de oposición (que permite la inversión a través de R1/R1'), en donde entre R1 y R1' están dispuestas una secuencia de accionamiento en orientación sentido con respecto a la dirección de la transcripción del gen diana, seguida de un sitio de recombinasa R2, seguido de una DSC en una orientación adecuada de elección, seguida de un sitio de recombinasa R3 seguido de un sitio de recombinasa R4, seguido de una NSI en orientación antisentido, seguida de un sitio de recombinasa R5; (b) la segunda unidad recombinable está enmarcada por sitios de recombinasa R2 y R2' en la misma orientación (permitiendo la deleción a través de R2/R2'), en donde entre R2 y R2' está dispuesta una DSC en una orientación adecuada de elección, seguida de R3, seguido de R4, seguido por la NSI en orientación antisentido, seguido de R5 seguido de R1', seguido por el sitio de recombinasa R3' en donde R3'

- está en la orientación opuesta con respecto a R3 (permitiendo la inversión a través de R3/R3'), seguido de un COIN en orientación antisentido, seguido de R5', en donde R5' está en la misma orientación con respecto a R5, seguido por R4', en donde R4' está en la misma orientación con respecto a R4, seguido por R2', en donde R2' se encuentra en la misma orientación con respecto a R2 (permitiendo su delección a través de R2/R2'); (c) la tercera unidad recombinaable está enmarcada por los sitios de recombinasa R3 y R3' en orientación opuesta (permitiendo la inversión a través de R3/R3'), en donde entre R3 y R3' están dispuestos R4, la NSI en orientación antisentido, seguido de R5, seguido de R1'; (d) la cuarta unidad recombinaable enmarcada por los sitios de recombinasa R4 y R4' en la misma orientación, en donde entre R4 y R4' están dispuestos la NSI en orientación antisentido, seguida de R5, seguida de R1', seguida de R3', seguida del COIN en orientación antisentido, seguido de R5', seguido de R4'; y, (e) la quinta unidad recombinaable está enmarcada por R5 y R5' en la misma orientación, en donde entre R5 y R5' están dispuestos R1' seguido de R3' seguido del COIN en orientación antisentido.
- En una realización, R1/R1' y R3/R3' son funcionales con respecto a la misma recombinasa específica del sitio, y dicha misma recombinasa específica del sitio no es funcional con respecto a R4/R4' y R5/R5' y R2/R2'.
- En una realización, R4/R4' y R5/R5' son funcionales con respecto a la misma recombinasa específica del sitio, y dicha misma recombinasa específica del sitio no es funcional con respecto a R1/R1' y R3/R3' y R2/R2'.
- En una realización, R2/R2' son funcionales con una recombinasa, en donde dicha recombinasa no es funcional con respecto a cualquiera de R1/R1', R3/R3', R4/R4' y R5/R5'.
- En una realización, R1/R1' son sitios *FRT*, *FRT3*, *loxP* o *lox2372*. En una realización R3/R3' son sitios *FRT*, *FRT3*, *loxP* o *lox2372*. En una realización R4/R4' son sitios *FRT*, *FRT3*, *loxP* o *lox2372*. En una realización, R5/R5' son sitios *FRT*, *FRT3*, *loxP* o *lox2372*. En una realización, R2/R2' son sitios *Rox*. En una realización, R2/R2' son sitios *attP/attB*.
- En una realización específica, R1/R1' y R3/R3' son funcionales con una recombinasa Flp. En otra realización específica, R1/R1' y R3/R3' son funcionales con una recombinasa Cre.
- En una realización específica, R4/R4' y R5/R5' son funcionales con una recombinasa Cre. En otra realización específica, R4/R4' y R5/R5' son funcionales con una recombinasa Flp.
- En una realización, R2/R2' son sitios *Rox* que son funcionales con una recombinasa Dre. En otra realización, R2/R2' son sitios *attP/attB* que son funcionales con PhiC31 integrasa (ϕ C31_{int}).
- En una realización, el informador se selecciona de: una proteína fluorescente, una proteína luminiscente o una enzima. En una realización específica, el informador se selecciona de GFP, eGFP, CFP, YFP, eYFP, BFP, eBFP, DsRed, MmGFP, luciferasa, *LacZ* y fosfatasa alcalina.
- En una realización, la DSC comprende una secuencia que codifica una actividad seleccionada de neomicina fosfotransferasa (*neo^r*), higromicina B fosfotransferasa (*hyg^r*), puromicina-N-acetiltransferasa (*puro^r*), blasticidina S deaminasa (*bsr^r*), xantina/guanina fosforribosil transferasa (*gpt*), nourseotricina acetiltransferasa (*nat1*) y el virus Herpes simplex timidina quinasa (HSV-tk).
- En una realización, la NSI es un exón de tipo salvaje de un gen. En otra realización, la NSI es un exón de un gen que tiene una o más sustituciones, delecciones o adiciones de ácidos nucleicos.
- En una realización, el COIN comprende un exón de un gen que comprende una o más sustituciones, delecciones o adiciones de ácidos nucleicos. En una realización específica, el COIN comprende un exón de un ser humano, ratón, mono o rata.
- En una realización, el COIN comprende una región 3' de corte y empalme. En una realización específica, la región 3' de corte y empalme es seguida por una secuencia seleccionada de un ADNc, una secuencia de exón-intrón, un microARN, un racimo de microARN, un ARN pequeño, un elemento de salto del codón, un IRES, una secuencia de poliadenilación y una combinación de los mismos. En una realización específica, el ARN pequeño es un mirtrón. En una realización específica, el elemento de salto del codón es T2A, E2A o F2A.
- En una realización, el COIN se selecciona de un informador, un elemento tipo trampa de gen (elemento tipo GT) y un informador tipo trampa de gen (informador tipo GT). En una realización específica, el elemento tipo GT se selecciona de ADNc-poliA de resistencia a fármacos SA. En un caso específico, el informador de tipo GT se selecciona de SA-informador-poliA.
- En una realización, la construcción comprende, además, un brazo de homología aguas arriba de la construcción (un brazo de homología aguas arriba) y un brazo de homología aguas abajo de la construcción (un brazo de homología aguas abajo). En una realización, el brazo de homología de aguas arriba y el brazo de homología de aguas abajo son brazos de homología de ratón o de rata. En una realización específica, los brazos de homología son brazos de homología de ratón y la NSI comprende una secuencia humana. En una realización específica, la secuencia humana comprende un exón humano que es un homólogo de un exón de ratón.

Se describe un alelo multifuncional que comprende dos o más unidades recombinables que son reconocidas por dos o más recombinasas diferentes, estando cada una de las unidades recombinables definida por un par de sitios de reconocimiento de recombinasa compatibles que definen los límites de la unidad recombinable. Cada una de las unidades recombinables comprende uno o más sitios de reconocimiento de recombinasa interna. El uno o más sitios de reconocimiento de recombinasa interna se seleccionan de manera que, tras la recombinación por una primera recombinasa de una unidad recombinable del alelo multifuncional, el uno o más sitios de reconocimiento de recombinasas internas dentro de una unidad recombinable se emparejan entonces con una o más unidades de recombinasa internas dentro de otra unidad recombinable para permitir la inversión y/o delección por la primera recombinasa de una secuencia que se extiende a dos o más unidades recombinables del alelo multifuncional, en donde la inversión y/o delección es posible sólo tras la inversión de los uno o más sitios de reconocimiento de recombinasa interna.

En un caso, la inversión y/o delección va acompañada de la inversión de un sitio de reconocimiento de recombinasa adicional del alelo multifuncional, en donde la inversión del sitio de reconocimiento de recombinasa adicional permite la inversión o delección de un elemento del alelo multifuncional por una segunda recombinasa.

Se describe un alelo multifuncional, que comprende: (a) una primera, una segunda, una tercera, una cuarta y una quinta unidad recombinable, en donde cada una de las unidades recombinables está limitada por sitios de reconocimiento de recombinasa compatibles y en donde la primera unidad recombinable se solapa con la segunda unidad recombinable, y en donde la tercera, cuarta y quinta unidades recombinables están contenidos dentro de la segunda unidad recombinable; (b) una primera unidad recombinable que comprende un aceptor 3' de corte y empalme y una región de corte y empalme enlazada operativamente a una secuencia de accionamiento, una DSC, y una NSI; (c) una segunda unidad recombinable que comprende la DSC, la NSI y un COIN; (d) una tercera unidad recombinable que comprende la NSI; (e) una cuarta unidad recombinable que comprende la NSI y el COIN; (f) una quinta unidad recombinable que comprende el COIN; en donde los alelos multifuncionales comprenden un primer par de sitios de reconocimiento de recombinasa que flanquean la primera unidad recombinable aguas arriba y aguas abajo que permiten en una primera inversión de la primera unidad recombinable, en donde la primera inversión resulta en una segunda inversión de un sitio de recombinasa dentro de la segunda unidad recombinable, en donde la segunda inversión orienta el sitio recombinasa dentro de la segunda unidad recombinable con el fin de suprimir la secuencia de accionamiento y suprimir la DSC.

En un caso, una sola recombinasa reconoce el primer par de sitios de reconocimiento de recombinasa y también suprime la secuencia de accionamiento y la casete de selección de fármacos.

En un caso, la segunda inversión orienta un sitio de recombinación de manera que después de la inversión se forma un segundo conjunto de sitios de reconocimiento de recombinasa que permite la delección de la NSI y/o inversión del COIN.

En un aspecto, la construcción de ácido nucleico proporcionada comprende un MFA que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de la transcripción, un COIN en orientación antisentido, una NSI en orientación antisentido, una DSC y un informador en orientación sentido, en donde tras el tratamiento del MFA con una recombinasa seleccionada, el COIN, la NSI y la DSC se escinden y el informador permanece en orientación sentido; y en donde tras un tratamiento alternativo con una recombinasa seleccionada diferente, el informador y la DSC se escinden, el COIN permanece en orientación antisentido y la NSI se dispone en orientación sentido, de manera que tras un tratamiento adicional con aún otra recombinasa seleccionada diferente, la NSI se escinde y el COIN se dispone en orientación sentido.

En una realización, el MFA comprende una primera unidad recombinable, una segunda unidad recombinable y una tercera unidad recombinable, en donde la primera unidad recombinable solapa a la segunda y tercera unidad recombinable, y en donde la segunda unidad recombinable solapa a la primera y tercera unidad recombinable.

En una realización, la primera unidad recombinable comprende un COIN en orientación inversa (antisentido) y una NSI en orientación inversa, en donde la unidad recombinable está flanqueada aguas arriba del COIN y aguas abajo de la NSI por los sitios de recombinasa compatibles R2 y R2' orientados para dirigir una delección; la segunda unidad recombinable solapa a la primera unidad recombinable, y la segunda unidad recombinable es recombinable por la acción de una recombinasa en un sitio de recombinación aguas arriba de la DSC y un sitio de recombinación aguas abajo del informador, en donde los sitios de recombinación están orientados para dirigir una inversión, y en donde el sitio de recombinación aguas arriba de la DSC es seguido por una secuencia que comprende la NSI. En una realización específica, la MFA comprende, de 5' a 3' con respecto a la orientación en una cadena sentido, un primer sitio de recombinasa R1, un segundo sitio de recombinasa R2, un tercer sitio de recombinasa R3, el COIN en orientación antisentido, un cuarto sitio de recombinasa R4, un quinto sitio de recombinasa R5, un sexto sitio de recombinasa R3' que es compatible con R3 y está orientado para dirigir una delección de la secuencia entre R3 y R3', la NSI en orientación antisentido, un séptimo sitio de recombinasa R2' que es compatible con R2 y está orientado para dirigir una delección de la secuencia entre R2 y R2', un octavo sitio de recombinasa R4', una DSC, un noveno sitio de recombinasa R1' que es compatible con R1 y está orientado para dirigir una delección de la secuencia entre R1 y R1', un informador en orientación sentido y un décimo sitio de recombinasa R5' que es compatible con R5 y está orientado para dirigir una inversión de la secuencia entre R5 y R5'.

En una realización específica, R1/R1' son sitios *Rox*, R2/R2' son sitios *loxP*, R3/R3' son sitios *lox2372*, R4/R4' son sitios *FRT* y R5/R5' son sitios *FRT3*. En una realización específica, el MFA comprende una disposición de sitios de recombinasa y COIN, NSI, DSC y el informador tal como se muestra en la FIG. 11, Panel A. En una realización específica, tras la exposición a una sola recombinasa que reconoce R1/R1', se forma un alelo tal como se muestra en la FIG. 11, Panel B. En una realización específica, tras la exposición a una sola recombinasa que reconoce R4/R4' y R5/R5', se forma un alelo tal como se muestra en la FIG. 11, Panel C. En una realización específica, tras la exposición del alelo de la FIG. 11, Panel C a una recombinasa adicional que reconoce R2/R2' y R3/R3', se forma un alelo tal como se muestra en la FIG. 11, Panel D.

En un aspecto, la construcción de ácido nucleico proporcionada comprende un MFA que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de la transcripción, una NSI en orientación antisentido, una DSC, un informador en orientación sentido y un COIN en orientación antisentido; en donde tras el tratamiento del MFA con una recombinasa seleccionada, la NSI y la DSC se escinden, el informador permanece en orientación sentido y el COIN se mantiene en orientación antisentido; y en donde tras un tratamiento alternativo con una recombinasa seleccionada diferente, la DSC y el informador se escinden, y la NSI se dispone en orientación sentido y el COIN está en orientación antisentido, y en donde después del tratamiento alternativo con la recombinasa seleccionada diferente, el alelo se trata con aún otra recombinasa seleccionada diferente, resultando la escisión de NSI y la disposición del COIN en orientación sentido.

En una realización, el MFA comprende una primera unidad recombinable, una segunda unidad recombinable y una tercera unidad recombinable, en donde la primera unidad recombinable solapa a la segunda y tercera unidad recombinable, y en donde la segunda unidad recombinable solapa a la primera y tercera unidad recombinable. En una realización, la primera unidad recombinable comprende una DSC y un informador en orientación sentido, en donde la unidad recombinable está flanqueada aguas arriba de la DSC por sitios de recombinación R2 seguido de R3, y está flanqueada aguas abajo del informador por sitio recombinasa R3', en donde R2/R3' están orientados para dirigir una inversión, y en donde la DSC está precedida por R2' orientada con respecto a R2 para dirigir una inversión; la segunda unidad recombinable está flanqueada, aguas arriba de la NSI antisentido, por R4 y está flanqueada, aguas abajo del COIN antisentido, por R4', en donde R4/R4' están orientados para dirigir una escisión, y en donde la segunda unidad recombinable incluye la DSC e informador; y la tercera unidad recombinable está flanqueado aguas arriba por R1 y aguas abajo por R1', en donde R1/R1' están orientados para dirigir una escisión, en donde aguas arriba y adyacente a R1' se encuentra la DSC y en donde aguas abajo y adyacente a R1 se encuentra R2. En una realización específica, el MFA comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de la transcripción, R1, R2, R3, R4, la NSI en orientación antisentido, R5, R2', en donde R2/R2' están orientados para dirigir una inversión, la DSC, R1', en donde R1/R1' están orientados para dirigir una inversión, el gen informador, R3', en donde R3/R3' están orientados para dirigir una inversión, el COIN en orientación antisentido, R5', en donde R5/R5' están orientados para dirigir una escisión, y R4', en donde R4/R4' están orientados para dirigir una escisión.

En una realización específica, R1/R1' son sitios *Rox*, R2/R2' son sitios *FRT* o *FRT3*, R3/R3' son sitios *FRT* o *FRT3*, que no son los mismos que R2/R2', R4/R4' son sitios *lox2372* o sitios *loxP*, y R5/R5' son sitios *lox2372* o sitios *loxP* que no son los mismos que R4/R4'.

En una realización específica, el MFA comprende una disposición de sitios de recombinasa y COIN, NSI, DSC y el informador tal como se muestra en la FIG. 12, Panel A. El tratamiento con una recombinasa seleccionada resulta en el alelo mostrado en la FIG. 12, Panel B. El tratamiento alternativo con una recombinasa seleccionada diferente resulta en el alelo mostrado en la FIG. 12, Panel C. El tratamiento del alelo de la FIG. 12, Panel C con aún otra recombinasa diferente resulta en el alelo mostrado en la FIG. 12, Panel D.

En un aspecto, la construcción de ácido nucleico proporcionada comprende un MFA que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de la transcripción, un informador en orientación sentido, una DSC, una NSI en orientación antisentido y un COIN en orientación antisentido; en que después del tratamiento del MFA con una primera recombinasa seleccionada, el informador se escinde, la NSI se dispone en orientación sentido y el COIN permanece en orientación antisentido, y en donde el alelo comprende sitios de recombinasa que permiten una inversión de la secuencia, que tras el tratamiento con una segunda recombinasa seleccionada colocaría al COIN en orientación sentido y la NSI en orientación antisentido. En una realización, a continuación de la primera recombinasa seleccionada, el alelo se trata con la segunda recombinasa seleccionada. En una realización, el COIN señala que la NSI se ha dispuesto en orientación antisentido después del tratamiento con la segunda recombinasa.

En una realización, el MFA comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de la transcripción, un sitio de recombinasa R1, un informador, un segundo sitio de recombinasa R2, una DSC, un tercer sitio de recombinasa R3, una NSI en orientación antisentido, un cuarto sitio de recombinasa R4, un quinto sitio de recombinasa R5, un sexto sitio de recombinasa R1' que es compatible con R1 y que está orientado con respecto a R1 para dirigir una inversión, un séptimo sitio de recombinasa R3' que es compatible con R3 y que está orientado con respecto a R3 para dirigir una inversión, un COIN en orientación antisentido, un octavo sitio de recombinasa R5' que es compatible con R5 y que está orientado con respecto a R5 para dirigir una escisión, un noveno sitio de recombinasa R4' que es compatible con R4 y que está orientado con respecto a R4 para dirigir una escisión y un décimo sitio de recombinasa R2' que es compatible con R2 y que está orientado con respecto a R2 para dirigir una escisión. En una realización específica, R1/R1' son sitios *FRT3* o *FRT*, R2/R2' son sitios *Rox*, R3/R3' son sitios *FRT3* o *FRT*, que son

diferentes de R1/R1', R4/R4' son sitios *loxP* o *lox2372* y R5/R5' son sitios *loxP* o *lox2372* que son diferentes de los sitios R4/R4'.

En una realización específica, el MFA comprende una disposición de sitios de recombinasa y COIN, NSI, DSC e informador tal como se muestra en la FIG. 13, Panel A. El tratamiento con una recombinasa seleccionada resulta en el alelo mostrado en la FIG. 13, Panel B. El tratamiento del alelo de la FIG.13, Panel B con una recombinasa diferente resulta en el alelo mostrado en la FIG. 13, Panel C.

En un aspecto, la construcción de ácido nucleico proporcionada comprende un MFA que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de la transcripción, un COIN en orientación antisentido, una NSI en orientación antisentido, una DSC y un informador en orientación sentido; en que tras el tratamiento del MFA con una primera recombinasa seleccionada, el informador se escinde, la NSI se dispone en orientación sentido, y el COIN permanece en orientación antisentido, y en donde el alelo comprende sitios de recombinasa que permiten una inversión de la secuencia que, tras el tratamiento con una segunda recombinasa seleccionada, dispondría el COIN en orientación sentido y la NSI en orientación antisentido. En una realización, siguiendo a la primera recombinasa seleccionada, el alelo se trata con la segunda recombinasa seleccionada. En una realización, el COIN señala que la NSI se ha dispuesto en orientación antisentido después del tratamiento con la segunda recombinasa.

En una realización, el MFA comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de la transcripción, un sitio de recombinasa R1, un segundo sitio de recombinasa R2, un tercer sitio de recombinasa R3, un COIN en orientación antisentido, un cuarto sitio de recombinasa R4, un quinto sitio de recombinasa R5, un sexto sitio de recombinasa R3' que es compatible con R3 y que está orientado con respecto a R3 para dirigir una escisión, un séptimo sitio de recombinasa R2' que es compatible con R2 y que está orientado con respecto a R2 para dirigir una escisión, una NSI en orientación antisentido, un octavo sitio de recombinasa R4' que es compatible con R4 y que está orientado con respecto a R4 para dirigir una inversión, una DSC, un noveno sitio de recombinasa R1' que es compatible con R1 y que está orientado con respecto a R1 para dirigir una escisión, un informador en orientación sentido y un décimo sitio de recombinasa R5' que es compatible con R5 y que está orientado con respecto a R5 para dirigir una inversión. En una realización específica, R1/R1' son sitios *Rox*, R2/R2' son sitios *loxP* o *lox2372*, R3/R3' son sitios *loxP* o *lox2372* que son diferentes de R2/R2', R4/R4' son sitios *FRT* o *FRT3* y R5/R5' son sitios *FRT* o *FRT3* que son diferentes de R4/R4'.

En una realización específica, el MFA comprende una disposición de sitios de recombinasa y COIN, NSI, DSC y el informador tal como se muestra en la FIG. 14, Panel A. El tratamiento con una recombinasa seleccionada resulta en el alelo mostrado en la FIG. 14, Panel B. El tratamiento del alelo de la FIG.14, Panel B con una recombinasa diferente resulta en el alelo mostrado en la FIG. 14, Panel C.

En un aspecto, la construcción de ácido nucleico proporcionada comprende un MFA que comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de la transcripción, una NSI en orientación antisentido, una DSC, un informador en orientación sentido y un COIN en orientación antisentido; en que tras el tratamiento del MFA con una primera recombinasa seleccionada, el informador se escinde, la DSC se escinde, la NSI se dispone en orientación sentido y el COIN se mantiene en orientación antisentido, y en donde después del tratamiento con la primera recombinasa seleccionada el alelo comprende sitios de recombinasa que permiten una inversión de la secuencia que tras el tratamiento con una segunda recombinasa seleccionada dispondría el COIN en orientación sentido y la NSI en orientación antisentido. En una realización, siguiendo con la primera recombinasa seleccionada, el alelo es tratado con la segunda recombinasa seleccionada. En una realización, el COIN señala que la NSI se ha dispuesto en orientación antisentido después del tratamiento con la segunda recombinasa.

En una realización, el MFA comprende, de 5' a 3' con respecto a la dirección de la transcripción, un sitio de recombinasa R1, un segundo sitio de recombinasa R2, un tercer sitio de recombinasa R3, un NSI en orientación antisentido, un cuarto sitio de recombinasa R4, un quinto sitio de recombinasa R5, un sexto sitio de recombinasa R2' que es compatible con R2 y que está orientado con respecto a R2 para dirigir una inversión, una DSC, un séptimo sitio de recombinasa R1' que es compatible con R1 y que está orientado con respecto a R1 para dirigir una escisión, un informador en orientación sentido, un octavo sitio de recombinasa R3' que es compatible con R3 y que está orientado con respecto a R3 para dirigir una inversión, un COIN en orientación inversa, un noveno sitio de recombinasa R5' que es compatible con R5 y que está orientado con respecto a R5 para dirigir una escisión y un décimo sitio de recombinasa R4' que es compatible con R4 y que está orientado con respecto a R4 para dirigir una escisión. En una realización específica, R1/R1' son sitios *Rox*, R2/R2' son sitios *FRT* o *FRT3*, R3/R3' son sitios *FRT* o *FRT3* que son diferentes de R2/R2', R4/R4' son sitios *loxP* o *lox2372* y R5/R5' son sitios *loxP* o *lox2372* que son diferentes de R4/R4'.

En una realización específica, el MFA comprende una disposición de sitios de recombinasa y COIN, NSI, DSC y el informador tal como se muestra en la FIG. 15, Panel A. El tratamiento con una recombinasa seleccionada resulta en el alelo mostrado en la FIG. 15, Panel B. El tratamiento del alelo de la FIG.15, Panel B con una recombinasa diferente resulta en el alelo mostrado en la FIG. 15, Panel C.

Se describe un alelo multifuncional, que comprende una DSC, un informador, un COIN, una NSI y cinco pares de sitios de recombinasa dispuestos entre el informador, la DSC, el COIN y la NSI, en donde ningún par de sitios de

- recombinasa es idéntico a cualquier otro par, y en donde unos primeros dos pares de sitios de recombinasa son reconocidos por la misma primera recombinasa, unos segundos dos pares de sitios de recombinasa son reconocidos por la misma segunda recombinasa y el quinto par de sitios de recombinasa son reconocidos por una tercera recombinasa, en donde la primera, segunda y tercera recombinasa no son idénticas, y en donde, con respecto a la dirección de la transcripción, el MFA comprende (de 5' a 3'): (a) una secuencia de accionamiento (p. ej., con informador) en orientación sentido, la DSC en orientación sentido o antisentido, la NSI en orientación antisentido, el COIN en orientación antisentido; (b) el COIN en orientación antisentido, la NSI en orientación antisentido, la DSC en orientación sentido o antisentido, el informador en orientación sentido; (c) la NSI en orientación antisentido, la DSC en orientación sentido o antisentido, el informador en orientación sentido, el COIN en orientación antisentido; (d) el informador en orientación sentido, la DSC en orientación sentido o antisentido, la NSI en orientación antisentido, el COIN en orientación antisentido; (e) el COIN está en orientación antisentido, la NSI está en orientación antisentido, la DSC está en orientación sentido o antisentido, el informador está en orientación sentido; o (f) la NSI en orientación antisentido, la DSC en orientación sentido o antisentido, el informador en orientación sentido, el COIN en orientación antisentido.
- En un caso, la disposición es como en (a), y los pares de sitios de recombinasa están dispuestos de manera que tras la exposición a la tercera recombinasa, el quinto par de sitios de recombinasa dirige una escisión de la DSC, la NSI y el COIN, en donde el informador se mantiene en orientación sentido.
- En un caso, la disposición es como en (a), y los pares de sitios de recombinasa están dispuestos de manera que tras la exposición a la primera recombinasa, se forma un MFA modificado, en donde los dos primeros pares de sitios de recombinasa dirigen la escisión del informador y la escisión de la DSC y la inversión de la NSI a una orientación sentido, en donde el COIN se mantiene en orientación antisentido. En un caso adicional, el MFA modificado comprende los segundos dos pares de sitios de recombinasa que, tras la exposición a la segunda recombinasa, resultan en un alelo en donde la NSI se escinde y el COIN se dispone en la orientación sentido.
- En un caso, la disposición es como en (b), y los pares de sitios de recombinasa están dispuestos de tal manera que tras la exposición a la tercera recombinasa, el quinto par de sitios de recombinasa dirige una escisión del COIN, la NSI y la DSC, en donde el informador se mantiene en orientación sentido.
- En un caso, la disposición es como en (b), y los pares de sitios de recombinasa están dispuestos de tal manera que tras la exposición a la primera recombinasa, se forma un MFA modificado en donde los dos primeros pares de sitios de recombinasa dirigen la escisión de la DSC y el informador y la inversión directa de la NSI a la orientación sentido, en donde el COIN se mantiene en orientación antisentido. En un caso adicional, el MFA modificado comprende los segundos dos pares de sitios de recombinasa que, tras la exposición a la segunda recombinasa, dan lugar a un alelo en donde la NSI se escinde y el COIN se coloca en la orientación sentido.
- En un caso, la disposición es como en (c), y los pares de sitios de recombinasa están dispuestos de tal manera que tras la exposición a la quinta recombinasa, la NSI y la DSC se escinden y el informador y el COIN se mantienen en orientación antisentido.
- En un caso, la disposición es como en (c), y los pares o los sitios de recombinasa están dispuestos de tal manera que tras la exposición a la primera recombinasa, se forma un MFA modificado en donde la DSC y el informador se escinden, y la NSI se dispone en orientación sentido, en donde el COIN se mantiene en orientación antisentido. En un caso adicional, el MFA modificado comprende los segundos dos pares de sitios de recombinasa que, tras la exposición a la segunda recombinasa, resultan en un alelo en donde la NSI se escinde y el COIN se dispone en orientación sentido.
- En un caso, la disposición es como en (d), y los pares de sitios de recombinasa están dispuestos de tal manera que tras la exposición a la quinta recombinasa, la DSC, la NSI y el COIN se escinden y el informador se mantiene en orientación sentido.
- En un caso, la disposición es como en (d), y los pares de sitios de recombinasa están dispuestos de tal manera que tras la exposición a la primera recombinasa, se forma un MFA modificado en donde el informador y la DSC se escinden, y la NSI se dispone en orientación sentido, en donde el COIN se mantiene en orientación antisentido. En un caso adicional, el MFA modificado comprende los segundos dos pares de sitios de recombinasa que, tras la exposición a la segunda recombinasa, resultan en un alelo en donde el COIN se dispone en orientación sentido y la NSI se dispone en orientación antisentido.
- En un caso, la disposición es como en (e), y los pares de sitios de recombinasa están dispuestos de tal manera que tras la exposición a la quinta recombinasa, el COIN, la NSI y la DSC se escinden y el informador se mantiene en orientación sentido.
- En un caso, la disposición es como en (e), y los pares de sitios de recombinasa están dispuestos de tal manera que tras la exposición a la primera recombinasa, se forma un MFA modificado en donde la DSC y el informador se escinden, la NSI se dispone en orientación sentido y el COIN se mantiene en orientación antisentido. En un caso adicional, el MFA modificado comprende los segundos dos pares de sitios de recombinasa dispuestos de tal manera

que, tras la exposición a la segunda recombinasa, la NSI se coloca en orientación antisentido y el COIN se coloca en la orientación sentido.

En un caso, la disposición es como en (f), y los pares de sitios de recombinasa están dispuestos de tal manera que tras la exposición a la quinta recombinasa, la NSI y la DSC se escinden, el informador se mantiene en orientación sentido y el COIN se mantiene en orientación antisentido.

En un caso, la disposición es como en (f), y los pares de sitios de recombinasa están dispuestos de tal manera que tras la exposición a la quinta recombinasa, la NSI y la DSC se escinden y el informador se mantiene en orientación sentido y la COIN se mantiene en orientación antisentido.

En un caso, la disposición es como en (f), y los pares de sitios de recombinasa están dispuestos de tal manera que tras la exposición a la primera recombinasa, se forma un MFA modificado en donde la DSC y el informador se escinden y la NSI se dispone en orientación sentido y el COIN se mantiene en orientación antisentido. En un caso adicional, el MFA modificado comprende los segundos dos pares de sitios de recombinasa dispuestos de tal manera que, tras la exposición a la segunda recombinasa, la NSI se dispone en orientación antisentido y el COIN se dispone en orientación sentido.

Se describe un método para producir una célula que comprende una construcción que tiene una secuencia de nucleótidos de interés en orientación antisentido y un COIN en orientación antisentido, que comprende la etapa de introducir en un genoma de una célula un MFA tal como se describe en esta memoria, identificar la célula que comprende el MFA, seguido de una etapa de exponer el genoma a una primera recombinasa, en el que la acción de la primera recombinasa sobre la construcción en el genoma resulta en la secuencia de nucleótidos de interés que se coloca en la orientación sentido.

En un caso, la célula es una célula pluripotente, una célula pluripotente inducida, una célula totipotente o una célula ES. En un caso específico, la célula ES es una célula ES de ratón o de rata.

En un caso, la construcción se introduce en la célula por recombinación homóloga. En otro caso, la construcción se integra aleatoriamente en un ácido nucleico de la célula. En una realización, el ácido nucleico de la célula es el genoma de la célula.

En un caso, la NSI comprende un exón. En un caso, la NSI comprende un exón y una secuencia flanqueante intrónica. En un caso específico, el exón flanqueante está flanqueado en las posiciones 5' y 3' con la secuencia intrónica. En un caso, la secuencia de nucleótidos comprende dos o más exones, y en un caso específico comprende la o las secuencias intrónicas. En otro caso, la NSI carece de un exón, o carece de un fragmento de un exón.

En un caso, la NSI es un exón de tipo salvaje o exones de un gen. En otro caso, la NSI es un exón o exones de un gen que tiene una o más sustituciones, delecciones o adiciones de ácidos nucleicos.

En un caso, el COIN comprende un exón de un gen que comprende una o más sustituciones, delecciones o adiciones de ácidos nucleicos. En un caso específico, el COIN comprende un exón de un gen de ser humano, ratón, mono o rata.

En un caso, el COIN comprende una región 3' de corte y empalme. En una realización específica, la región 3' de corte y empalme es seguida por una secuencia seleccionada de un ADNc, una secuencia de exón-intrón, un microARN, un racimo de microARN, un ARN pequeño, un elemento de salto del codón, un IRES, una secuencia de poliadenilación y una combinación de los mismos. En un caso específico, el ARN pequeño es un mirtrón. En un caso específico, el elemento de salto del codón es T2A, E2A o F2A.

En un caso, el COIN se selecciona de un informador, un elemento tipo trampa de gen (elemento tipo GT) y un informador tipo trampa de gen (informador tipo GT). En una realización específica, el elemento tipo GT se selecciona de ADNc-poliA de resistencia a fármacos SA. En una realización específica, el informador de tipo GT se selecciona de SA-informador-poliA.

Se describe un método para disponer un alelo multifuncional en un genoma de células de ratón, que comprende una etapa de introducir en un locus en una célula de ratón una construcción de fijación de objetivo, que comprende una primera unidad recombinable que comprende (a) una secuencia de accionamiento (p. ej., una secuencia de nucleótidos y/o un informador); (b) una DSC; (c) una NSI en orientación antisentido con respecto al locus; (d) un COIN en orientación antisentido con respecto al locus; y (e) sitios de reconocimiento de recombinasa específica del sitio dispuestos en unidades recombinables para suprimir el informador y la DSC, para invertir la NSI de nuevo a la orientación sentido, y para invertir el COIN y suprimir o volver a invertir la NSI.

En un caso, los sitios de reconocimiento de recombinasa específica del sitio están dispuestos en unidades recombinables de modo que la NSI se volverá a invertir a la cadena antisentido y el COIN se invertirá a la cadena sentido. En otro caso, los sitios de reconocimiento de recombinasa específica del sitio están dispuestos en unidades recombinables de modo que la NSI se suprimirá y el COIN será invertido a la cadena sentido.

En un caso, las unidades recombinables están dispuestos de tal manera que tras la exposición del locus diana modificado con MFA a una primera recombinasa, una primera unidad recombinable que comprende el informador y DSC se suprimen y la NSI se dispone en la orientación sentido con respecto al locus y el COIN se mantiene en la orientación antisentido, formando una segunda unidad recombinable.

- 5 En un caso, la secuencia de nucleótidos de interés en la orientación antisentido es un exón en la orientación antisentido, o un exón flanqueado por la secuencia intrónica, en donde el exón y la secuencia intrónica están cada uno en orientación antisentido. En un caso específico, el exón que se dispone en la orientación antisentido es idéntico al exón que está siendo reemplazado por la construcción de fijación de objetivo. En un caso específico, la NSI en orientación antisentido es un exón y la secuencia que rodea el exón. En un caso específico, la NSI es dos o más exones. En una realización específica, la NSI es una secuencia no exónica.

En un caso, la segunda unidad recombinable generada por la acción de la primera recombinasa se expone a una segunda recombinasa, en donde la segunda recombinasa suprime la NSI y dispone el COIN en la orientación sentido.

- 15 En un caso, la segunda unidad recombinable generada por la acción de la primera recombinasa se expone a una segunda recombinasa, en donde la segunda recombinasa dispone la NSI en orientación antisentido y dispone el COIN en orientación sentido.

- 20 Se describe también un método para la complementación de una inactivación, que comprende introducir en un animal no humano un MFA tal como se describe en esta memoria, en donde la construcción de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico de tipo salvaje en orientación antisentido y un COIN en la orientación antisentido, en el que tras la exposición de la construcción de ácido nucleico a una primera recombinasa la secuencia de ácido nucleico de tipo salvaje se invierte para detectar la orientación y se transcribe, pero el COIN permanece en la orientación antisentido; y en donde tras la exposición a una segunda recombinasa se escinde la secuencia de ácido nucleico de tipo natural, o se invierte de nuevo a la cadena antisentido, y el COIN se invierte para detectar la orientación.

- 25 En un caso, el animal no humano es un ratón.

En un caso, el COIN es un elemento informador. En una realización, el elemento informador se selecciona a partir de una proteína fluorescente, una proteína luminiscente o una enzima. En un caso específico, el informador se selecciona de GFP, eGFP, CFP, YFP, eYFP, BFP, eBFP, DsRed, MmGFP, luciferasa, LacZ, y fosfatasa alcalina.

También se describe una célula de mamífero que comprende un alelo multifuncional de acuerdo con la invención.

- 30 En un caso, la célula de mamífero se selecciona de una célula de ratón y una célula de rata. En un caso, la célula se selecciona de una célula madre, una célula madre embrionaria (ES), una célula pluripotente inducida, una célula pluripotente y una célula totipotente.

También se describe un embrión no humano o animal no humano que comprende un alelo multifuncional de acuerdo con la invención.

- 35 En un caso, el embrión no humano o animal no humano comprende un alelo multifuncional que ha sido expuesto a una o más recombinasas específicas del sitio. En un caso específico, el alelo multifuncional ha sido expuesto a una o más recombinasas específicas del sitio como resultado de una etapa de cultivo en donde un animal no humano que comprende un alelo multifuncional se ha acoplado a un animal no humano que comprende una o más recombinasas específicas del sitio, y el embrión no humano o el animal no humano es una progenie de la etapa de cría.

También se describe una célula que comprende un MFA tal como se describe en esta memoria, en donde la célula es una célula de mamífero, p. ej., una célula ES o una célula pluripotente o pluripotente inducida. En un caso específico, la célula es una célula de ratón o de rata.

- 45 También se describe un animal no humano, que comprende un MFA tal como se describe en esta memoria, o un MFA que ha sido expuesto a uno o más recombinasas tal como se describe en esta memoria.

También se describe un embrión no humano, que comprende un MFA tal como se describe en esta memoria, o un MFA que ha sido expuesto a una o más recombinasas tal como se describe en esta memoria.

También se describe una célula, un embrión no humano o un animal no humano producido utilizando un MFA tal como se describe en esta memoria.

- 50 También se describe una célula, un embrión no humano o un animal no humano producido utilizando un MFA tal como se describe en esta memoria.

Cualquier aspecto o realización se puede utilizar en relación con cualquier otro aspecto o realización, según sea apropiado, p. ej., cualquier informador o DSC reseñado en relación con cualquier realización particular de MFA se

puede utilizar con cualquier realización de MFA descrita en esta memoria, y cualquier recombinasa o sitio de recombinasa particular mencionado en relación con cualquier realización particular de MFA se puede utilizar con cualquier realización de MFA descrita en esta memoria.

5 Se describen otras realizaciones y resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

10 La invención no se limita a métodos particulares, y las condiciones experimentales descritas, ya que tales métodos y condiciones pueden variar. La terminología utilizada en esta memoria es con el fin de describir solamente realizaciones particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones.

15 A menos que se defina lo contrario, todos los términos y expresiones técnicas y científicas utilizadas en esta memoria tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por aquellos expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria se pueden utilizar en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen ahora métodos y materiales particulares.

20 La frase "orientación sentido," o "sentido" se refiere a la dirección de codificación o cadena sentido de una secuencia de ácido nucleico transcribible en el contexto local del genoma, p. ej., cuando una secuencia se dispone en "orientación sentido" en o cerca de una secuencia transcribible en un genoma, la orientación de la secuencia es compatible con la transcripción y, para genes que codifican proteínas, también la traducción de la secuencia en la región o locus o gen en el que se dispone la secuencia. La frase "orientación antisentido" o "antisentido" se refiere a la colocación de una secuencia en una región o locus o gen en el que la secuencia está en la cadena opuesta (o antisentido) a lo que es compatible con la transcripción. Así, en un ejemplo específico, si una secuencia se dispone en orientación "sentido" en un gen, puede generalmente ser transcrito. Si una secuencia se dispone en orientación "antisentido", por lo general no se transcribirá. Para loci en donde la transferencia entre las cadenas sentido y antisentido podría resultar en la transcripción de cualquiera de las hebras, la secuencia puede ser seleccionada o tratada mediante ingeniería genética de tal manera que la transferencia de sentido a antisentido o de antisentido a sentido resultaría en la transcripción de una cadena, pero no cualquiera de las dos.

30 El término "COIN" incluye la referencia a un elemento condicional. Un elemento condicional comprende una secuencia de nucleótidos, cuya expresión (o el fracaso de expresar) está condicionada por la ocurrencia de un evento independiente. Por ejemplo, una región codificadora que en una orientación sentido codificaría una proteína o fragmento de la misma o un ARN no codificante (ARNnc) se dispone en la orientación antisentido, flanqueada por ambos lados por sitios de recombinación específicos del sitio en la orientación opuesta. En ausencia de una recombinasa específica del sitio que reconoce los sitios flanqueantes, la región codificadora no se transcribe, ya que se dispone en la cadena antisentido con respecto al gen diana. Tras el tratamiento con la recombinasa específica del sitio cognato, la secuencia COIN se invierte y, como resultado de ello, se incorpora en el mensaje transcrito, resultando la expresión de la proteína o fragmento de la misma o en la del ARNnc.

35 El término "incompatible", cuando se utiliza para describir dos o más sitios de reconocimiento de recombinasa, se refiere a la calidad que dos o más sitios de reconocimiento de recombinasa no pueden recombinarse entre sí (pero los dos o más sitios de reconocimiento de recombinasa se pueden recombinar con otros sitios de reconocimiento de recombinasa (p. ej., idénticos) cognatos.

Inactivaciones y Alelos Condicionales

45 El estudio de la función del gen por métodos genéticos se ha basado en el descubrimiento de variantes que se producen de forma natural o alelos mutantes, o en la generación deliberada de tales variantes y alelos mutantes. Este último ha procedido ya sea por la mutagénesis aleatoria seguida de rastreos basados en el fenotipo y luego elucidación de la mutación causal - un proceso al que se alude como "genética directa" o mediante la metodología de la ingeniería genética mediante la cual las mutaciones se realizan en genes o loci "diana" específicos - un enfoque al que se ha aludido como "genética inversa".

50 En el ratón - el organismo modelo de mamífero más utilizado - la capacidad de tratar mediante ingeniería genética mutaciones específicas, molecularmente extremadamente bien definidas a través de fijación como objetivo de genes ha dominado el campo de la genética inversa. Sin embargo, la mayoría de las variantes realizadas hasta la fecha han sido alelos nulos relativamente simples, conocidos comúnmente como "alelos inactivados" o simplemente "inactivaciones", y habitualmente abarcan una delección de la región exón-intrón de un gen o parte del mismo, y en años más recientes con la sustitución concomitante de esa región con un ADNc informador, tal como *LacZ*. La adaptación de recombinasa específica del sitio y sus sitios de reconocimiento cognatos (tales como *Cre/lox*, *Dre/Rox*, *PhiC31/int/attP-attB*, *Flp/FRT*), derivados de bacteriófagos o levadura y modificados para su uso en células de mamíferos, es un desarrollo más reciente que no sólo ha hecho posible la escisión posterior a la fijación como objetivo de la DSC (en la medida en que esté flanqueada por sitios de reconocimiento de recombinasas específicas del sitio), sino también ha permitido el tratamiento por ingeniería genética de alelos nulos condicional. Se han

desarrollado alelos nulos condicionales en los que la región de exón-intrón del gen diana - o con más frecuencia una parte del mismo- está flanqueada por sitios de reconocimiento de recombinasa, haciendo que los alelos modificados sean susceptibles de conversión al estado nulo por la acción de la recombinasa cognata. La ventaja de este método sobre inactivaciones regulares es que la conversión del gen modificado en una inactivación puede ser controlada espacio-temporalmente mediante el control del lugar (órgano, tejido o tipo de célula), el tiempo y, a veces, también la duración que la recombinasa cognata estará activa.

Tradicionalmente, los alelos condicionales nulos han sido tratados por ingeniería genética como un seguimiento de los correspondientes alelos inactivados simples, sobre todo en los casos en los que este último sea letal embrionario y/o muestre una pluralidad de fenotipos, por lo tanto, haciendo imposible el estudio de la función del gen diana en un entorno adulto (en el caso de letalidad embrionaria), o difícil de interpretar en un tipo de célula o proceso biológico específico (en el caso en que el gen muestra una pluralidad de fenotipos). Dada la cantidad de esfuerzo, tiempo y dinero que se necesitan para generar ratones modificados genéticamente a través de la fijación como objetivo del gen, se ha considerado onerosa esta manera escalonada de generar primero una inactivación, a continuación descifrar su fenotipo y luego tratar mediante ingeniería genética un nulo condicional por un número creciente de investigadores. Además, para un pequeño número de genes, los alelos inactivados regulares no pueden pasar a través de la línea germinal, ya que son fruto de la letalidad embrionaria incluso en el estado heterocigoto nulo. Por lo tanto, el deseo de ser capaces de tratar mediante ingeniería genética alelos duales (nulos y condicionales) o incluso de múltiples modalidades en una sola etapa de fijación como objetivo del gen ha sido un objetivo persistente de los implicados en la técnica, así como la comunidad de usuarios finales. De hecho, dos métodos han tratado de abordar esta necesidad: FIE_x e Inactivación-primero (KO-primero).

El método FIE_x se ha utilizado tanto para la fijación como objetivo como en calidad de una trampa de genes (GT), pero los principios básicos de diseño son los mismos con independencia de la aplicación final. Un diseño básico de un FIE_x se muestra en la FIG. 1, representando U, p. ej., una DSC y representando D un informador. El resultado de la acción de recombinasa en la construcción FIE_x es la supresión permanente del elemento U (p. ej., la DSC) y la inversión (y expresión) del elemento D (p. ej., el informador).

En su realización y aplicación originales, FIE_x fue desarrollado como un método para tratar mediante ingeniería genética alelos condicionales. FIE_x se utilizó por primera vez para generar un alelo "nulo condicional" para *Rarg*, mediante la inserción de la casete FIE_x en este gen, de manera que un cuplete *loxP/lox511* se insertó aguas arriba del exón 8 de *Rarg*, y el resto de la casete FIE_x - compuesto 5' a 3' de *SA-lacZ-SV40poliA* (un elemento de tipo GT) en la orientación antisentido con respecto a *Rarg*, y luego otro cuplete *loxP/lox511* en la orientación antisentido con respecto al primer cuplete *loxP/lox511*, y que contiene un mini-gen de neomicina fosfotransferasa (*neo*) en la orientación sentido dentro del intrón-8 en de *Rarg*. Este diseño refuerza la inversión mediada por Cre del elemento de tipo GT *SA-lacZ-SV40poliA* de modo que se introduce en la cadena sentido y actúa como una trampa de genes; simultáneamente, el exón 8 de *Rarg* se coloca en la orientación antisentido (garantizando de manera eficaz que, incluso en el caso en que la transcripción no termina en el extremo del elemento de tipo GT *SA-lacZ-SV40poliA*, el exón 8 no se incorporará en el mensaje de lectura), mientras que *neo* se elimina simultáneamente, y resulta con ello en un alelo nulo de *Rarg* en el que la expresión de *Rarg* se sustituye por la de *lacZ*.

Sin embargo, a pesar del éxito de este método en la generación de un alelo nulo (por la exposición a Cre), el alelo (pre-Cre) FIE_x no reordenado de *Rarg* no era un nulo condicional verdadero tal como fue diseñado originalmente, sino un alelo hipomórfico severo, en donde la expresión de *Rarg*^{FIE_x} se redujo significativamente en comparación con *Rarg*. Como resultado, ratones *Rarg*^{FIE_x/FIE_x} muestran un fenotipo que se asemejaba a una forma menos severa de los ratones inactivados *Rarg*, y revelando la incapacidad de esta realización inicial de FIE_x de generar un alelo nulo condicional verdadero.

El método FIE_x se ha adaptado también para su uso en el atrapamiento de genes. En esa variación del método, un elemento GT (*SA βgeo-poliA*, en que *βgeo* es una fusión en marco de *lacZ* con marcos de lectura abiertos *neo*, por lo tanto, la combinación de la capacidad de informar a través de LacZ y seleccionar a través de Neo) estaba flanqueado por dos series de tipo FIE_x, una serie externa compuesta de un cuplete *FRT/FRT3* y una serie interna compuesta de un cuplete *loxP/lox511*, tanto en la configuración de imagen especular con respecto a la otra. De esta manera, la incorporación con éxito del vector GT resultante en genes transcritos activamente resultaría en la expresión de *βgeo* y, por lo tanto, permitiría la selección de estos eventos mediante la selección de G418 y, dependiendo del sitio de incorporación del elemento de GT teóricamente también resultaría en la generación de alelos nulos funcionales para los genes correspondientes. Una vez que un gen ha sido atrapado para generar el correspondiente alelo FIE_x, el alelo resultante puede ser un alelo inactivado o un alelo hipomórfico, es decir, uno en el que está regulada a la baja la expresión del gen atrapado. El tratamiento de estos alelos FIE_x con FLP recombinasa debería, en principio, invertir el elemento de GT a la cadena anti-sentido, aliviando de ese modo la terminación de la transcripción dentro del elemento de trampa y, por lo tanto, convertiría el gen modificado en GT condicional. Este GT condicional, ahora "oculto" en la hebra antisentido, puede ser reactivado por la exposición a Cre, que volverá a invertirlo actuando sobre los cupletes *loxP/lox511* de la serie FIE_x.

Esta aplicación de la tecnología FIE_x se basa en un elemento GT para generar alelos nulos. Por lo tanto, está sujeta a las limitaciones de la tecnología de atrapamiento de genes, lo cual no garantiza que se genere una verdadera inactivación y se asume el riesgo adicional de inactivar elementos reguladores (por inactivación insercional

aleatoria). Tanto la disposición del elemento GT, como el grado de que es eficaz en la terminación de la transcripción pueden afectar si cualquier alelo dado será un alelo nulo. Un problema adicional es que para la mayoría de genes que no tienen una función ya establecida, y más aún uno que enlaza el gen a un fenotipo determinado mediante el estudio de un alelo nulo definitivo, es muy difícil demostrar de manera concluyente que un alelo GT es verdaderamente un alelo nulo. De hecho, por estos y otros motivos, en su mayoría técnicos, después de 4 años de adopción y el uso de un consorcio de mutagénesis de ratones a gran escala - EUCOMM- el método de atrapamiento de genes basado en FIEEX ha sido abandonado en favor de la fijación como objetivo de genes utilizando el método KO-primeras.

De manera similar al método FIEEX, los actuales alelos KO-primeras típicos se basan, al menos en parte, en un elemento tipo GT (ya sea *SA-lacZ-poliA* o *SA β geo-poliA*) para generar un alelo inactivado similar. Sin embargo, en el reconocimiento de las limitaciones que se han asociado con ese enfoque (aprendiendo efectivamente de la experiencia adquirida con los GTs, así como consideraciones teóricas), la KO-primeras también requiere que el exón crítico flanqueado por sitios *loxP* aguas abajo del elemento de tipo GT debe ser suprimido (utilizando Cre) con el fin de generar un alelo nulo verdadero. Por lo tanto, en la práctica, este método requiere primero la colocación de una casete de informador/tipo GT flanqueada por *FRT* más un mini-gen de fármaco en un intrón del gen diana en algún lugar aguas arriba del exón a ser suprimido, mientras que flanqueando por sitios *loxP* simultáneamente el exón programado para ser suprimido. A este exón se le ha aludido como el "exón crítico", y con independencia de los criterios que se utilizan para definir el "exón crítico", el método de KO-primeras requiere claramente su separación con el fin de hacer que el alelo resultante sea un nulo verdadero. Por lo tanto, después de la fijación como objetivo, el alelo resultante no es ni un alelo nulo verdadero ni un alelo nulo condicional. Las razones por las que el alelo resultante no es un nulo verdadero se han atribuido al hecho de que, sin la separación del exón crítico (que está flanqueado por sitios *loxP*) por Cre, sigue existiendo la posibilidad de la transcripción revisada y el corte y empalme alrededor de la casete de tipo GT, así como la transcripción del mensaje del gen aguas abajo de la casete de tipo GT debido a la presencia del mini-gen de fármacos. La razón de que el alelo resultante no sea un alelo nulo condicional reside en el hecho de que sin la separación tanto de la casete informador/tipo GT como del mini-gen de fármacos, no puede tener lugar la generación del mensaje normal (composición normal, así como el nivel y los sitios de expresión).

Por lo tanto, dependiendo del uso, los alelos - nulo o nulo condicionado KO-primeras deben someterse a una segunda etapa de posfijación como objetivo. En el caso de que se desee un nulo verdadero, el alelo de KO-primeras debe ser tratado con recombinasa Cre para suprimir el exón crítico (que está flanqueado por sitios *loxP*).

Por el contrario, un alelo condicional se puede generar después de una separación mediada por Fip de la casete informador/tipo GT y el mini-gen de fármacos, que están juntos flanqueado por sitios *FRT*. De esta manera, las únicas modificaciones que quedan son un sitio *FRT* y el exón "crítico" flanqueado por sitios *loxP*. Este alelo, a su vez, se puede convertir en nulo por separación mediada por Cre del exón flanqueado por sitios *loxP*.

Aunque el método KO-primeras aborda algunas de las limitaciones del FIEEX, sigue siendo obstaculizado por tres inconvenientes principales que limitan su utilidad: en primer lugar, a pesar de que rectifica la falta de fiabilidad de elementos tipo GT para generar una KO-primeras verdadera, fracasa en proporcionar una KO-primeras verdadera, sin una etapa de posfijación como objetivo adicional; en segundo lugar, debido a los criterios utilizados para definir "exones críticos", la KO-primeras se limita a genes codificadores de proteínas, efectivamente colocando fuera del alcance de todos los genes codificadores no proteicos (es decir, los que codifican ARNs 'no codificantes', una clase de las biomoléculas muy importantes). Además de ello, de los genes codificantes de proteínas sólo aquellos para los que se puede definir un "exón crítico" son susceptibles de un diseño de KO-primeras. Los criterios para definir un exón crítico son que su delección resulte en un desplazamiento de marco entre la parte del marco de lectura abierto (ORF) que lo precede y la parte del ORF que le sigue. Esto se debe a que la inducción de este desplazamiento de marco es obligatoria para que el método de KO-primeras proporcione una inactivación definitiva. Por lo tanto, incluso ciertas clases de genes que codifican proteínas no son susceptibles de un diseño de KO-primeras. Estos incluyen genes en que el ORF está contenido dentro de un exón, y genes en que todos o la mayoría de los exones en tándem quedan fuera en el mismo marco. En tercer lugar, una vez que el alelo de KO-primeras se ha convertido en un alelo nulo condicional (por la acción de Fip), el alelo resultante no proporciona mecanismo alguno para el informe afirmativo de nulidad después de la conversión del alelo condicional al estado nulo. Típicamente, los alelos inactivados primero separan el informador (p. ej., *lacZ*) junto con la DSC utilizando (una etapa conseguida utilizando Fip recombinado, tal como *SA-lacZ-poliA* y DSC utilizada en KO-primeras son *FRTed*) dejando tras de sí sólo el exón flanqueado por sitios *loxP* (más un sitio *FRT* aguas arriba del mismo). Por lo tanto, no hay opción de enfoques de inactivación-primeras convencionales para una función del informador para informar del logro de un alelo nulo.

Alelos Multifunciones

Se proporciona un enfoque de un alelo multifuncional (MFA) que permite la separación o inactivación de una secuencia de nucleótidos en un genoma por la introducción de un conjunto de elementos funcionales que comprenden una secuencia de accionamiento (que confirma la separación o inactivación), resultando una inactivación verdadera, y que también contienen uno o más elementos condicionales cuya expresión en el alelo es condicional (es decir, depende de determinados eventos moleculares o señales) y reseñable.

El enfoque de MFA proporciona opciones de fijación de objetivo para generar verdaderos alelos de inactivación-primera que no requieren una segunda etapa de posfijación de objetivo para convertir los alelos fijados como objetivo en estado nulo, proporcionando así una ventaja y avance conceptual frente a alelos de inactivación-primera típicos actuales que requieren una etapa de posfijación de objetivo para convertir alelos fijados como objetivo en alelos nulos. El enfoque de MFA tampoco se limita al uso con "exones críticos" y no se limita a inactivaciones por desplazamiento del marco, sino que es generalmente aplicable para modificar cualquier secuencia de nucleótidos de interés. Los MFAs proporcionan una versatilidad reforzada y una multiplicidad de opciones de alelos después de una sola etapa de fijación de objetivo.

El enfoque de MFA proporciona un alelo de KO-primera verdadero que proporciona la oportunidad de crear un segundo estado en el genoma del receptor tras la inversión de cualquier secuencia seleccionada ligada a una secuencia de accionamiento, y en donde se puede reseñar tras la transcripción por inversión de la secuencia seleccionada. La secuencia seleccionada puede ser, p. ej., un COIN, que, sin limitación, puede por sí mismo comprender una secuencia de accionamiento que, p. ej., comprende un represor para controlar la transcripción de otro gen o secuencia reguladora. En un ejemplo, una sola etapa de fijación de objetivo colocando un MFA en un locus puede permitir la modificación de un locus de tipo salvaje a un estado particular, el Estado A (p. ej., una inactivación de un gen endógeno). El MFA está diseñado para permitir un cambio de un estado a otro estado particular, el Estado B (p. ej., el restablecimiento de un fenotipo de tipo salvaje) a través de la acción de una primera recombinasa. El estado B se puede convertir en el Estado C (p. ej., restablecimiento de la inactivación y la expresión de un COIN) por una segunda recombinasa, y así sucesivamente. Por lo tanto, se pueden alcanzar diferentes estados en un locus seleccionado a partir de un único alelo inicial cuando se emplean MFAs.

El enfoque del MFA se puede utilizar para disponer un MFA como una trampa de genes, de manera que el transgén que comprende el MFA obtiene la expresión de elementos del MFA empleando un promotor transcripcionalmente activo endógeno.

El enfoque del MFA puede ser utilizado en aplicaciones de transgénesis tradicionales en donde la secuencia de accionamiento comprende un promotor, exón o exones e intrones y, opcionalmente, elementos de control de la transcripción y seguido por una DSC (opcional, ya que no es necesario para una transgénesis basada en una inyección pronuclear tradicional), una NSI (que puede ser una segunda secuencia de accionamiento) en la orientación antisentido con respecto a la primera secuencia de accionamiento, y un COIN (que puede ser una tercera secuencia de accionamiento) también dispuesto en la orientación antisentido con respecto a la primera secuencia de accionamiento.

El enfoque de MFA ofrece una multiplicidad de opciones para la creación de loci que contienen alelos nulos, alelos nulos condicionales, COINs, secuencias de accionamiento (que puede incluir informadores) y DSCs, y otros elementos, en una sola etapa de fijación de objetivo. Manipulaciones posfijación de objetivo del locus proporcionan opciones a través del uso de unidades recombinables introducidas en el locus que contiene MFA, con la construcción MFA en la etapa de fijación de objetivo única. El número de diferentes recombinasas requeridas para ejercer las diversas opciones manipulables en el locus posfijación de objetivo se reduce mediante el empleo de diferentes pares de sitios de reconocimiento de recombinasas específicas del sitio cognatas que son incompatibles (p. ej., un par de sitios *FRT* y un par de sitios *FRT3*, un par de sitios *loxP* y un par de sitios *lox2372*, etc.). Por lo tanto, la exposición de un locus que contiene MFA a una sola recombinasa puede actuar independientemente sobre al menos dos unidades recombinables diferentes, para recombinar una unidad de tal manera que la unidad dispone elementos de interés (p. ej., informadores, DSCs, exones, COINs, etc.) en orientaciones deseadas, así como para re-orientar lugares de reconocimiento de recombinasa específica del sitio dentro de la unidad recombinable para formar nuevas unidades recombinables.

El enfoque de MFA proporciona una opción para un COIN que puede contener cualquier secuencia deseada, incluyendo pero no limitado a un informador, o un ADNc que codifica una forma mutante o variante del gen diana o parte del gen diana, o parientes y homólogos del gen diana, o incluso secuencias codificadoras no proteicas tales como microARNs o racimos de microARNs, o cualesquiera combinaciones de estos elementos (ya que pueden ser acomodados por la colocación de sitios de entrada al ribosoma interno o péptidos de "auto-escisión"- dependiendo de la elección de los elementos-entre los diferentes elementos).

El enfoque de MFA proporciona una opción en donde la inactivación se consigue mediante la fijación de objetivo, se emplea una primera recombinasa para restablecer el elemento inactivado de nuevo en un estado de (tipo salvaje) activo, y se emplea una segunda recombinasa para restablecer la inactivación, en donde un COIN se dispone en orientación sentido concomitante con el restablecimiento o la inactivación del elemento inactivado, reseñando así el restablecimiento de la inactivación en las células en que la segunda recombinasa ha sido activado.

Aunque los enfoques actuales de inactivación-primera carecen de un mecanismo para informar la nulidad tras la conversión de un alelo condicional a nulo, el enfoque de MFA proporciona una opción para un elemento de información (p. ej., un COIN, véanse la FIG. 5 y la FIG. 6, en la parte inferior; detectable por genotipado y/o por visualización u otra determinación cualitativa o cuantitativa, opcionalmente a nivel de célula) que, tras la acción de una segunda recombinasa invierte o invierte y escinde una secuencia de nucleótidos de interés (p. ej., un exón y la secuencia circundante, NSI en la FIG. 5 y la FIG. 6) y dispone el elemento informador en orientación sentido,

reseñando de manera efectiva la inversión y/o escisión de la NSI. En esta realización, un alelo nulo después de una sola etapa de fijación de objetivo se convierte, por una primera recombinasa, en un alelo restaurado (en esta realización, NSI de la FIG. 5 y la FIG. 6 es un exón y que rodea la secuencia o el gen o parte del mismo reemplazado por el vector de orientación), y por una segunda recombinasa en un alelo nulo que informa de su presencia mediante la disposición del COIN en la orientación sentido.

Por lo tanto, el enfoque de MFA proporciona una opción para la evaluación de un efecto fenotípico de una inactivación (después de la etapa de fijación de objetivo), a continuación, exposición a una primera recombinasa para restablecer el exón inactivado o gen o región del mismo, evaluando el efecto fenotípico del restablecimiento – es decir, la conversión de nuevo al tipo salvaje (una etapa equivalente a un ensayo de complementación, pero desprovisto del requisito de generar una nueva línea de ratones transgénicos, un requisito que ha acompañado tradicionalmente el análisis de complementación), luego exponiendo opcionalmente a la segunda recombinasa para restablecer la inactivación y evaluando el efecto fenotípico de restablecer el alelo nulo. Por lo tanto, el alelo de MFA combina un enfoque de inactivación-primera verdadera con la versatilidad de elementos adicionales (condicionales), y la capacidad de realizar un análisis del tipo de complementación verdadero en un animal genéticamente modificado, en un protocolo que comprende una única etapa de fijación de objetivo.

En una aplicación del MFA, se describe un método para un ensayo de complementación, que comprende fijar como objetivo un alelo endógeno de una célula con un MFA de acuerdo con la invención, a continuación, en una etapa posfijación de objetivo, generar un alelo condicional nulo a partir del MFA (por exposición a una primera recombinasa), en donde la secuencia de nucleótidos de interés en el MFA comprende un exón o un exón más secuencia circundante, u otra región de interés (asociada, por ejemplo, con un fenotipo) en la orientación sentido, y evaluar el efecto fenotípico del alelo condicional nulo (que debería ser de tipo salvaje). En una realización adicional, el MFA se expone, además, a una segunda recombinasa que restablece la nulidad y, opcionalmente, se mide de nuevo un efecto fenotípico. En una realización específica, la segunda recombinasa también dispone un informador condicional (p. ej., un COIN) en la orientación sentido, en donde el informador condicional informa de la conversión del alelo condicional nulo en un alelo nulo o, en su caso, informa del restablecimiento de nulidad.

En una realización, la NSI comprende un exón y una secuencia intrónica vecina, o una región de exón-intrón de un gen diana. En otra realización, la NSI comprende una región que codifica un ARNnc, microARN, racimo de microARN u otro(s) ARnc pequeños.

Los MFAs son alelos que se pueden disponer de forma aleatoria o fijar como objetivo a un lugar de elección en un genoma. El MFA está tratado por ingeniería genética para producir alelos nulos, condicionales o una combinación de alelos condicionales/nulos, mediante una disposición juiciosa de las secuencias entre una serie de pares de sitios de reconocimiento de recombinasas específicas del sitio cognatas. Los alelos resultantes, producidos por la disposición de construcciones en un genoma son manipulables por parte de recombinasas seleccionadas, que pueden ser introducidas en la construcción en el genoma de forma transitoria o a través de cría de un animal que comprende la construcción en su genoma con un animal que comprende un gen para una recombinasa seleccionada (p. ej., una cepa que expresa Cre, Flp o PhiC31^{int}).

En diversas realizaciones, se proporcionan métodos y composiciones para generar un alelo de inactivación-primera verdadero, en que la nulidad no depende de la realización de una segunda etapa tal como, p. ej., la separación de un "exón crítico" o una "región crítica", por la acción de una recombinasa. De acuerdo con ello, se proporcionan realizaciones para generar en una única etapa de fijación de objetivo un alelo que es multifuncional, ya que es un alelo de inactivación-primera verdadero con un informador, logrado en una sola etapa de recombinación y de fijación de objetivo.

Los métodos y composiciones para generar alelos inactivados por el enfoque de MFA no están limitados por un requisito de generar un desplazamiento de marco a través de la delección de la inversión de un exón crítico para generar un alelo nulo, tal como se requiere por algunos tipos de alelos inactivados (p. ej., KO-primera o algunas realizaciones de FIE). En su lugar, el método de MFA se basa en su capacidad de separar la NSI de la unidad de transcripción del gen diana en el momento de la fijación de objetivo, al tiempo que simultáneamente reemplaza la expresión de la NSI con la de una secuencia de accionamiento. La secuencia de accionamiento puede comprender un elemento tipo GT (p. ej., un informador tal como *SA-lacZ-poliA*), un ADNc, un exón o exones, elementos reguladores (p. ej., potenciadores, aisladores, operadores). Dado que la secuencia de accionamiento está definida por el experimentador, los alelos que no sean nulos se pueden hacer igualmente bien. Por ejemplo, la secuencia de accionamiento puede codificar un gen negativo dominante o un gen constitutivamente activo o una forma activada de un gen.

En diversas realizaciones, el MFA comprende una secuencia de nucleótidos de interés y un COIN que están cada uno en orientación antisentido en el alelo resultante, y que comprenden, además, una secuencia de accionamiento y/o una DSC tanto en orientación sentido en el alelo (o en orientaciones sentido y antisentido, o cada uno de forma independiente en orientación sentido o antisentido), con lo cual tras la exposición a una primera recombinasa se suprimen la secuencia de accionamiento y/o la DSC, la secuencia de nucleótidos de interés se invierte a una orientación sentido y el COIN se mantiene en la orientación antisentido. El alelo comprende, además, sitios de recombinación situados con el fin de permitir la inversión simultánea posterior por una segunda recombinasa de la

secuencia de nucleótidos de interés y el COIN, de manera que tras la acción de la segunda recombinasa, la secuencia de nucleótidos de interés se dispone en orientación antisentido y el COIN se dispone en orientación sentido. En una realización adicional, el nucleótido de interés se suprime tras el tratamiento con la segunda recombinasa, dejando al COIN en la orientación sentido. En una realización específica, el COIN es un informador o una DSC. En otra realización específica, el nucleótido de interés es un exón o región de interés de un gen de una especie (p. ej., exón de ratón, rata, primate no humano o ser humano) y el COIN es un exón de un gen de otra especie (p. ej., exón de ratón, rata, primate no humano o ser humano).

El enfoque de MFA también permite un enfoque de atrapamiento de genes. En esta realización del enfoque de MFA, un MFA se inserta en un locus transcripcionalmente activo. Esto puede conseguirse por recombinación aleatoria, o por "atrapamiento fijado como objetivo" (véase, p. ej., la patente de EE. UU. N° 7.473.557). Una secuencia de accionamiento precedida por un aceptor de corte y empalme y una región de corte y empalme y seguida por una señal de poliA proporciona una inactivación o "derribo" de cualquier secuencia genómica transcrita existente. La inclusión de una DSC sin promotor, es decir, una cuya expresión depende de la inserción dentro de la cadena sentido de un locus transcripcionalmente activo, asegura la selección positiva de células que contienen el MFA. La inclusión de una secuencia de nucleótidos de interés (NSI) en orientación antisentido, junto con un COIN en orientación antisentido, en unión con una disposición recomendada de sitios de reconocimiento de recombinasas específicas del sitio, proporciona la capacidad de expresar condicionalmente la NSI (a partir del promotor del locus atrapado), tras la exposición a una primera recombinasa. Después, tras la exposición a una segunda recombinasa, la expresión de la NSI se puede desactivar y al mismo tiempo reemplazar por la del COIN. La DSC sin promotor asegurará que cualquier célula seleccionada tenga la capacidad de expresar la NSI sin promotor y el COIN sin promotor, y que la expresión se hará de acuerdo con el patrón de expresión endógena del locus transcripcionalmente activo.

Ciertos enfoques ventajosos utilizando MFAs se describen convenientemente en relación con realizaciones particulares (es decir, con referencia a alelos que comprenden sitios específicos denominados recombinasa y secuencias de nucleótidos tal como se muestra en las figuras) para conveniencia y no a modo de limitación, es decir, recombinasas y sitios de reconocimiento de recombinasa, secuencias de accionamiento, informadores, DSCs y secuencias de nucleótidos de interés adecuados pueden ser rutinariamente elegidos basándose en la descripción en esta memoria. La "secuencia de nucleótidos de interés" o "NSI" puede ser cualquier secuencia de nucleótidos de interés, p. ej., un exón, un exón más secuencia(s) flanqueante(s), dos o más exones, un fragmento de una secuencia codificadora, una secuencia codificadora completa, un elemento regulador o secuencia, una secuencia codificadora no proteica, un intrón, o cualesquiera de sus combinaciones, etc. Los COINs pueden comprender ADNcs, así como secuencias codificadoras que no son proteínas y pueden incorporar elementos tales como señales y sitios de poliadenilación, microARNs u otros ARNs codificadores no proteicos, IRES, péptidos de salto del codón, y cualquier combinación de los mismos. Determinados COINs y algunos sistemas para utilizar los mismos puede encontrarse, p. ej., en la patente de EE. UU. N° 7.205.148.

Se proporcionan métodos y composiciones para producir y utilizar MFAs en cualquier célula, incluyendo células animales no humanas y en animales no humanos. Los métodos y las composiciones se pueden emplear utilizando la recombinación homóloga (o integración aleatoria) para disponer alelos útiles en cualquier sitio seleccionado (o sitio aleatorio) en el genoma de una célula. Los métodos y las composiciones se pueden utilizar en células pluripotentes, pluripotentes inducidas y totipotentes. Células adecuadas para su uso con los métodos y las composiciones incluyen células ES, p. ej., de ratón, o células ES de rata. En diversos casos, se describen alelos de KO-primeros verdaderos que otorgan una opción para una funcionalidad condicional con una función de informador integrada.

En la FIG. 2 se ilustra un ejemplo de cómo se puede diseñar una disposición de elementos y sitios de reconocimiento de recombinasa para crear una construcción que eliminarán la función del gen diana (es decir, crearán un alelo nulo), o para alterar la función del gen diana (p. ej., convirtiéndolo en un alelo dominante negativo, constitutivamente activo o hipomórfico), mientras que al mismo tiempo integran todos los elementos aguas abajo que permitirán (a) la generación de un alelo condicional, y (b) su inversión a un nulo con un informador.

La FIG. 2 muestra una realización de un MFA que se puede disponer en un genoma (p. ej., se muestran utilizando brazos de homología a la izquierda y derecha de la MFA). La posfijación de objetivo, el alelo resultante se puede convertir en un alelo condicional, lo cual se logra mediante la eliminación de una primera secuencia seleccionada y la inversión de una segunda secuencia seleccionada. La delección y la inversión se pueden conseguir por la misma recombinasa o una recombinasa diferente. Por ejemplo, se pueden utilizar dos pares de sitios de reconocimiento Flp incompatibles – uno para dirigir la delección y el otro para dirigir la inversión. Un ejemplo de dos de tales sitios Flp son sitios *FRT* y sitios *FRT3*. En otro ejemplo, se pueden utilizar dos pares de sitios Cre incompatibles, p. ej., *loxP* y *lox2372* – uno para dirigir la delección y el otro para dirigir la inversión. Además, se pueden utilizar dos recombinasas diferentes (p. ej., un par de sitios *loxP* con Cre y un par de sitios *FRT* con Flp). Para esta realización se pueden elegir cualesquiera sitios adecuados, siempre que los sitios puedan dirigir la delección e inversión de pares de sitios de recombinasa del MFA mostrado en la FIG. 2 (realizaciones específicas que se muestran en la FIG. 5 y la FIG. 6).

Aunque el diseño de construcción de la FIG. 2 se puede utilizar con cualquiera de las secuencias de interés (es decir, NSI es cualquier secuencia de interés), el diseño de la construcción puede ser particularmente útil para reemplazar un exón de interés por un exón modificado.

En una realización, la NSI es un exón (o exones) que se produce de forma natural, y el COIN es un exón modificado (p. ej., un exón que comprende una mutación). El MFA se dispone en un genoma de, p. ej., una célula ES de ratón mediante, p. ej., la recombinación homóloga (utilizando brazos de homología de ratón adecuados) y la célula ES se emplea para producir un ratón genéticamente modificado que comprende la construcción en la línea germinal del ratón. En una realización, el cambio de estado del exón que se produce de forma natural al exón modificado se consigue por la acción de una recombinasa en el MFA.

En una realización, la construcción se dispone en un genoma de, p. ej., un ratón, y el ratón comprende, además, una recombinasa (p. ej., Cre) cuya actividad se puede regular. Una recombinasa puede ser regulada, p. ej., empleando una proteína de fusión que dispone la recombinasa bajo el control de un efector o metabolito (p. ej., CreER^{T2}, cuya actividad está controlada positivamente por tamoxifeno), disponiendo la recombinasa bajo el control de un promotor específico para el tejido, o disponiendo la recombinasa bajo el control de un promotor (u otro elemento regulador) que es activo en una fase particular del desarrollo (p. ej., un promotor Nanog), o un promotor inducible (p. ej., uno cuya actividad está controlada por doxiciclina y TetR o variantes de TetR), o combinaciones de estas tecnologías.

La realización de MFA mostrada en la FIG. 2 porta elementos que comprenden una secuencia que codifica una secuencia de accionamiento, una DSC, una secuencia de nucleótidos de interés (NSI) y un COIN, en donde los elementos están dispuestos entre una serie de sitios de reconocimiento de recombinasa que se seleccionan con el fin de proporcionar una funcionalidad deseada al MFA.

La parte superior de la FIG. 2 ilustra una secuencia de nucleótidos de interés (NSI) en un genoma de elección (p. ej., una NSI en un genoma de ratón). Un MFA tal como el mostrado se introduce en el genoma, p. ej., mediante recombinación homóloga para reemplazar la NSI. La NSI es reemplazada por el MFA mostrado, en que la NSI del MFA se invierte tal como se muestra y, por lo tanto, ya no se incorpora en la transcripción del gen diana. La presencia del MFA puede ser convenientemente confirmada si la secuencia de accionamiento contiene un informador (p. ej., un *lacZ*). Una DSC está presente también, para ayudar en la selección de células modificadas (p. ej., células ES de ratón modificadas con el MFA).

El MFA de la realización de la FIG. 2 comprende cinco unidades distintas de la secuencia, que se definen por cinco conjuntos de sitios de reconocimiento de recombinasa. La FIG. 3 contiene una representación conceptual de las cinco unidades de secuencia distintas flanqueadas por sitios de reconocimiento de recombinasas compatibles.

La primera unidad recombinable distinta comprende sitios R1/R1' (p. ej., sitios *FRT3*) en orientación opuesta (es decir, dirigiendo una inversión), en donde entre los sitios R1/R1' está dispuesto lo siguiente: una secuencia de accionamiento (una región 3' de corte y empalme y aceptor 5' con respecto a la secuencia de accionamiento, y una señal poliA 3' con respecto a la secuencia de accionamiento, no se muestran en la FIG. 3 en aras de la simplicidad), un sitio R2 (p. ej., un sitio *Rox*), una DSC, un sitio R3 (p. ej., un sitio *FRT*) en la misma orientación que el sitio R1, un sitio de R4 (p. ej., un sitio *loxP*) y una secuencia de nucleótidos de interés (NSI) en orientación antisentido con respecto a la dirección de la transcripción (es decir, codificada por la cadena antisentido) del gen diana, y un sitio R5 (p. ej., un sitio *lox2372*) en la misma orientación que el sitio R4. En los casos en los que un sitio R3' (en orientación opuesta del sitio R3 mostrado en la FIG. 3A) se incluye adicionalmente aguas abajo del sitio 3' R1', la unidad en presencia de una recombinasa que reconoce R1/R1' invertirá la NSI a una posición para la transcripción y suprimirá la secuencia de accionamiento y la DSC. En una realización, una secuencia adicional incluye un COIN dispuesto en la cadena antisentido y es seguida por un sitio R4' (p. ej., un sitio *loxP*) que está en orientación opuesta con respecto al sitio R4 de la unidad, de manera que tras la exposición a una recombinasa que reconoce R4/R4' (p. ej., Cre), el COIN se invierte de manera que la secuencia codificadora del COIN está ahora en posición para la transcripción aguas abajo de la NSI.

La segunda unidad recombinable distinta (FIG. 3B) comprende sitios R2/R2' (p. ej., sitios *Rox*) en la misma orientación (es decir, dirigiendo una delección), que comprende las siguientes secuencias dispuestas entre los sitios R2/R2': una DSC, un primer sitio R3 (p. ej., un primer sitio *FRT*) en la misma orientación que el sitio R1 de la primera unidad recombinable distinta, un primer sitio R4 (p. ej., un primer sitio *loxP*), un NSI en orientación invertida (es decir, antisentido) con respecto al gen diana, un primer sitio R5 (p. ej., un primer sitio *lox2372*) en la misma orientación con respecto al sitio R4, un sitio R1' (p. ej., un segundo sitio *FRT3*) y un sitio R3' (por ejemplo, un segundo sitio *FRT*), ambos en orientación opuesta al sitio R3, un COIN (en orientación antisentido con respecto a la transcripción del gen diana), un sitio R5' (p. ej., un segundo sitio *lox2372*) en la misma orientación que el sitio R5, y un sitio R4' (p. ej., un segundo sitio *loxP*) en la misma orientación que el sitio R4. Esta segunda unidad recombinable distinta es escindible por una recombinasa que reconoce R2/R2'. Cuando se incluye en el MFA, esta unidad puede ser escindida para dejar atrás una secuencia de accionamiento (p. ej., en algunas realizaciones un informador, p. ej., una secuencia que codifica *lacZ*), flanqueada por un sitio R1 y un sitio R2 o R2'.

La tercera unidad recombinable distinta (FIG. 3C) comprende sitios R3/R3' (p. ej., sitios *FRT*) en orientación opuesta (es decir, dirigiendo una inversión), que comprende las siguientes secuencias dispuestas entre los sitios R3/R3': un sitio R4 (p. ej., un sitio *loxP*), una NSI en orientación invertida (es decir, antisentido) con respecto a la transcripción del gen diana, un sitio R5 (p. ej., un sitio *lox2372*) en la misma orientación que el sitio R4 de la unidad (es decir, de la FIG. 3C) y un sitio R1' (p. ej., un sitio *FRT*) en la orientación opuesta al sitio R3. Esta unidad puede ser invertida por

la acción de una recombinasa que reconoce R3/R3' (p. ej., una recombinasa Flp, en que los sitios R3/R3' son sitios *FRT*), lo que resulta en la disposición de la NSI en la orientación apropiada para la transcripción y la traducción.

La cuarta unidad recombinable distinta (FIG. 3D) comprende sitios R4/R4' (p. ej., dos sitios *loxP*) en la misma orientación (es decir, dirigiendo una delección), que comprende las siguientes secuencias dispuestas entre los sitios R4/R4': una NSI en orientación invertida (es decir, antisentido), un sitio R5 (p. ej., un primer sitio *lox2372*) y un sitio R1' (p. ej., un sitio *FRT3*) y un sitio R3' (p. ej., un sitio *FRT*) cada uno en la misma orientación con respecto al sitio R4, un COIN (en orientación antisentido) y un sitio R5' (p. ej., un segundo sitio *lox2372*) en la misma orientación que el sitio R5. En presencia de una recombinasa que reconoce R4/R4' (p. ej., Cre si R4/R4' son sitios *loxP*, p. ej.), esta unidad es escindible. Si se dispone dentro del MFA y se expone a la recombinasa R4/R4' (en ausencia de exposición a una recombinasa que reconoce R1/R1', R3/R3'), esta unidad se suprimirá y dejará la secuencia de accionamiento (p. ej., en algunas realizaciones un informador, p. ej., una secuencia que codifica *lacZ*) y la DSC. Por lo tanto, esta unidad permite una realización en la que el MFA, cuando se reemplaza una secuencia en un genoma (p. ej., reemplazando un exón), puede actuar en presencia de una recombinasa que reconoce R4/R4' como un alelo nulo que comprende una secuencia de accionamiento y una DSC. La DSC del MFA se puede separar, si se desea, tras la acción de una recombinasa que reconoce R2/R2' (p. ej., una recombinasa Dre en que R2/R2' son sitios *Rox*) debido a que la DSC está flanqueado aguas arriba y aguas abajo por sitios R2/R2' en la misma orientación.

La quinta unidad recombinable distinta (FIG. 3E) comprende sitios R5/R5' (p. ej., dos sitios *lox2372*) en la misma orientación (es decir, dirigiendo una delección), así como en la misma orientación de los sitios R4/R4' de la cuarta unidad recombinable distinta, que comprende las siguientes secuencias dispuestas entre los sitios R5 y R5': un sitio R1' (p. ej., un sitio *FRT3*) y un sitio R3' (p. ej., un sitio *FRT*) en la misma orientación uno con respecto al otro, pero en orientación opuesta al sitio R1 de la primera unidad recombinable distinta, y un COIN (en orientación antisentido) con respecto a la transcripción del gen diana.

Como reconocerán los expertos en la técnica, las unidades recombinables solapantes están descritas de esta forma para transmitir la estructura del MFA, en lugar de limitar los posibles elementos recombinables en el MFA. Por ejemplo, los expertos en la técnica reconocerán que cada una de las unidades recombinables comprende sitios de recombinación específicos del sitio dentro de la unidad recombinable, y que la acción de una recombinasa en los sitios (a través de unidades recombinables) alcanza manipulaciones deseadas y descritas del MFA que logran funciones previstas del MFA. Por ejemplo, con referencia a la FIG. 3, la acción de una recombinasa que reconoce R1/R1' y R3/R3' funciona para manipular porciones de todas las cinco unidades recombinables tal como se muestra conceptualmente en la FIG. 3.

Una vez que un MFA se dispone en un lugar deseado en un genoma, puede ser tratado mediante ingeniería genética de tal manera que proporciona un alelo nulo con una función informadora, en donde el alelo nulo se puede volver a modificar (en la etapa de posfijación de objetivo, etapa mediada por recombinasa) de modo que carezca de todas las secuencias flanqueadas con sitios de reconocimiento de recombinasa orientadas en la misma dirección. Un ejemplo de esta realización se muestra en la FIG. 4, que muestra ejemplos de sitios de reconocimiento de recombinasa adecuados, en donde todos los elementos distintos de la secuencia de accionamiento (aquí, que codifica *lacZ*) están flanqueados aguas arriba y aguas abajo por sitios *Rox*. Tras la exposición a la recombinasa Dre, sólo la secuencia de accionamiento está presente. La escisión de las secuencias con sitios *Rox* puede ser confirmada por la pérdida de la DSC (aquí, conteniendo neo^r), y/o la pérdida del COIN y/o la pérdida de la NSI. El resultado es un alelo nulo verdadero que carece de DSC, NSI y COIN.

Se puede utilizar un MFA tal como se ilustra en la FIG. 2 y como se ejemplifica en la parte superior de la FIG. 3 para crear un alelo condicional. Un alelo condicional se puede generar mediante la selección de la recombinasa apropiada con la cual se expone el alelo en primera instancia. La recombinasa apropiada en esta realización es una recombinasa que invierte la NSI de nuevo a la cadena sentido y abandona el COIN en la orientación antisentido. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la exposición del MFA a una recombinasa que reconoce R1/R1' y también R3/R3' (p. ej., una recombinasa Flp, en donde R1/R1' y R3/R3' se seleccionan de sitios *FRT* y *FRT3*; véase la Fig. 5 para una realización particular). En pocas palabras, una vez que un MFA se dispone en un lugar deseado en un genoma, se puede utilizar para generar un alelo condicional, en donde la NSI invertida de la FIG. 2 y la parte superior de la FIG. 3 están dispuestas en una orientación para la transcripción del gen diana, mientras que deja el COIN en orientación antisentido y se suprime la secuencia de accionamiento y la DSC. Un ejemplo de esta realización se muestra en la FIG. 5, en que una secuencia de accionamiento que contiene un *lacZ* y una DSC que contiene neo^r se separan exponiendo primero el alelo a la recombinasa Flp, provocando una inversión de elementos dirigida por sitios *FRT3*, seguido por la delección mediada por Flp dirigida por sitios *FRT*. El alelo resultante presenta la NSI en una orientación para la transcripción, pero deja el COIN en la orientación antisentido.

Tal como se muestra en la FIG. 6, se puede lograr el mismo alelo condicional si la inversión mediada por Flp se produce primero a través de sitios *FRT* (como en la FIG. 5) o sitios *FRT3* (como en la FIG. 6).

En la realización que genera un alelo condicional, sitios de recombinasa que permanecen en el alelo se seleccionan de manera que el tratamiento con una o más recombinasas adecuadas resulta en la posterior delección de la NSI (o re-inversión de la NSI) y la inversión del COIN, de manera que el alelo resulta en un alelo nulo con respecto a la NSI, pero también coloca al COIN en la orientación para la transcripción. Un ejemplo de esto se muestra utilizando sitios

loxP y *lox2372*, cada uno de los cuales dirige de forma independiente la recombinación mediada por Cre. Aunque se utilizan los sitios Cre-reactivos, pueden utilizarse cualesquiera sitios adecuados en lugar de los sitios Cre.

Tal como se muestra en la FIG. 7, la NSI en orientación sentido (es decir, en la posición para la transcripción y la traducción) está dispuesta 3' con respecto a un primer sitio *lox2372*. Después de la NSI, se encuentra un primer sitio *loxP* en la misma orientación que el primer sitio *lox2372*, y un COIN invertido (es decir, antisentido) está dispuesto aguas abajo del primer sitio *loxP*, y el COIN invertido dispuesto aguas arriba de un segundo sitio *lox2372* en orientación opuesta con respecto al primer sitio *lox2372*. Dispuesto aguas abajo del segundo sitio *lox2372* se encuentra un segundo sitio *loxP* dispuesto en una orientación opuesta con respecto al primer sitio *loxP*. Esta disposición permite, tras el tratamiento con Cre, la inversión a través de cualquiera de los sitios lox seguido de su delección a través de cualquiera de los sitios lox (véase la FIG. 7). El alelo resultante contiene un COIN en orientación sentido, es decir, en la posición para la transcripción y la traducción.

En una disposición alternativa (véase la FIG. 8), un sitio *loxP* está dispuesto 5' con respecto a la NSI (en lugar de dispuesto entre la NSI y el COIN), de manera que la exposición a Cre resulta en la inversión de la NSI a la orientación antisentido y el COIN a la orientación sentido.

El enfoque del MFA proporciona opciones para muchas realizaciones. En una realización específica, tras la exposición a la primera recombinasa, la disposición de elementos y sitios de recombinasa son como se muestra en la construcción de la parte inferior de la FIG. 5 o la FIG. 6, en donde el sitio *FRT3* tal como se muestra es el sitio R1 que no tiene un sitio cognato en el alelo resultante, el sitio *FRT* tal como se muestra es un sitio R3 de recombinasa que no tiene un sitio cognato en el alelo resultante, el sitio *lox2372* más a la izquierda es el sitio R5 que se empareja con un sitio R5' de recombinasa cognato que ocupa el sitio *lox2372* más a la derecha tal como se muestra, el sitio *loxP* más a la izquierda tal como se muestra es el sitio R4 que se empareja con un sitio R4' de recombinasa cognato proporcionado por el sitio *loxP* más a la derecha tal como se muestra, y el sitio *Rox* tal como se muestra es el sitio R2 que no tiene un sitio de recombinasa cognato en el alelo resultante.

En una realización específica, tras la exposición a la segunda recombinasa, la disposición de elementos y sitios de recombinasa del alelo resultante es como se muestra en la construcción de la parte inferior de la FIG. 7, en donde el sitio *FRT3* mostrado es el sitio R1 que no tiene un sitio cognato en el alelo resultante, el sitio *lox2372* es el sitio R5 que no está emparejado con un sitio de recombinasa cognato en el alelo resultante, el sitio *FRT* mostrado es el sitio R3 que no está emparejado con un sitio de recombinasa cognato en el alelo resultante, el sitio *loxP* tal como se muestra es el sitio R4 que no está emparejado con un sitio recombinasa cognato en el alelo resultante, y el sitio *Rox* tal como se muestra es el sitio R2' que no está emparejado con un sitio de recombinasa cognato en el alelo resultante.

En una realización específica, el alelo resultante permite la expresión del COIN tras la exposición a la segunda recombinasa. En una realización específica, el COIN es un informador o una DSC.

Se describe un MFA que comprende un COIN, una NSI, una DSC, un informador y sitios de recombinasa que están dispuestos de manera que la acción por una recombinasa escindirá el COIN, la NSI y la DSC, pero no el informador (FIG. 11 B), mientras que la acción con una recombinasa diferente generará un alelo que carece de la DSC, pero que dispone la NSI en orientación sentido, al tiempo que mantiene el COIN en orientación antisentido (FIG. 11C). Este alelo resultante tiene sitios de recombinasa dispuestos de modo que la acción tal por una recombinasa adicional escindirá la NSI y dispondrá el COIN en orientación sentido (FIG. 11D). Por lo tanto, en las realizaciones comentadas, este MFA permitirá la selección de una inactivación verdadera con una función de informador y la separación de la DSC, o la colocación de una NSI, en donde la posterior separación de la NSI se confirma por la disposición concomitante de un COIN en orientación sentido. Un diagrama esquemático de algunas unidades de recombinasa solapantes se muestra en la FIG. 11A para un alelo de este tipo, con las unidades de recombinasa representadas por formas de trazos discontinuos.

Se describe un MFA que comprende un COIN, una NSI, una DSC, un informador y sitios de recombinasa que están dispuestos de modo que la acción por una recombinasa escindirá la NSI y la DSC, pero mantendrá la orientación del informador y el COIN (Fig. 12B), mientras que la acción con una recombinasa diferente generará un alelo que carece de la DSC y el informador, pero que dispone la NSI en la orientación sentido, mientras mantiene el COIN en orientación antisentido (Fig. 12C). Este alelo resultante tiene sitios de recombinasa dispuestos de modo que la acción por una recombinasa adicional escindirá la NSI y dispondrá el COIN en orientación sentido (FIG. 12D). Por lo tanto, en las realizaciones comentadas, este MFA permitirá la selección de una inactivación verdadera con una función de informador y la separación de la DSC; o la disposición de una NSI, en donde la posterior separación de la NSI se confirma por la disposición concomitante de un COIN en orientación sentido. Un diagrama esquemático de algunas unidades de recombinasa solapantes se muestra en la FIG. 12A para un alelo de este tipo, con las unidades de recombinasa representadas por formas de trazos discontinuos.

Se describe un MFA que comprende un COIN, una NSI, una DSC, un informador y sitios de recombinasa que están dispuestos de manera que la acción por una recombinasa escindirá el informador y la DSC y dispondrá la NSI en orientación sentido (FIG. 13B). Este alelo resultante tiene sitios de recombinasa dispuestos de modo que la acción por una recombinasa adicional dispondrá la NSI en orientación antisentido, al tiempo que dispondrá el COIN en

orientación sentido (FIG. 13C). Por lo tanto, en las realizaciones comentadas, este MFA permitirá la creación de un alelo condicional a partir de un MFA.

Se describe un MFA que comprende un COIN, una NSI, una DSC, un informador y una serie diferente de sitios de recombinasa que están dispuestos de manera que la acción por una recombinasa seleccionada escindiría el informador y la DSC y dispondrá la NSI en orientación sentido (FIG. 14B). Este alelo resultante tiene sitios de recombinasa dispuestos de modo que la acción por una recombinasa adicional dispondrá la NSI en orientación antisentido, al tiempo que dispondrá el COIN en orientación sentido (FIG. 14C). Por lo tanto, este MFA permitirá la creación de un alelo condicional a partir de un MFA.

Se describe un MFA que comprende una NSI, una DSC, un informador, un COIN y sitios de recombinasa que están dispuestos de manera que la acción por una recombinasa seleccionada escindiría el informador y la DSC y dispondrá la NSI en orientación sentido, al tiempo que mantendrá el COIN en orientación antisentido (FIG. 15B). Este alelo resultante tiene sitios de recombinasa dispuestos de modo que la acción por una recombinasa adicional dispondrá la NSI en orientación antisentido, al tiempo que dispondrá el COIN en orientación sentido (FIG. 15C). Por lo tanto, este MFA permitirá también la creación de un alelo condicional a partir de un MFA.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: MFA *Hprt1*

Hprt1 es un gen que está ligado a X en ratones, y células ES *Hprt1*-nulo son resistentes al análogo de nucleobase 6-tioguanina (6-TG). Esta propiedad proporciona un test fenotípico fácil y robusto, ya que las células que son de tipo salvaje para *Hprt1* mueren en presencia de 6-TG, mientras que las células que son nulas para *Hprt1* sobreviven. Adicionalmente, si se fijan como objetivo células ES que se derivan de blastocistos masculinos (como es típicamente el caso, y es también el caso para la mayoría de las líneas celulares ES actualmente en uso para la fijación de objetivo), se necesita entonces una sola ronda de fijación de objetivo para generar células ES *HPRT1^{MFA}/Y*. Con el fin de generar células ES *HPRT1^{MFA}/Y*, un MFA en un vector de fijación de objetivo de acuerdo con el alelo mostrado en la FIG. 5 (parte superior), se prepara mediante la metodología de ingeniería genética estándar y recombinación homóloga bacteriana de acuerdo con el método VELOCIGENE® descrito en la Patente de EE. UU. Nº 6.586.251 y en Valenzuela *et al.* (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6):652-659. El alelo *Hprt1^{MFA}* está diseñado en torno al exón 3, que define el exón 3 y la secuencia conservada intrónica directamente 5' y 3' de la misma como la NSI (FIG. 9). La razón de esta elección radica en que el exón 3 comienza en marco 2 (*f2*) y termina en el marco 0 (*f0*); por extensión, el exón precedente (es decir, el exón 2) termina en el marco 2 (*f2*) y el siguiente exón (es decir, el exón 4) comienza en el marco 0 (*f0*). Esto significa que si esta NSI se invierte en la orientación antisentido, entonces el exón 2 se desplaza fuera del marco con respecto al exón 4, porque el exón 2 termina en *f2* y el exón 4 comienza en *f0*. De esta manera, si en el alelo *Hprt1^{MFA}* existe alguna transcripción más allá de la secuencia de accionamiento - *SA-lacZ-poliA* (FIG. 10) - y también existe un corte y empalme que separa la secuencia de accionamiento del ARNm final, ese ARNm no comprenderá el exón 3 y codificará una secuencia sin sentido, dando lugar efectivamente a un ARNm y fenotipo *Hprt1*-nulo. Por el contrario, para el alelo *Hprt1^{COIN-INV}* (generado por el tratamiento de *Hprt1^{MFA}* con FLP o variantes de FLP para generar primero el alelo *Hprt1^{COIN}*, a continuación, mediante el tratamiento con Cre, para generar *Hprt1^{COIN-INV}*) si existe una transcripción después de *SA-eGFP-poliA* del elemento COIN (FIG. 10), y existe también un corte y empalme que separa la secuencia *SA-eGFP-poliA* del ARNm final, ese ARNm no comprenderá el exón 3 y, por lo tanto, codificará una secuencia sin sentido, dando efectivamente lugar a un ARNm y fenotipo *Hprt1*-nulo.

La NSI orientada antisentido es el exón 3 y rodea a la secuencia intrónica conservada evolutivamente de *Hprt1* (FIG. 9), y el COIN orientado antisentido es un *SA-eGFP-poliA*. El vector de fijación de objetivo tiene un brazo de homología de ratón aguas arriba del primer sitio *FRT3* y aguas abajo del segundo sitio *Rox* que dirigen la fijación de objetivo en el locus *Hprt1* de modo que es reemplazado por su versión MFA, por lo que (a) un elemento *SA-LacZ-poliA* en la orientación sentido con respecto a la dirección de la transcripción de *Hprt1*, seguido de una DSC en la orientación antisentido con respecto a la dirección de la transcripción de *Hprt1*, tanto el exón 3 de *Hprt1* precedente, (b) el exón 3 se dispone en la orientación antisentido con respecto a la dirección de la transcripción de *Hprt1*, y (c) un elemento COIN se dispone en la orientación antisentido con respecto a la dirección de la transcripción de *Hprt1* aguas abajo del exón 3, y en que estos diferentes elementos están flanqueados por sitios de reconocimiento de recombinasa específica del sitio, dispuestos juntos en unidades recombinables tal como se detalla en la FIG. 3 y la FIG. 10, siendo *SA-lacZ-poliA* la secuencia de accionamiento, y siendo la NSI el exón 3 más secuencias intrónicas flanqueantes de *Hprt1*.

El vector de fijación de objetivo se prepara y se electropora en células ES de acuerdo con el método VELOCIGENE® descrito en la Patente de EE. UU. Nº 6.586.251 y en Valenzuela *et al.* (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21(6):652-659. Las células ES resultantes portan el alelo MFA de *Hprt1* en lugar de la versión de tipo salvaje de *Hprt1*. Antes de cualquier modificación adicional las células ES *Hprt1^{MFA}/Y* son resistentes al tratamiento con 6-TG (porque son efectivamente nulas para *Hprt1*), demostrando la utilidad del método de MFA para generar un alelo de inactivación-primera verdadero. Después del tratamiento con Dre, esta propiedad se conserva, mientras que el genotipo de las células se convierte en *Hprt1^{SA-LacZ-poliA}/Y*. A pesar de que para el locus *Hprt1* esta modificación no puede alterar ni el

nivel de expresión del informador (LacZ) ni tiene consecuencias fenotípicas algunas (altera la resistencia a 6-TG), esto puede no ser el caso para otros loci. Después del tratamiento con FLP o variantes de FLP, en una etapa que es efectivamente equivalente a un ensayo de complementación, las células ES $Hprt1^{MFA}/Y$ se convierten en células ES $Hprt1^{COIN}/Y$ que son efectivamente de tipo salvaje y, por lo tanto, sensibles a 6-TG. Además, esta operación restablece la expresión del mensaje $Hprt1$ de nuevo a su identidad de tipo salvaje. Después del tratamiento con Cre, las células ES $Hprt1^{COIN}/Y$ se convierten en células ES $Hprt1^{COIN-INV}/Y$ que son efectivamente nulas para $Hprt1$ y, por lo tanto, resistentes a 6-TG. Además, esta operación resulta en la abrogación de la expresión del mensaje de tipo salvaje del mensaje de $Hprt1$, y su reemplazo concomitante por un mensaje híbrido compuesto por el primer exón de $Hprt1$ y eGFP (codificada por el elemento COIN), generando de este modo un alelo que expresa eGFP en lugar de $Hprt1$. Esta nueva propiedad, la expresión de eGFP, se puede utilizar opcionalmente para puntuar la inversión del elemento COIN a la cadena con sentido y tiene, además, utilidad para permitir el aislamiento de células en las que este evento ha tenido lugar a partir de una población de células, en donde existen ambos tipos de células (células ES $Hprt1^{COIN}/Y$ y células ES $Hprt1^{COIN-INV}/Y$). Por lo tanto, no sólo el alelo COIN se convierte en nulo, sino que el evento también está marcado por un nuevo evento, fácilmente medible y útil.

Ejemplo 2: Resultados del MFA $Hprt1$

Se construyó un MFA que tiene un informador lacZ (SA(adml)-gtx-lacZ-pA) en orientación sentido, una DSC de neomicina (Neo), una NSI en orientación antisentido que abarca un exón crítico (e_c) para $Hprt1$ (exón 3) y secuencias intrónicas flanqueantes conservadas evolutivamente, y un COIN (Gtx-SA-HA-myc3-TM-T2A-GFP-pA) con una disposición de sitios de recombinasa tal como se muestra en la FIG. 16A. El MFA se electroporalizó en células ES F1H4 y se seleccionaron para resistencia a G418. Posteriormente, se genotiparon colonias resistentes a G418 para determinar la fijación de objetivo. Se obtuvieron cinco clones fijados como objetivo ($Hprt1^{MFA}/Y$) de un total de 96 colonias rastreadas. Se encontró que los cinco de estos clones sobrevivieron y se propagaron cuando se cultivan en un medio estándar de células ES complementado con 6-TG 10 μ M (que es el ensayo estándar de supervivencia de 6-TG utilizado), como era de esperar para las células que son $Hprt1$ -nulas (Doetschman, T. *et al.* (1987) Targeted correction of mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells, *Nature* 330:576-578). Por el contrario, la línea celular parental, F1H4, así como cualquiera de los clones no fijados como objetivo que se testaron, no lograron crecer en presencia de 6-TG. Estos resultados están de acuerdo con lo que se ha informado anteriormente (Doetschman *et al.* (1987)).

Tras el tratamiento con recombinasa FLPo (Raymond, C.S. y Soriano, P. (2007) High-efficiency FLP and PhiC31 site-specific recombination in mammalian cells, *PLoS ONE* 2:e162), el alelo $Hprt1^{MFA}$ se convierte en el alelo $Hprt1^{COIN}$ (FIG. 16B), dando lugar a células ES $Hprt1^{MFA}/Y$. Esta operación da como resultado la separación del informador LacZ, la DSC, así como el restablecimiento de la re-inversión de la NSI en la cadena sentido. Por lo tanto, el alelo resultante ($Hprt1^{COIN}$) es funcionalmente de tipo salvaje, dado que el ARNm de $Hprt1$ de tipo salvaje es codificado y expresado.

Tras tratamiento adicional con recombinasa Cre (Sauer, B. y Henderson, N. (1988) Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5166-5170), el alelo $Hprt1^{COIN}$ se convierte en el alelo $Hprt1^{COIN-INV}$ (FIG. 16C), dando lugar a células ES $Hprt1^{COIN-INV}/Y$. Este alelo ($Hprt1^{COIN-INV}$) es funcionalmente nulo, ya que el ARNm de $Hprt1$ está reemplazado por uno que codifica eGFP (y también carece de la NSI- es decir, el exón 3 de $Hprt1$ y las secuencias intrónicas flanqueantes tal como se define en la fase de diseño).

Células que portan el MFA ($Hprt1^{MFA}/Y$) se sometieron a ensayo para determinar la resistencia al análogo de nucleótido 6-TG, y se compararon con células de tipo salvaje (FIG. 17). Las células ES $Hprt1^{MFA}/Y$ sobrevivieron, mientras que las células ES $Hprt1^+/Y$ murieron, lo que indica que $Hprt1^{MFA}/Y$ son funcionalmente $Hprt1$ -nulas. Células ES $Hprt1^{MFA}/Y$ fueron tratadas luego con FLPo, para probar si el alelo $Hprt1^{MFA}$ se convierte en el alelo $Hprt1^{COIN}$. Se espera que las células ES $Hprt1^{COIN}/Y$ resultantes sean fenotípicamente de tipo salvaje, dado que se restablece la expresión de $Hprt1$. Esto ha demostrado ser de hecho el caso, ya que células ES $Hprt1^{COIN}/Y$ mueren cuando se cultivan en presencia de 6-TG, al igual que sus homólogos de tipo salvaje ($Hprt1^+/Y$). Por último, las células ES $Hprt1^{COIN}/Y$ fueron tratadas con Cre para generar células ES $Hprt1^{COIN-INV}/Y$ que se predice que serán nulas para $Hprt1$ dado que el módulo de COIN es activado al tiempo que se suprime simultáneamente el exón 3 de $Hprt1$ (FIG. 16, Panel C). Cuando se cultivan en presencia de 6-TG, las células ES $Hprt1^{COIN-INV}/Y$ sobrevivieron y proliferaron, confirmando que son funcionalmente nulas para $Hprt1$, según lo pretendido por el diseño y la aplicación del MFA.

Los resultados fenotípicos obtenidos anteriormente fueron confirmados adicionalmente al nivel de proteínas, mediante la realización de transferencias Western de preparaciones de proteínas de células ES que pertenecen a cada una de las clases genotípicas: ($Hprt1^+/Y$) de tipo salvaje, $Hprt1^{MFA}/Y$ (MFA), $Hprt1^{COIN}/Y$ (MFA + FLPo) y $Hprt1^{COIN-INV}/Y$ (MFA + FLPo + Cre). Estas preparaciones de proteínas se examinaron en cuanto al informador y la expresión de NSI (es decir, $Hprt1$). Células ES $Hprt1^{MFA}/Y$ carecen de la proteína $Hprt1$, pero expresan el informador (LacZ). En células ES $Hprt1^{COIN}/Y$, la expresión de $Hprt1$ es restablecida a niveles de tipo salvaje, lo que refleja la disposición de la NSI (exón 3 de $Hprt1$) de nuevo en la orientación sentido, y no mostró proteína informadora (LacZ), lo que confirma la escisión del informador por parte de FLPo. Esto estableció que el alelo $Hprt1^{MFA}$ es de hecho nulo, y se puede convertir en un alelo de tipo salvaje funcional después de la separación del informador y la DSC, y la re-

- 5 inversión concomitante de la NSI en la cadena sentido (una operación experimentalmente realizada por FLPo). El hecho de que en el nivel de la expresión de la proteína Hprt1 el alelo *Hprt1^{COIN}* sea idéntico a la de tipo salvaje (*Hprt1⁺*), demuestra adicionalmente la robustez de este método para generar un condicional nulo verdadero y realizar el equivalente de un ensayo de complementación en una etapa posfijación de objetivo mediada por recombinasa. Por último, las células ES *Hprt1^{COIN-INV}/Y* carecen de la proteína *Hprt1*, lo que confirma efectivamente las observaciones fenotípicas realizadas utilizando el ensayo de resistencia de 6-TG. Esto confirma, además, que el alelo condicional nulo basado en COIN (*Hprt1^{COIN}*) funciona según lo previsto.

REIVINDICACIONES

1. Una construcción de ácido nucleico, que comprende:

- (a) brazos fijadores de objetivo para dirigir la construcción de ácido nucleico a un gen diana de un ácido nucleico de una célula;
- 5 (b) una secuencia de accionamiento en orientación sentido con respecto a la transcripción del gen diana, y una casete de selección de fármacos (DSC) en orientación sentido o antisentido;
- (c) en orientación antisentido, una secuencia de nucleótidos de interés (NSI) y un COIN (elemento condicional mediante inversión); y
- (d) unidades recombinables,
- 10 en donde las unidades recombinables comprenden dos primeros pares de sitios de reconocimiento de recombinasa cognatos reconocidos por una primera recombinasa, comprendiendo una primera unidad recombinable la secuencia de accionamiento, la DSC y la NSI, en donde la primera unidad recombinable está flanqueada por un par de los dos primeros pares de sitios de reconocimiento de recombinasa cognatos reconocidos por la primera recombinasa, comprendiendo una segunda unidad recombinable la NSI, en donde la segunda unidad recombinable está
- 15 flanqueada por un par de los dos primeros pares de sitios de reconocimiento de recombinasa cognatos reconocidos por la primera recombinasa, dos segundos pares de sitios de reconocimiento de recombinasa cognatos reconocidos por una segunda recombinasa, y un tercer par de sitios de reconocimiento de recombinasa cognatos reconocidos por una tercera recombinasa; en donde los primeros pares, los segundos pares y los terceros pares de sitios de reconocimiento de recombinasa son reconocidos por diferentes recombinasas;
- 20 en donde las unidades recombinables se recombinan tras la exposición a una primera recombinasa para formar un alelo condicional que carece de la secuencia de accionamiento y la DSC y contiene la NSI en orientación sentido y el COIN en orientación antisentido; y

en donde el alelo condicional, cuando se expone adicionalmente a la segunda recombinasa, se recombina para formar un alelo que carece de la NSI y que tiene el COIN en orientación sentido.

25 2. Un método para modificar una célula no humana, que comprende:

fijar como objetivo una secuencia de nucleótidos de interés en una célula con una construcción de ácido nucleico de la reivindicación 1 para formar una célula fijada como objetivo, exponer la célula fijada como objetivo a la primera recombinasa para formar el alelo condicional y exponer el alelo condicional a una segunda recombinasa que escinde la NSI y coloca el COIN en orientación sentido.

30 3. El método de la reivindicación 2, en el que la NSI en la célula es un exón o una secuencia de nucleótidos que está asociada con un fenotipo.

4. El método de la reivindicación 3, en el que la secuencia de nucleótidos de interés en la célula se reemplaza por la construcción de ácido nucleico de la reivindicación 1.

35 5. El método de la reivindicación 4, en el que el fenotipo se determina una primera vez después de formar la célula fijada como objetivo, pero antes de la exposición a la primera recombinasa.

6. El método de la reivindicación 5, en el que el fenotipo se determina una segunda vez después de la exposición a la primera recombinasa.

7. Una construcción de ácido nucleico, que comprende:

40 una casete de selección de fármacos (DSC), un informador, un COIN, una secuencia de nucleótidos de interés (NSI) y cinco pares de sitios de recombinasa dispuestos entre el informador, la DSC, el COIN y la NSI;

en donde ningún par de sitios de recombinasa es idéntico a cualquier otro par, y en donde unos primeros dos pares de sitios de recombinasa son reconocidos por la misma primera recombinasa, unos segundos dos pares de sitios de recombinasa son reconocidos por la misma segunda recombinasa y un quinto par de sitios de recombinasa es reconocido por una tercera recombinasa;

45 en donde la primera, segunda y tercera recombinasa no son iguales, y en donde con respecto a la dirección de transcripción, el informador se encuentra en orientación sentido, la NSI está en orientación antisentido, el COIN está en orientación antisentido y la DSC está en orientación sentido o antisentido;

50 en donde los sitios de recombinasa están dispuestos en unidades recombinables que comprenden (i) una primera unidad recombinable que comprende la secuencia de accionamiento, la DSC y la NSI, en donde la primera unidad recombinable está flanqueada por un par de los dos primeros pares de sitios de reconocimiento de recombinasa

cognatos reconocidos por la primera recombinasa; y (ii) una segunda unidad recombinable que comprende la NSI, en donde la segunda unidad recombinable está flanqueada por un par de los dos primeros pares de sitios de reconocimiento de recombinasa cognatos reconocidos por la primera recombinasa; y

5 en donde los primeros dos pares y los segundos dos pares de sitios de recombinasa están dispuestos de modo que tras la exposición a la primera recombinasa, se forma un alelo modificado, en donde los primeros dos pares de sitios de recombinasa dirigen la escisión del informador, la escisión de la DSC, la inversión de la NSI a orientación sentido y el COIN se mantiene en orientación antisentido, y (a) los segundos dos pares de sitios de recombinasa están dispuestos de manera que, tras la exposición a la segunda recombinasa, la NSI se escinde y el COIN se coloca en orientación sentido; o (b) los segundos dos pares de sitios de recombinasa están dispuestos de manera que tras la
10 exposición a la segunda recombinasa, la NSI se coloca en orientación antisentido y el COIN se coloca en orientación sentido.

8. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el quinto par de sitios de recombinasa están dispuestos de manera que, tras la exposición a la tercera recombinasa y en ausencia de exposición a la primera o segunda recombinasa, la quinta recombinasa escinde el COIN, la NSI y la DSC, y
15 mantiene al informador en la orientación sentido.

9. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la construcción de ácido nucleico está insertada en un gen, y con respecto a la dirección de transcripción del gen, de 5' a 3', la construcción comprende un informador en orientación sentido, una DSC en orientación sentido o antisentido, una NSI en orientación antisentido y un COIN en orientación antisentido.

20 10. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la DSC está en orientación sentido.

11. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la construcción de ácido nucleico está insertada en un gen, y con respecto a la dirección de transcripción del gen, de 5' a 3', la construcción comprende un COIN en orientación antisentido, una NSI en orientación antisentido, una DSC en orientación sentido o antisentido, y un informador en orientación sentido.
25

12. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la DSC está en orientación sentido.

13. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la construcción de ácido nucleico está insertada en un gen, y con respecto a la dirección de transcripción del gen, de 5' a 3', la construcción comprende una NSI en orientación antisentido, una DSC en orientación sentido o antisentido, un informador en orientación sentido y un COIN en orientación antisentido.
30

14. Una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la DSC está en orientación sentido.

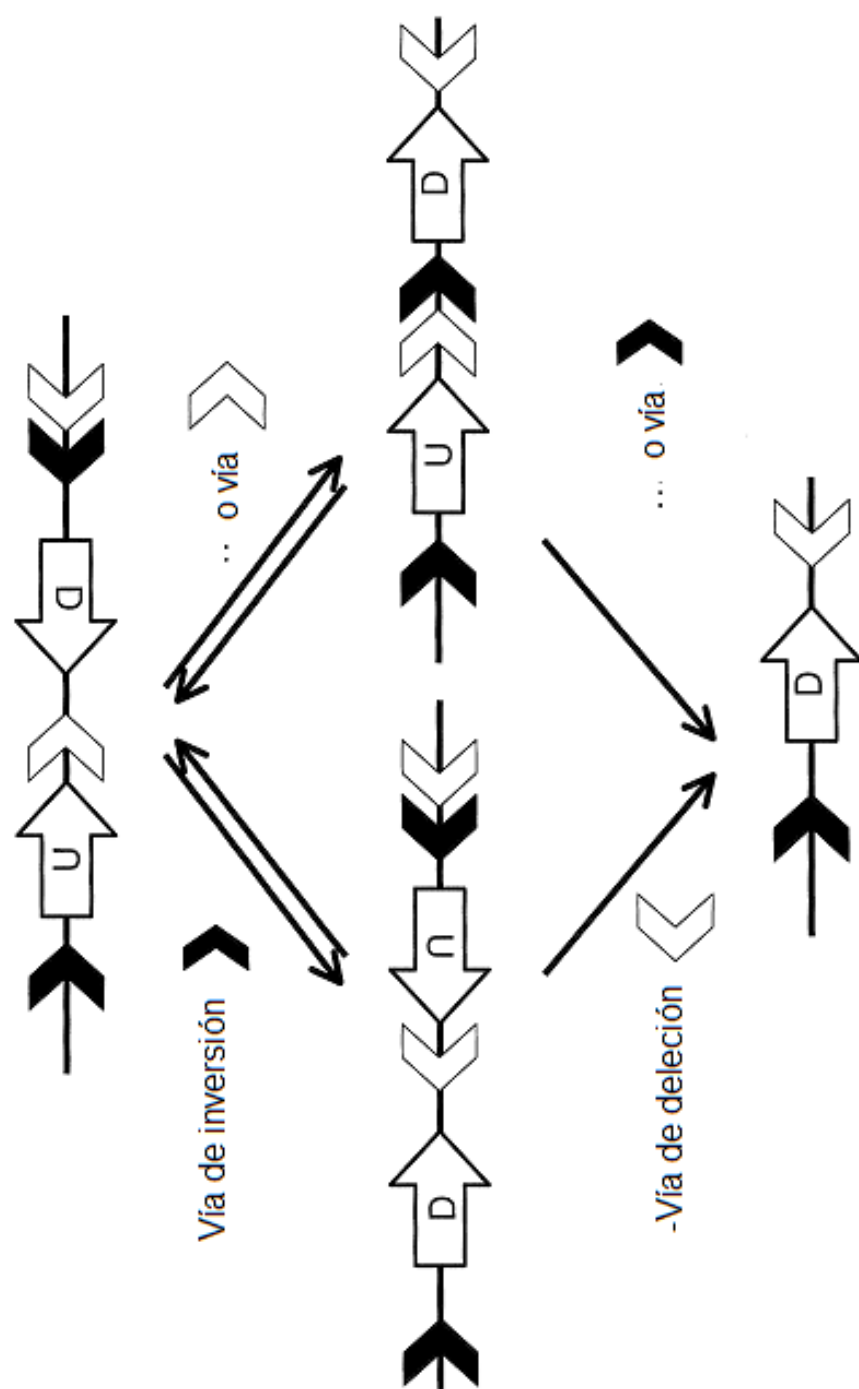


FIG. 1

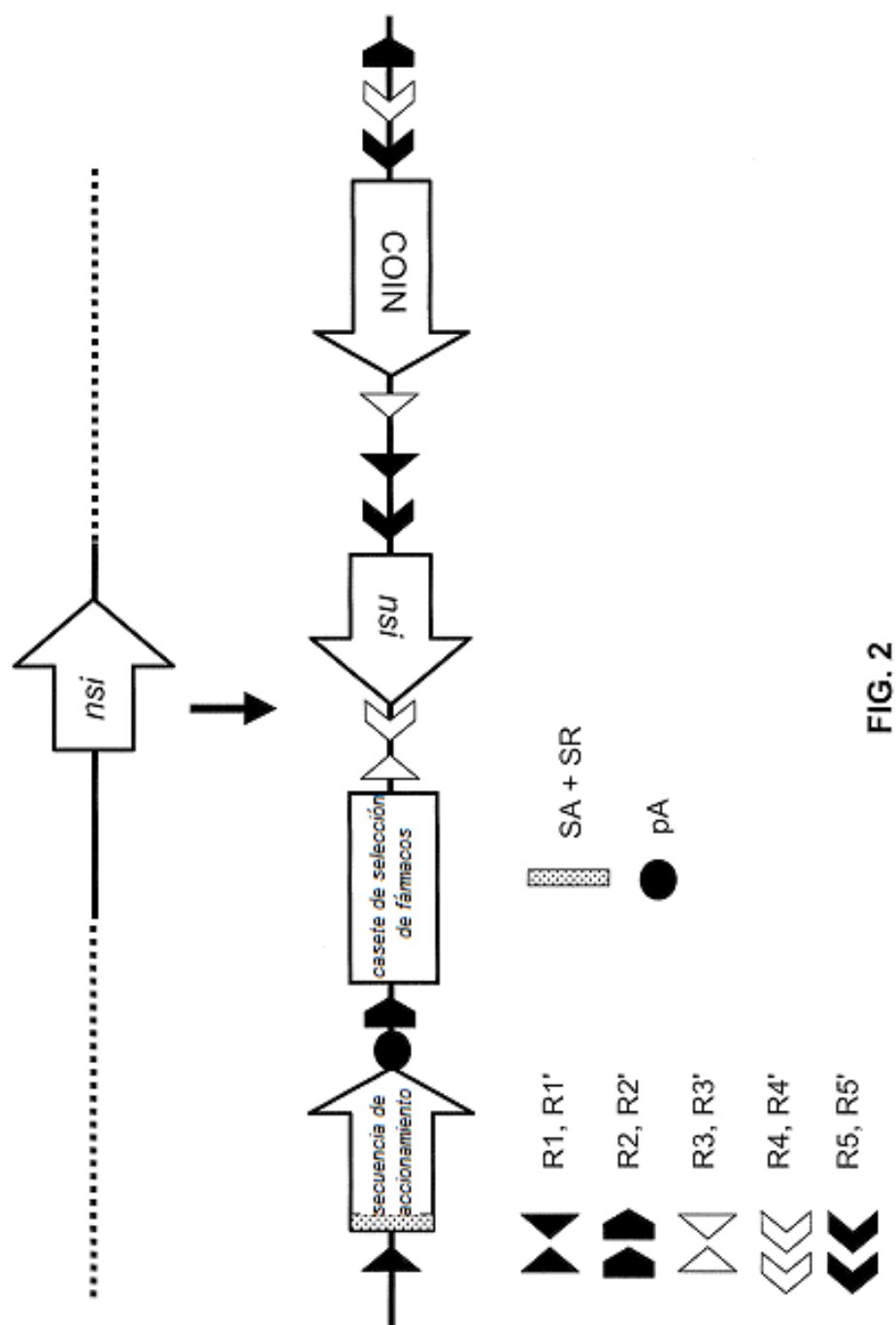


FIG. 2

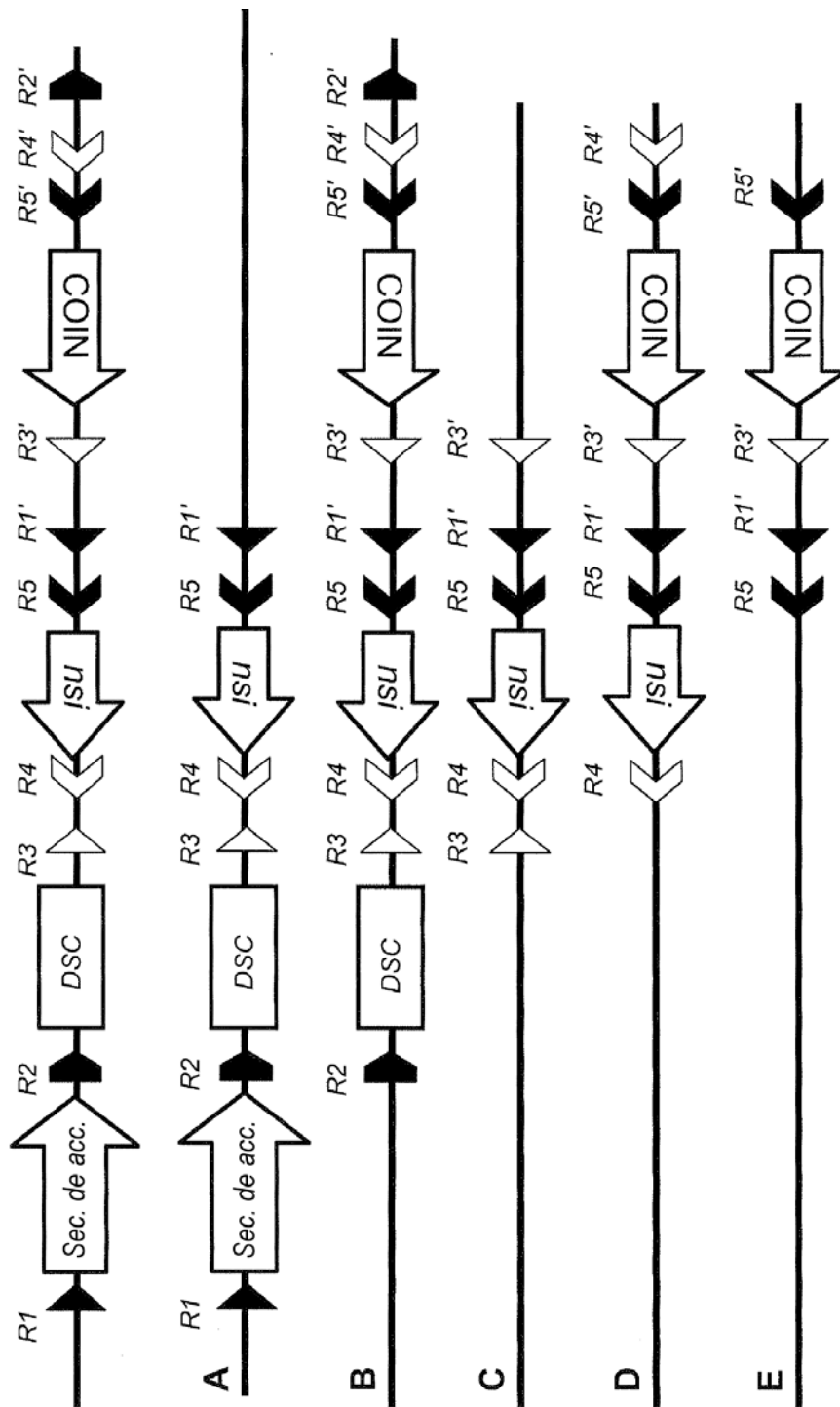


FIG. 3

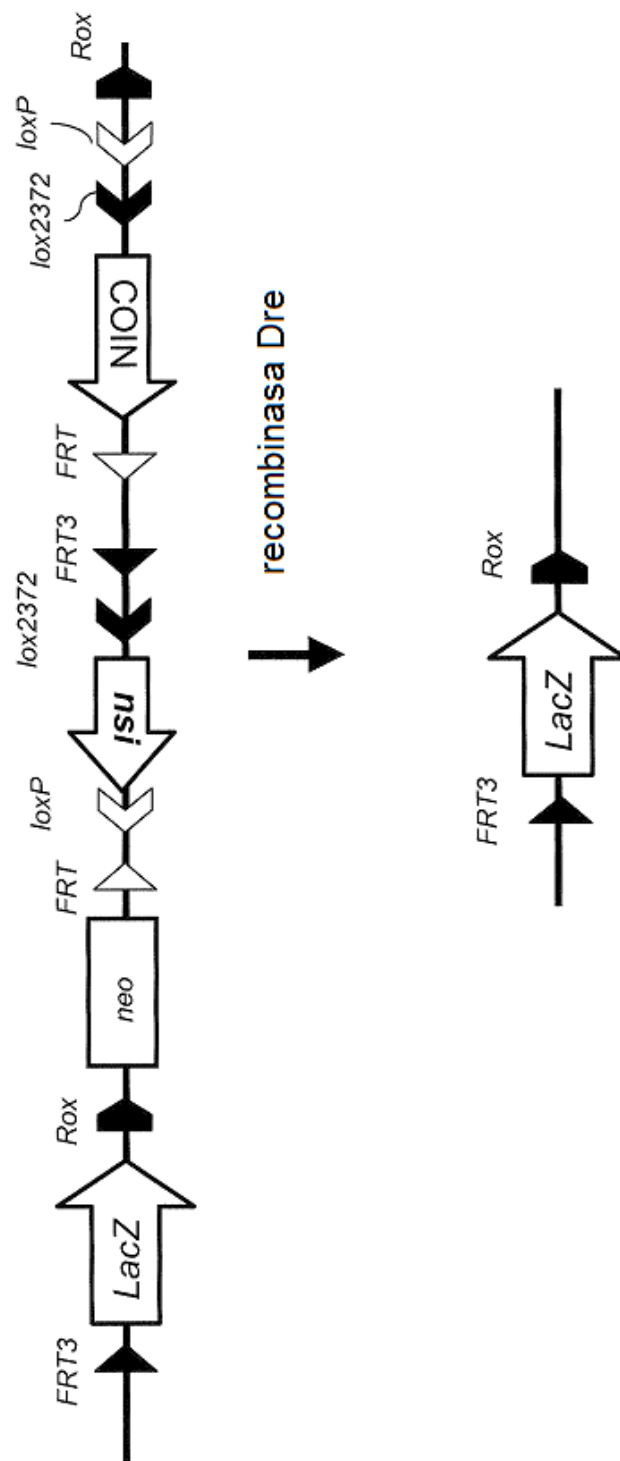


FIG. 4

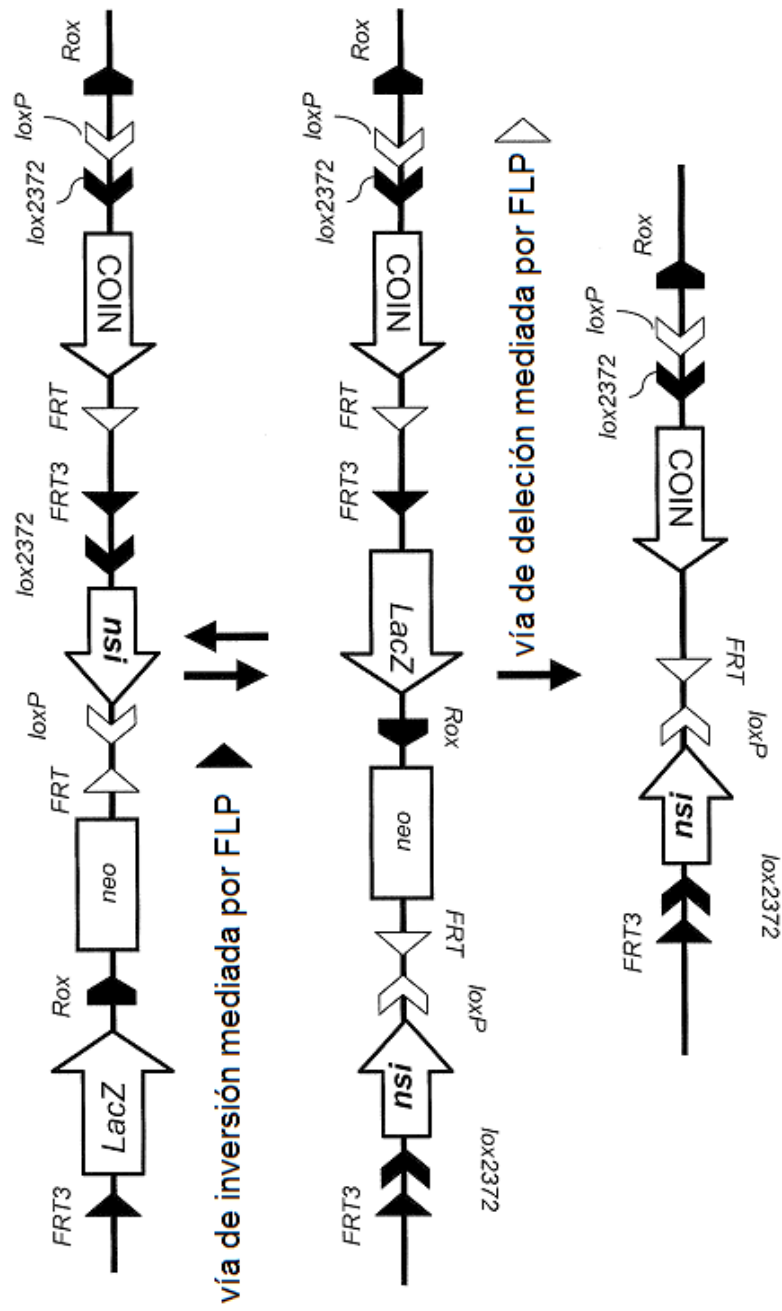


FIG. 5

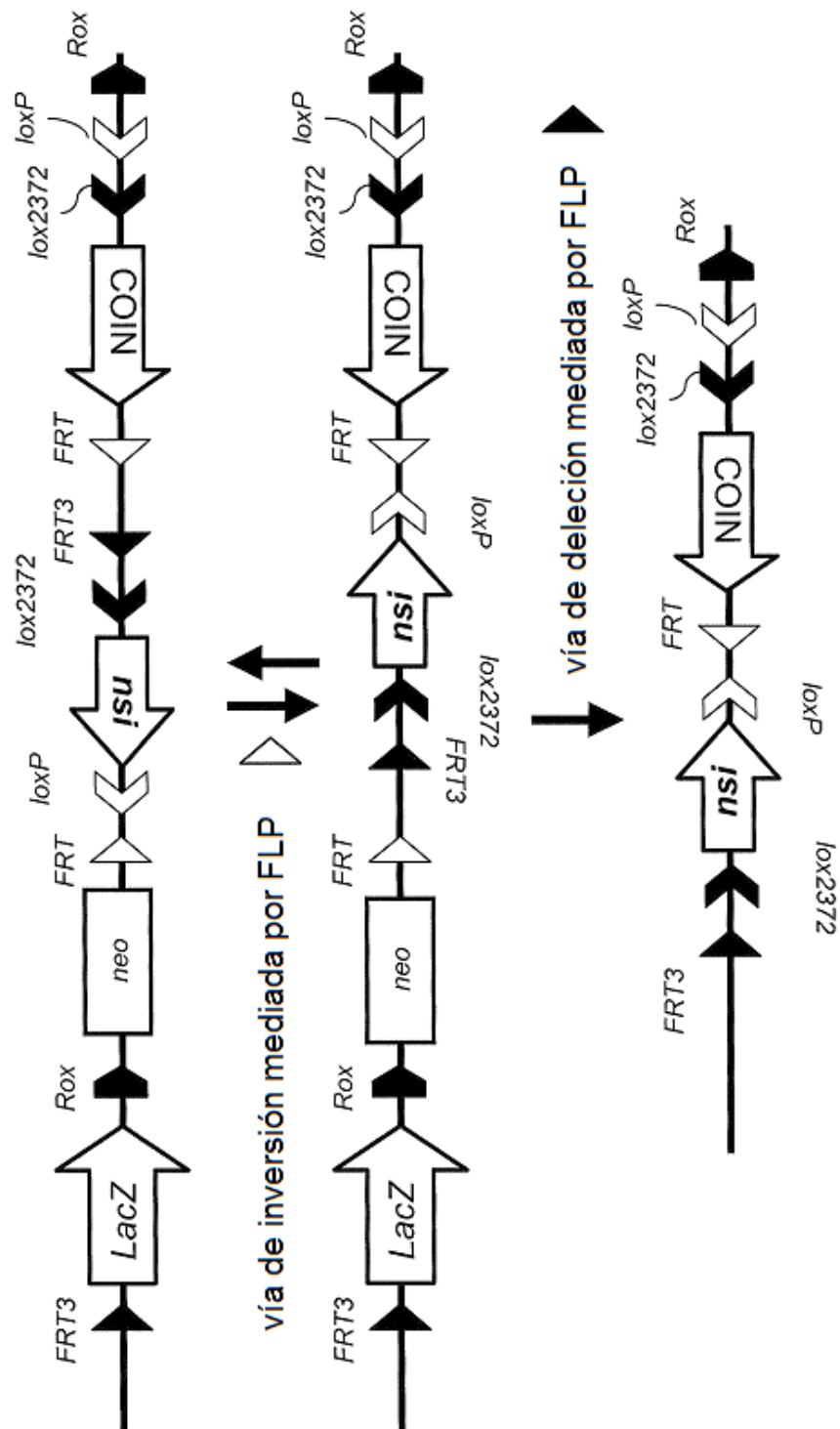


FIG. 6

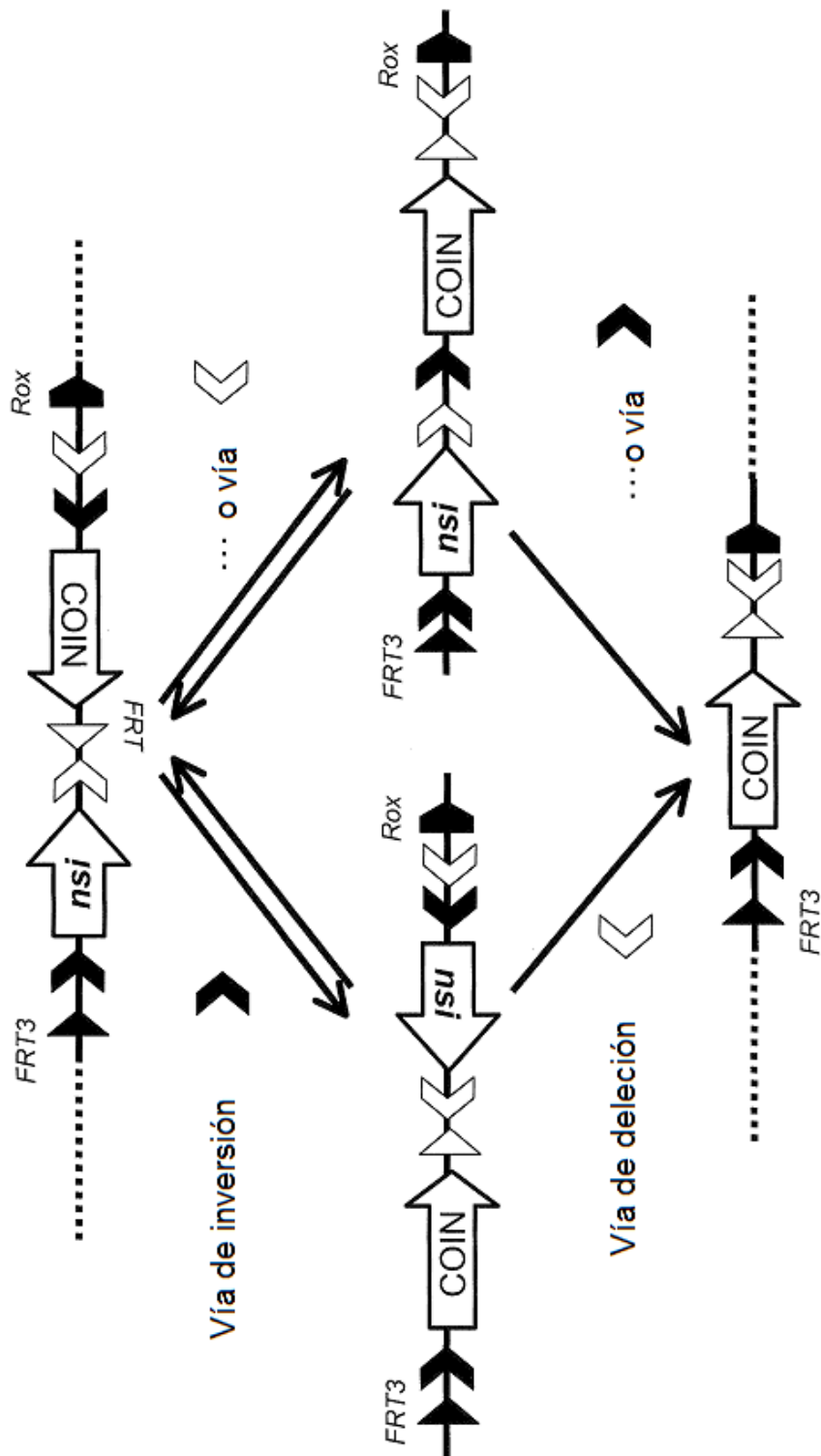


FIG. 7

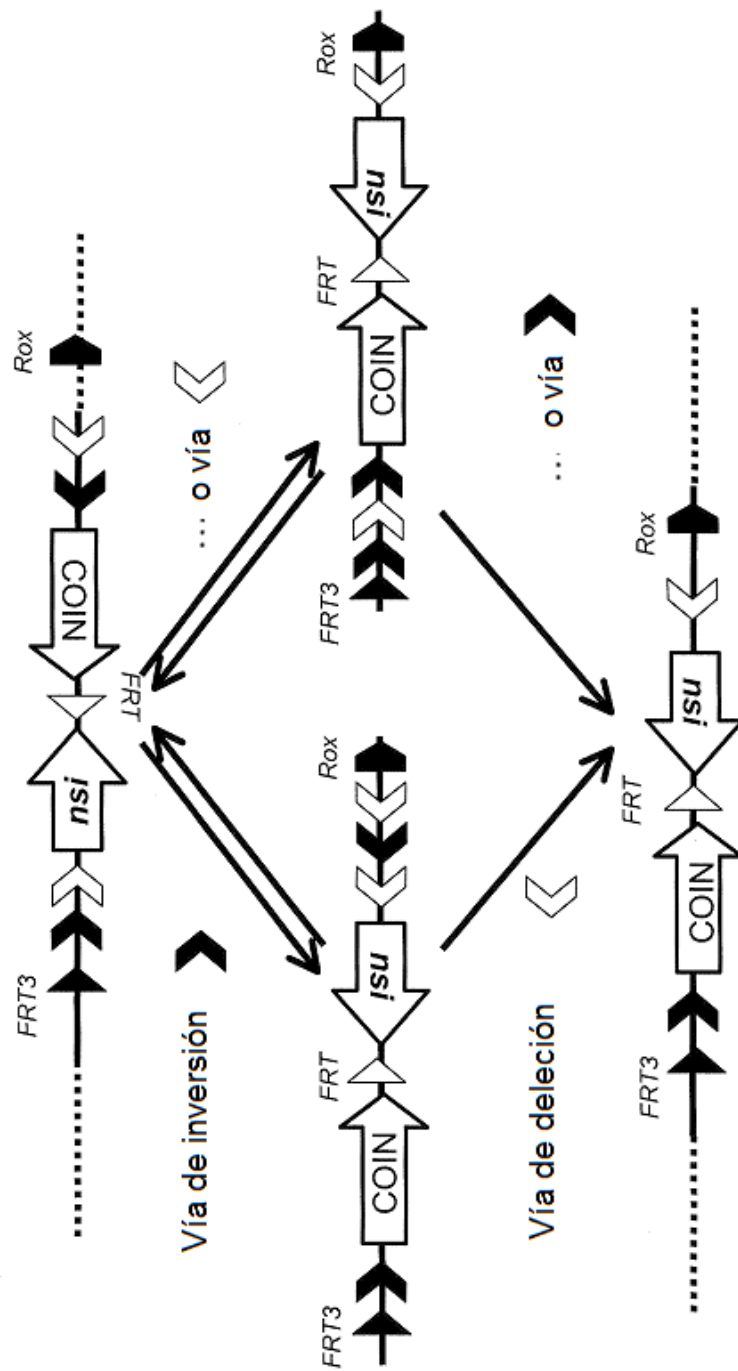


FIG. 8

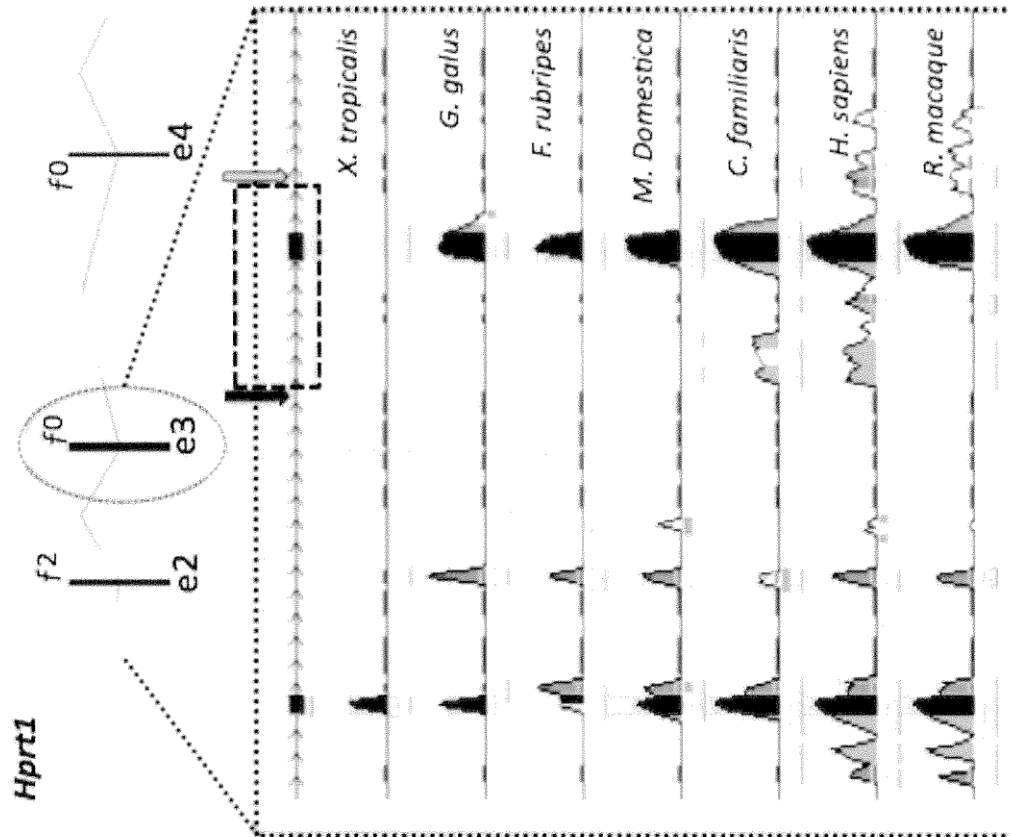


FIG. 9

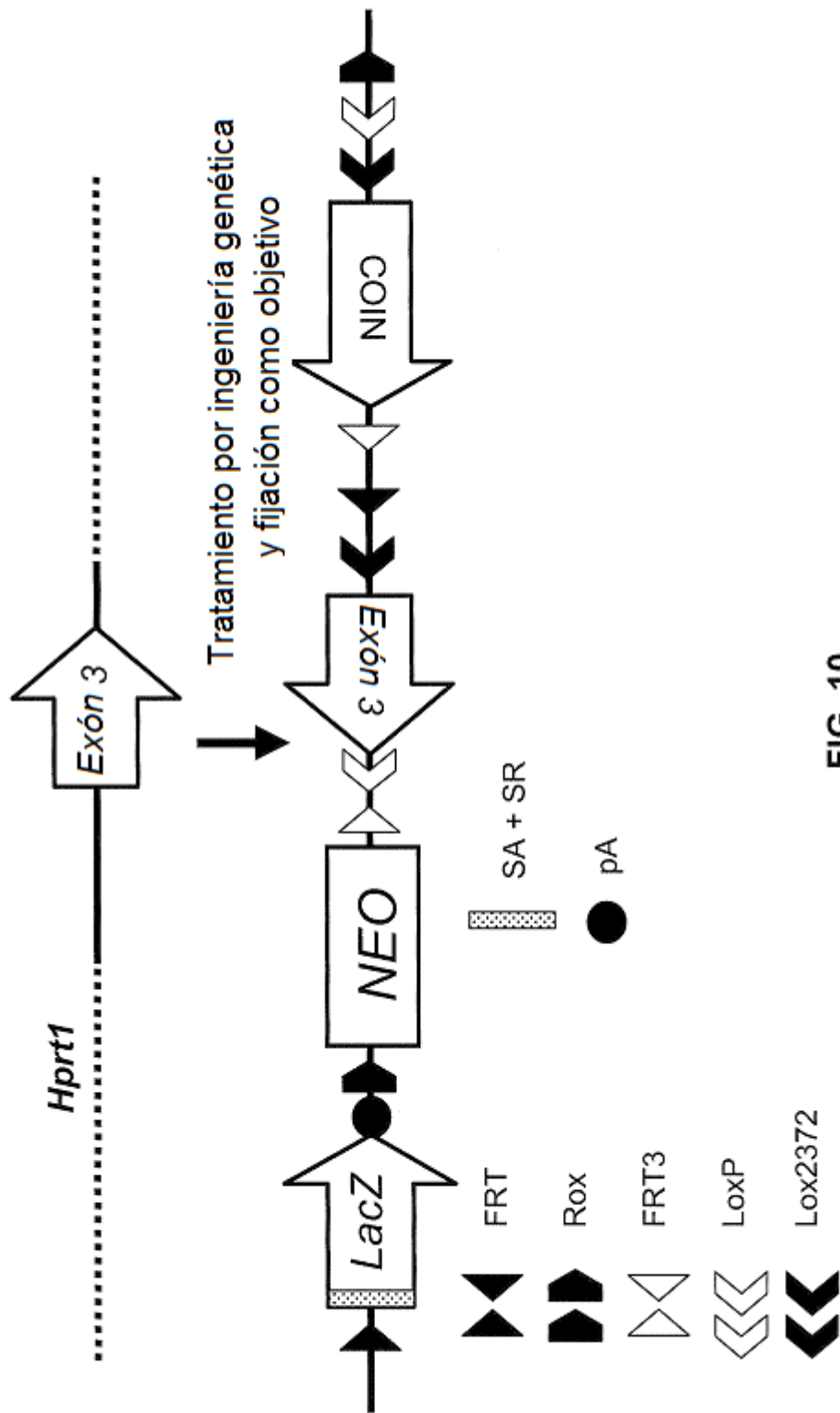


FIG. 10

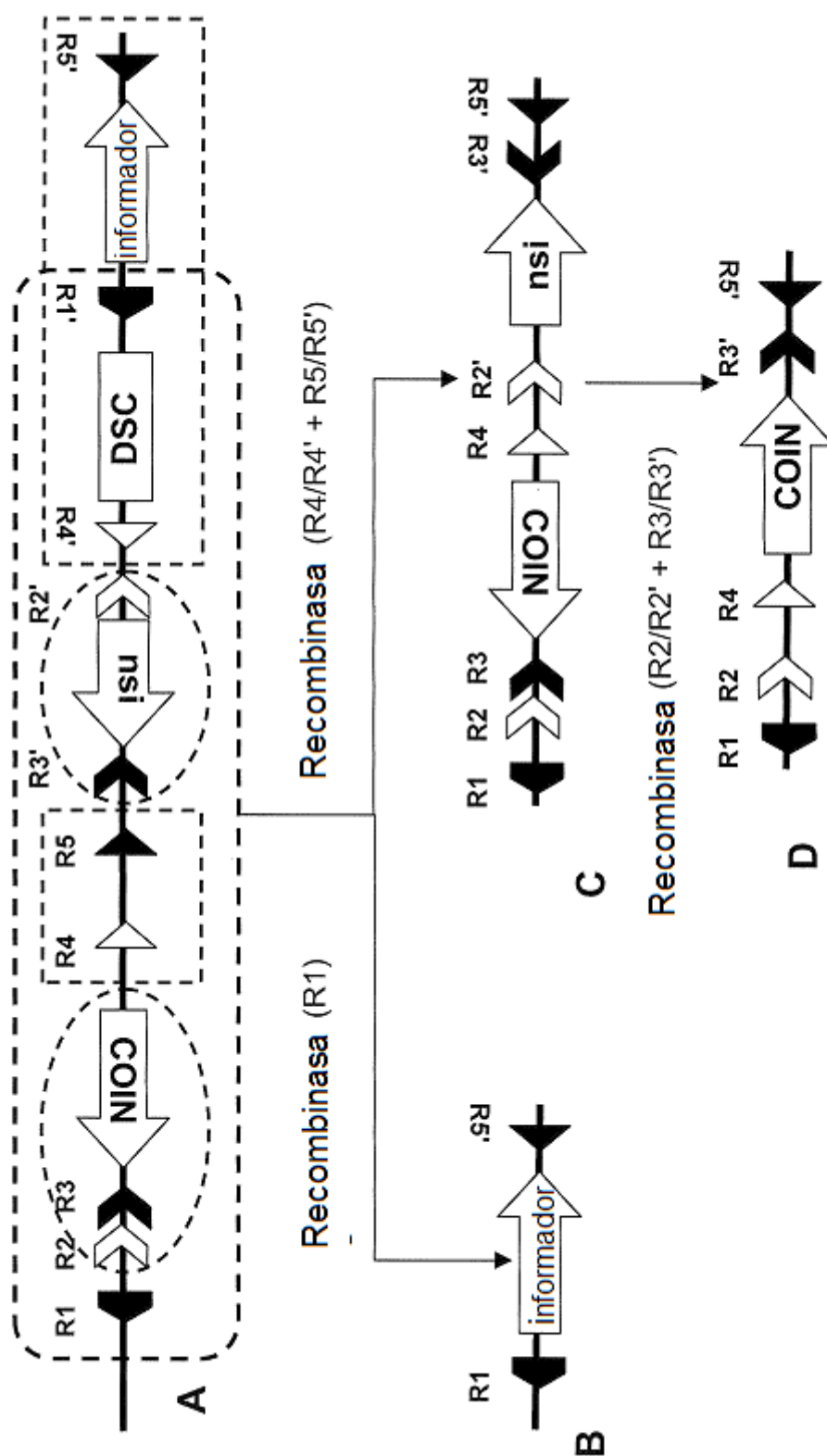


FIG. 11

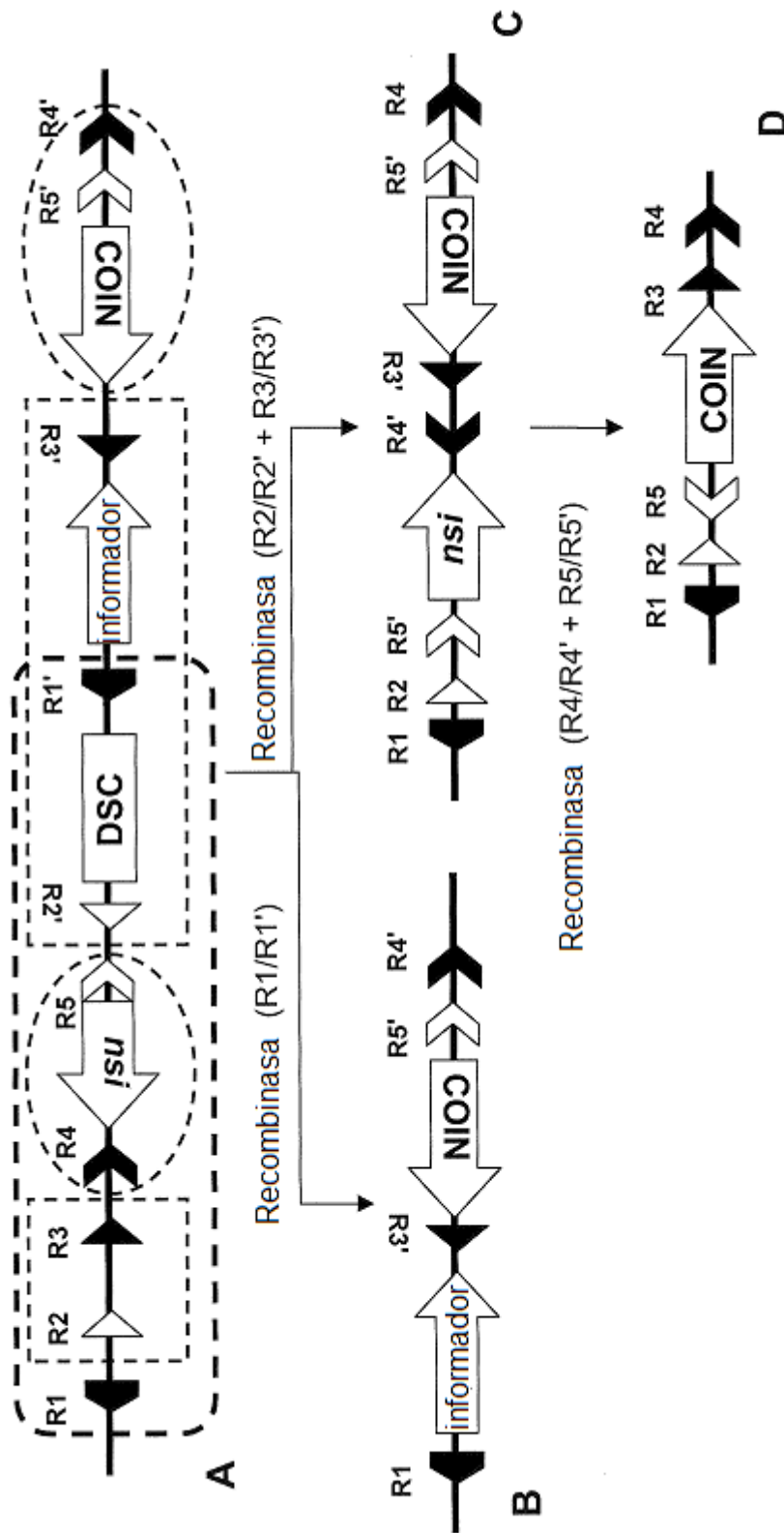


FIG. 12

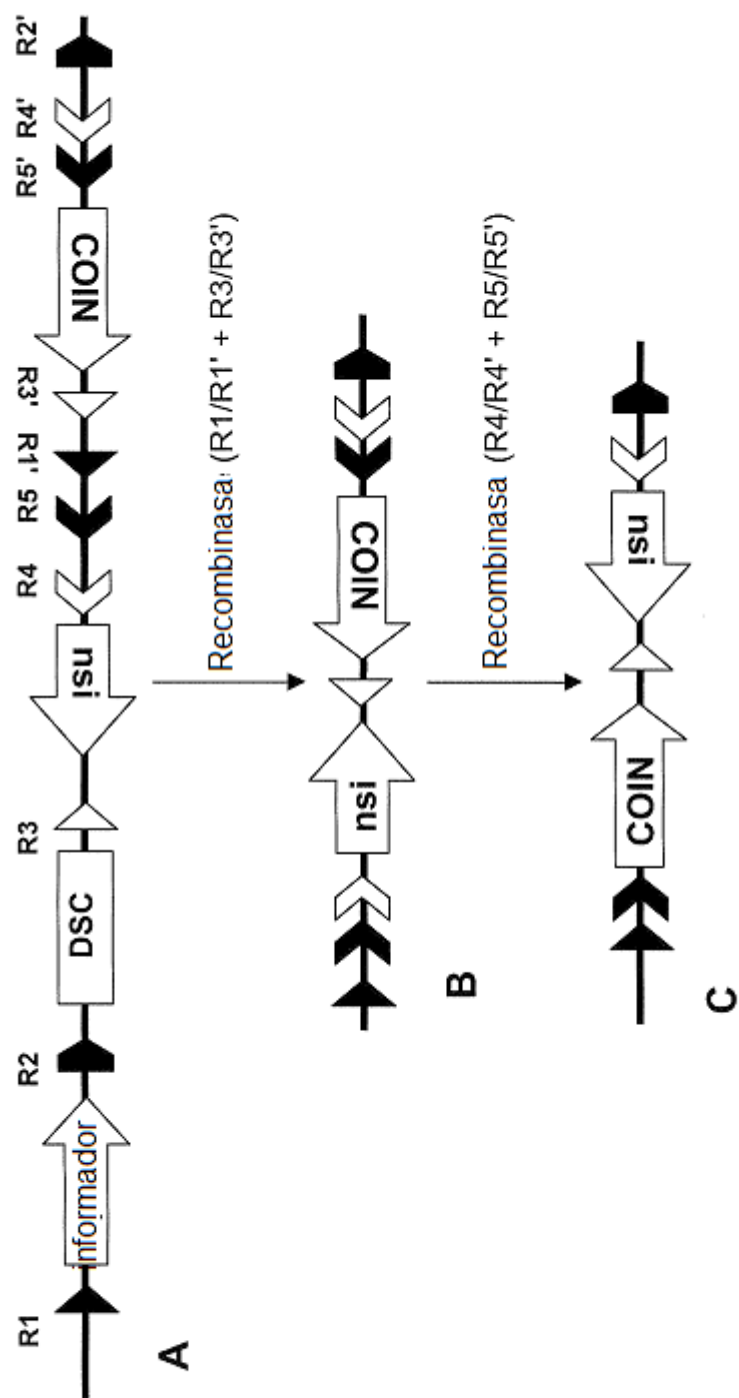


FIG. 13

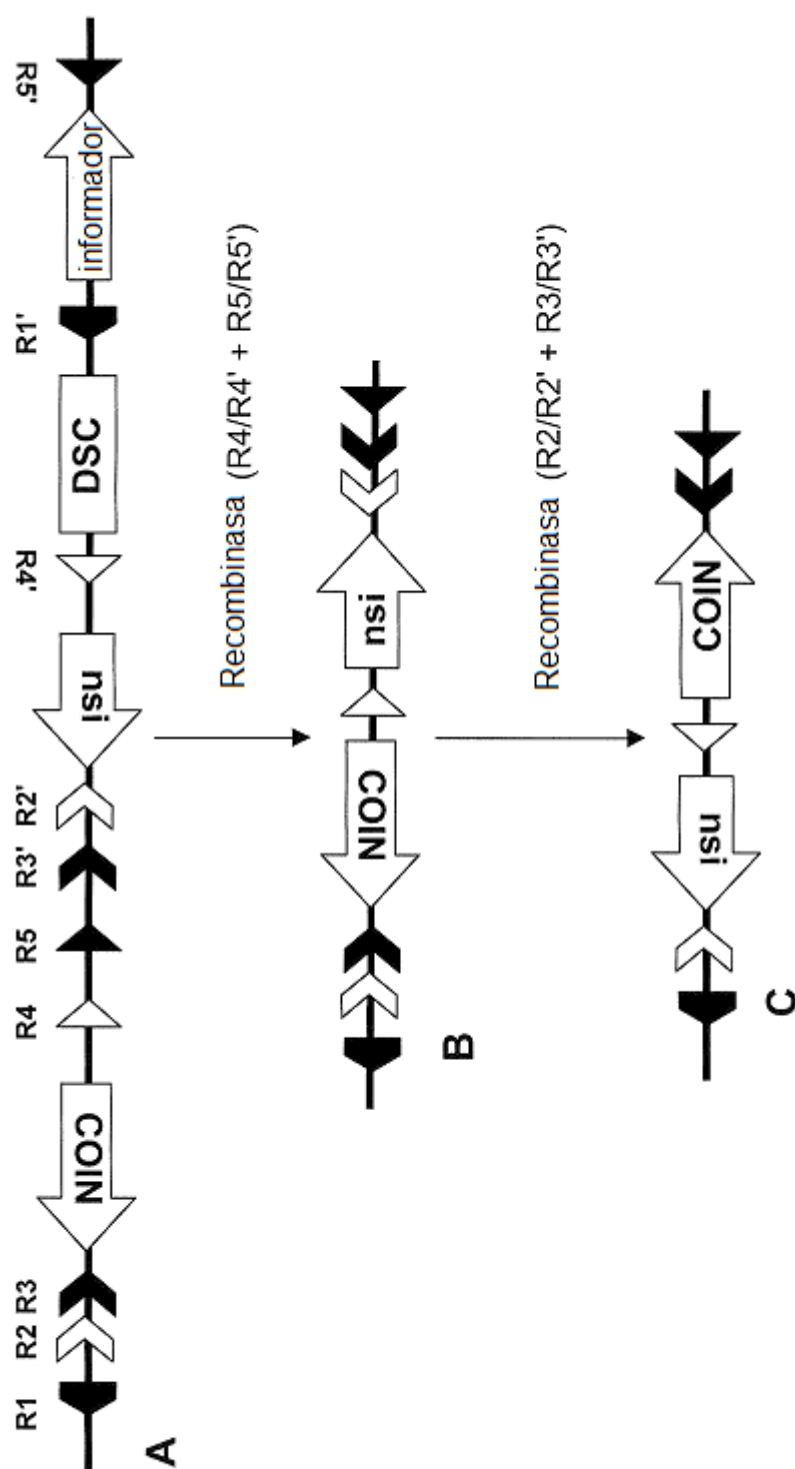


FIG. 14

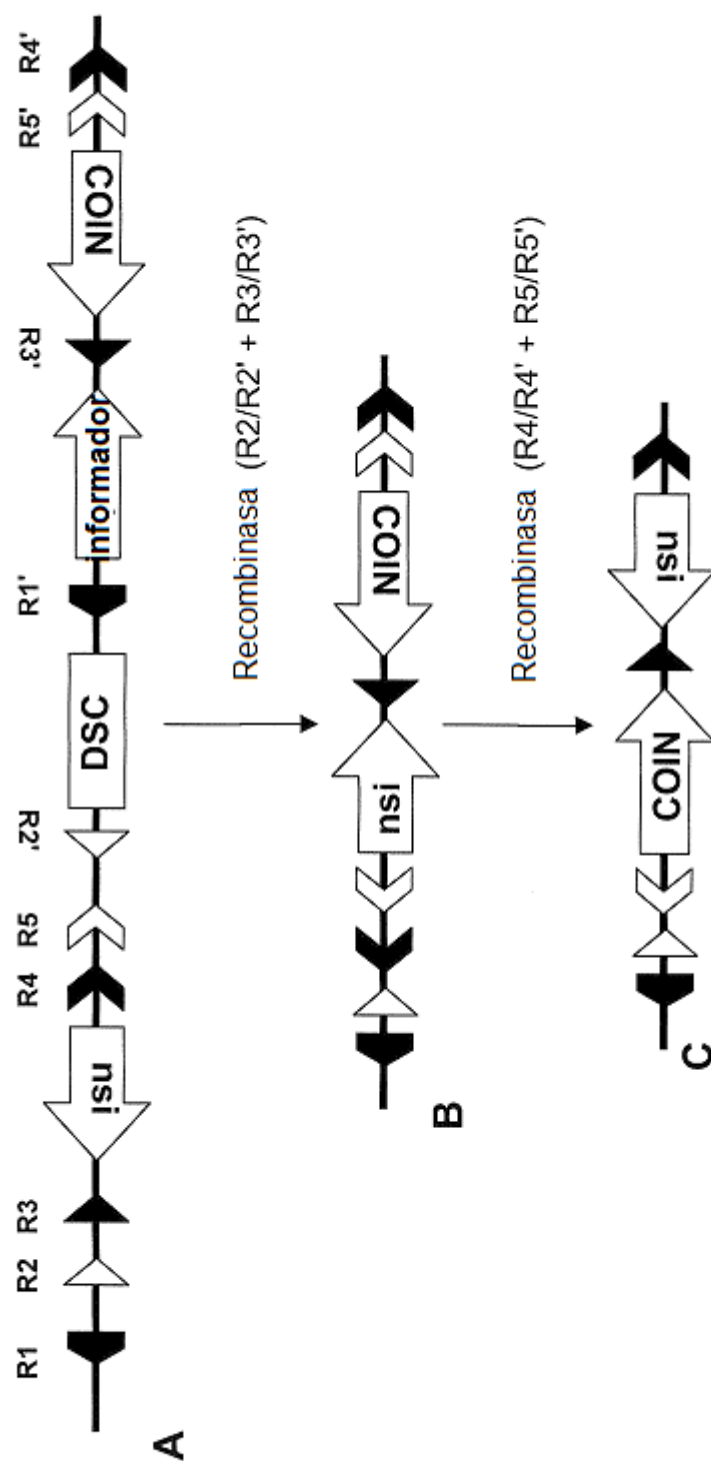


FIG. 15

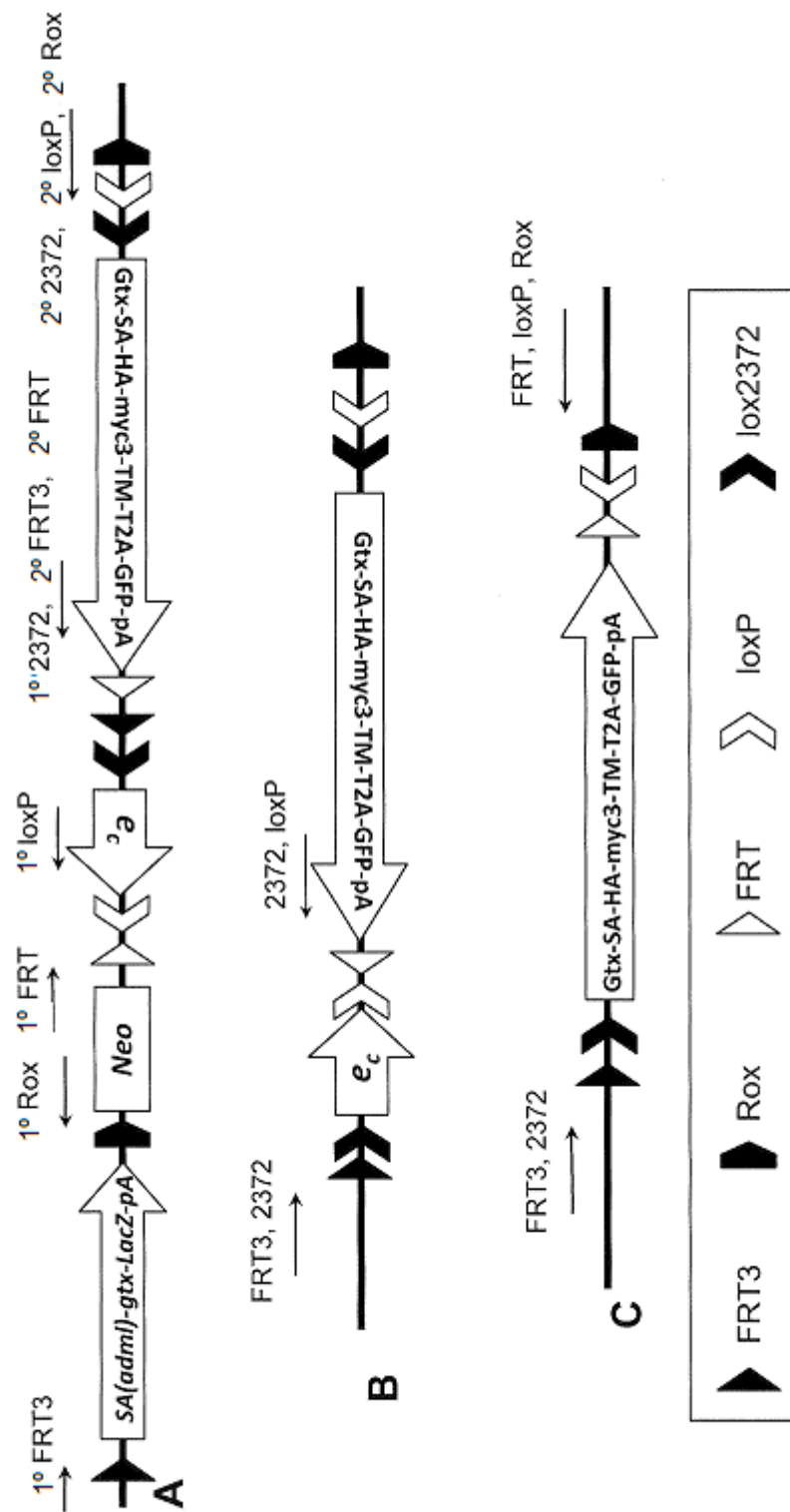


FIG. 16

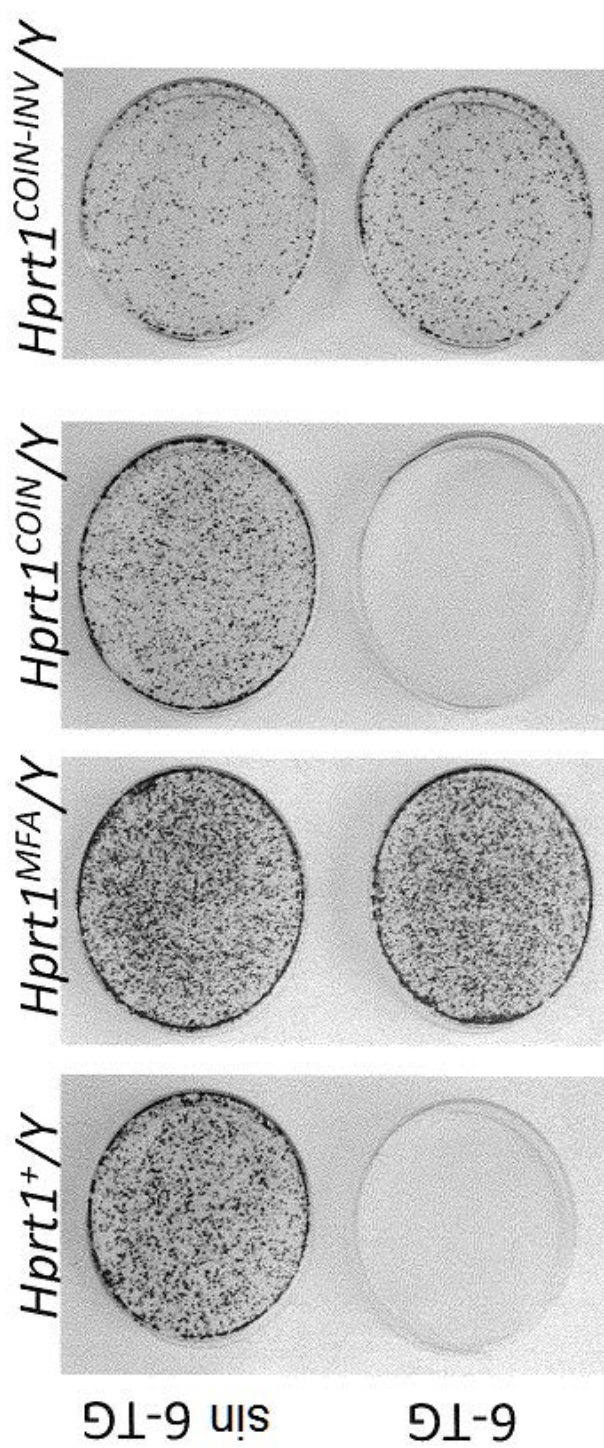


FIG. 17

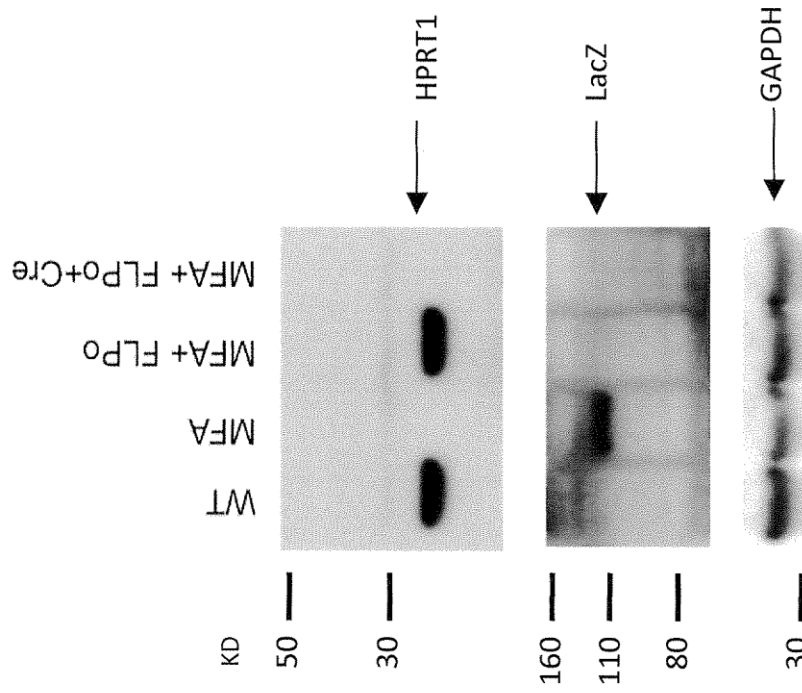


FIG. 18