

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 570 505**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.05.2005 E 05753195 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.12.2015 EP 1766063**

54 Título: **Métodos y kits para detectar el angioedema hereditario de tipo III**

30 Prioridad:

18.05.2004 EP 04011790

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

18.05.2016

73 Titular/es:

**DEWALD, GEORG (100.0%)
TRIERER STRASSE 55
53115 BONN, DE**

72 Inventor/es:

DEWALD, GEORG

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 570 505 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

Métodos y kits para detectar el angioedema hereditario de tipo III.

5 La presente invención se refiere a un método de diagnóstico del angioedema hereditario de tipo III (AEH III) o a una predisposición al mismo en un sujeto que se sospecha que ha desarrollado o que presenta una predisposición a desarrollar un angioedema hereditario de tipo III o en un sujeto que se sospecha que es portador de angioedema hereditario de tipo III, comprendiendo el método la determinación *in vitro* a partir de una muestra biológica de dicho sujeto de la presencia o la ausencia de una mutación asociada a enfermedad en una molécula de ácidos nucleicos codificante del factor de coagulación XII, siendo la mutación: (i) una mutación 6927C→A o una mutación 6927C→G de la secuencia natural ("wild-type") de SEC ID nº 3, o (ii) que afecta al residuo aminoácido 309 que corresponde al residuo aminoácido 328 de la secuencia ilustrada en SEC ID nº 2, en la que la presencia de dicha mutación es indicativa de un angioedema hereditario de tipo III o de una predisposición a la misma.

15 Si no se indica lo contrario, todas o cualquier combinación de etapas (incluyendo etapas individuales únicamente) llevadas a cabo en el método de la presente invención y citadas en la totalidad de dicha memoria puede llevarse a cabo en cualquier combinación de *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*.

20 Las formas convencionales o clásicas de angioedema hereditario (AEH) es conocido que son trastornos dominantes autosómicos. Se reconocen dos tipos (Rosen *et al.*, Science 148:957-958, 1965), ambos relacionados con una deficiencia de inhibidor de C1 causada por mutaciones en el gen inhibidor C1 (Bissler *et al.*, Proc. Assoc. Am. Physicians 109:164-173, 1997; Zuraw y Herschbach, J. Allergy Clin. Immunol. 105:541-546, 2000; Bowen *et al.*, Clin. Immunol. 98:157-163, 2001). El gen defectuoso produce nada de inhibidor de C1 (AEH de tipo I) o un inhibidor de C1 disfuncional (AEH de tipo II). Recientemente se ha descrito otro tipo de angioedema hereditario (Bork *et al.*, Lancet 356:213-217, 2000; Binkley y Davis, J. Allergy Clin. Immunol. 106:546-550, 2000; Martin *et al.*, J. Allergy Clin. Immunol. 107:747, 2001) y aparentemente este nuevo tipo está estrechamente relacionado, posiblemente siendo idéntico, a una entidad de enfermedad ya descrita en 1986 por Warin *et al.* (Br. J. Dermatol. 115:731-734) en dos hermanas. En pacientes con dicho nuevo tipo de angioedema hereditario/familiar, los niveles de proteína inhibidora de C1 y de función inhibidora de C1 (determinada mediante ensayos antigénicos y funcionales) son normales. Esta enfermedad ha sido denominada AEH de tipo III por Bork *et al.* (Lancet 356:213-217, 2000). El defecto genético subyacente al angioedema hereditario de tipo III todavía no se conoce. Hasta ahora, esta enfermedad se ha informado exclusivamente en mujeres, aunque a partir del análisis del pedigrí se infiere la existencia de portadores masculinos (Binkley y Davis, 2000; Martin *et al.*, 2001). Se presume que la herencia es autosómica dominante (Binkley y Davis, 2000; Martin *et al.*, 2001; Binkley y Davis, J. Allergy Clin. Immunol. 107:747-748, 2001), se ha observado la transmisión hombre a hombre en una familia (Martin *et al.*, 2001). Sin embargo, se ha comentado la posibilidad de heterogeneidad genética, incluyendo la posibilidad de herencia mediante el cromosoma X finalmente en algunas familias (Bork *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2001; Binkley y Davis, 2001). La manifestación clínica del AEH de tipo III, en particular con respecto a la frecuencia e intensidad de los síntomas, aparentemente es bastante variable y puede reducirse la penetrancia de la enfermedad (Bork *et al.*, Lancet 356:213-217, 2000; Bork *et al.*, Am. J. Med. 114:294-298, 2003). Por lo tanto, podría conjeturarse que algunos pacientes diagnosticados con "angioedema idiopático" finalmente resultan afectados por angioedema hereditario de tipo III, y que la enfermedad no se ha manifestado (todavía) en ninguno de sus parientes (Bork *et al.*, Am. J. Med. 114:294-298, 2003). En aproximadamente dos tercios de las mujeres afectadas por AEH de tipo III, los síntomas de angioedema se precipitan o resultan exacerbados por anticonceptivos orales o terapia de sustitución hormonal (Bork *et al.*, 2003); el embarazo también podría ser un importante factor precipitador, por lo menos en algunas familias (Binkley y Davis, 2000). Se supone que los estrógenos exógenos y endógenos son responsables de estos efectos precipitadores o exacerbantes, respectivamente (Binkley y Davis, 2000, 2001; Bork *et al.*, 2000, 2003). Basándose en la información actualmente disponible, la presentación del AEH de tipo III aparentemente es muy similar a la del AEH de tipo I o II, excepto por su aparición exclusiva en mujeres.

50 Cugno *et al.* (Immunopharmacology 33:361-364, 1996) describen la activación del factor XII y la división del quinógeno de alto peso molecular durante los ataques agudos en las deficiencias hereditarias y adquiridas de inhibidor de C1. El documento nº US 2004/033582 describe polimorfismos de nucleótido único humanos. Schloesser *et al.* (Blood 90, 10:3967-3977, 1997) describe mutaciones en el gen del factor XII humano. Bork *et al.* (The American Journal of Medicine 114:294-298, 2003) describen episodios recurrentes de angioedema de la piel y ataques severos de dolor abdominal inducidos por anticonceptivos orales o terapia de sustitución hormonal. Kanaji *et al.* (Blood 91, 6:2010-2014, 1998) describen que un polimorfismo genético común (sustitución 46 C por T) en la región 5'-no traducida del gen del factor XII de coagulación se asocia a una baja eficiencia de traducción y a una reducción del nivel del factor plasmático XII. El documento nº WO 01/79228 describe haplotipos del gen del factor de coagulación XII humano. El documento nº WO 92/14843 describe aptámeros específicos de biomoléculas. El nº de acceso AF538691 de la base de datos Genbank describe el gen del factor de coagulación XII de Homo sapiens (factor de Hageman) (F12). La patente EP 0 989 184 describe un animal transgénico defectivo en factor de coagulación XIII. Bork *et al.* (The American Journal of Medicine 116:644-645, 2004) describen el angioedema hereditario de tipo III y el angioedema asociado a antagonistas del receptor de la angiotensina II. Bork *et al.* (The Lancet 356:213-217, 2000) describen el angioedema hereditario con actividad normal de inhibidor de C1 en mujeres. Soria *et al.* (Am. J. Hum. Genet. 70:567-574, 2002) indican que un locus de un carácter cuantitativo en el gen del

factor XII humano influye tanto sobre los niveles del factor plasmático XII como sobre la susceptibilidad a la enfermedad trombotica. Agostini *et al.* (Journal of Allergy and Clinical Immunology 114, 3:S51-S131, 2004) describen angioedema hereditario y adquirido. El número de acceso AAF98777 de la base de datos GeneSeq describe un oligonucleótido receptor de factor I estimulante de colonias.

La deficiencia del inhibidor de la esterasa C1 funcional proporciona medios útiles de detección del angioedema hereditario de tipos I y II, ya que la sustitución con una preparación farmacéutica de inhibidor de C1 humano proporciona un medio útil de tratamiento, así como de prevención, de estos tipos de angioedema hereditario. En contraste, todavía no se ha identificado un método eficaz para la detección, el tratamiento y la prevención del angioedema hereditario de tipo III.

De esta manera, el problema técnico subyacente de la presente invención es proporcionar medios y métodos de diagnóstico del angioedema hereditario de tipo III o de una predisposición al mismo, así como para la prevención y el tratamiento del angioedema hereditario de tipo III.

La solución a dicho problema técnico se consigue proporcionando las formas de realización caracterizadas en las reivindicaciones.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico del angioedema hereditario de tipo III (AEH III) o de una predisposición al mismo, en un sujeto que se sospecha que ha desarrollado o que presenta una predisposición a desarrollar angioedema hereditario de tipo III, o en un sujeto que se sospecha que es portador de angioedema hereditario de tipo III, comprendiendo el método la determinación *in vitro* a partir de una muestra biológica de dicho sujeto de la presencia o la ausencia de una mutación asociada a enfermedad en una molécula de ácidos nucleicos codificante del factor de coagulación XII, siendo la mutación: (i) 6927C→A o una mutación 6927C→G de la secuencia natural de SEC ID nº 3, o (ii) que afecta al residuo aminoácido 309, que corresponde al residuo aminoácido 328 de la secuencia ilustrada en SEC ID nº 2, en la que la presencia de dicha mutación es indicativa de un angioedema hereditario de tipo III o de una predisposición al mismo.

La expresión "ácido nucleico" o "molécula de ácidos nucleicos" se refiere a ADN o ARN, incluyendo ADN genómico, ADNc, ARNm, ARNnh, etc., así como las quimeras de los mismos. Se encuentran incluidas las moléculas de ácidos nucleicos modificadas artificialmente que portan bases modificadas químicamente. Todas las moléculas de ácidos nucleicos pueden ser de cadena sencilla o de doble cadena.

En principio, la detección de por lo menos una mutación asociada a enfermedad, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más mutaciones o combinaciones de diversas mutaciones en por lo menos un alelo es una indicación de que el sujeto que debe diagnosticarse con respecto a una predisposición o susceptibilidad a una enfermedad potencialmente existente o debido a que está afectado por la enfermedad es un portador. En general, en el caso de que una mutación asociada a enfermedad sea dominante, puede ser causativa de la aparición o progresión de la enfermedad y un diagnóstico de heterocigosidad como únicamente presente en el genoma, será indicativo de que el sujeto presenta una tendencia a desarrollar la enfermedad si no la sufre ya. Un carácter recesivo de una mutación indicará más probablemente que sólo su incidencia homocigótica presentará un impacto directo sobre la aparición o progreso de la enfermedad, mientras que su incidencia en forma heterocigótica cualificará al sujeto como únicamente portador, a menos que otras mutaciones presentes concomitantemente contribuyan a la aparición o progreso de la enfermedad.

La expresión "que diagnostica" se refiere a la evaluación de si un individuo o sujeto presenta o no una mutación específica asociada a angioedema hereditario de tipo III y a la conclusión a partir de la presencia de dicha mutación de que el individuo o sujeto presenta un angioedema hereditario de tipo III (AEH III) o una predisposición al mismo, o una predisposición a desarrollar angioedema hereditario de tipo III o que es un portador de angioedema hereditario de tipo III.

La expresión "angioedema hereditario" se refiere a una anomalía hereditaria que causa hinchazones de la piel, síntomas gastrointestinales (ataques de dolor abdominal) debidos al edema de la pared intestinal, o edema de la lengua o edema laríngeo, que pueden resultar finalmente en la muerte por asfixia. Hasta recientemente se reconocían dos formas de angioedema hereditario (AEH), el tipo I y el tipo II (Rosen *et al.*, Science 148:957-958, 1965), ambas heredadas de manera autosómica dominante y relacionadas con una deficiencia del inhibidor de C1 causada por mutaciones en el gen del inhibidor de C1 (Bissler *et al.*, Proc. Assoc. Am. Physicians 109:164-173, 1997; Zuraw y Herschbach, J. Allergy Clin. Immunol. 105:541-546, 2000; Bowen *et al.*, Clin. Immunol. 98:157-163, 2001). El gen defectivo produce nada de inhibidor de C1 (AEH de tipo I) o un inhibidor de C1 disfuncional (AEH de tipo II). Con respecto al angioedema hereditario debido a la deficiencia de inhibidor de C1, se considera generalmente que la bradiquinina (y seguidamente quininas relacionadas) es un mediador importante en el desarrollo del angioedema (Nussberger *et al.*, Lancet 351:1693-1697, 1998; Kaplan *et al.*, J. Allergy Clin. Immunol. 109:195-209, 2002; Han *et al.*, J. Clin. Invest. 109:1057-1063, 2002; Cugno *et al.*, Int. Immunopharmacol. 3:311-317, 2003). Sin embargo, también se ha considerado que una quinina derivada del componente del complemento C2, tras una activación finalmente incrementada o no controlada de la ruta clásica del complemento, resulta de significación fisiopatológica (Donaldson *et al.*, Trans. Assoc. Am. Physicians 90:174-183, 1977; Strang *et al.*, J. Exp. Med.

168:1685-1698, 1988).

La expresión "angioedema hereditario de tipo III" tal como se utiliza en toda la descripción de la presente invención, se refiere a la enfermedad descrita por Bork *et al.* (Lancet 356:213-217, 2000) y Binkley y Davis (J. Allergy Clin. Immunol. 106:546-550, 2000), siendo la enfermedad descrita por Warin *et al.* (Br. J. Dermatol. 115:731-734, 1986) probablemente una estrechamente relacionada o incluso idéntica. El angioedema hereditario de tipo III se caracteriza por síntomas similares a los observados en el AEH de tipos I y II. Sin embargo, el nivel en el plasma sanguíneo y la actividad del inhibidor de la esterasa C1 son normales y hasta ahora la enfermedad se ha informado exclusivamente en mujeres. Según la presente invención, el angioedema hereditario de tipo III puede incluir varios subtipos potenciales: Binkley y Davis (J. Allergy Clin. Immunol. 107:747-748, 2001) han sugerido diferenciar entre: (1) un tipo sensible a estrógenos (en el que los síntomas se agravan pero no son estrictamente dependientes de los niveles elevados de estrógenos), y (2) un tipo dependiente de estrógenos (en el que se produce una dependencia absoluta de los síntomas). Además, según los datos presentados por Bork *et al.* (2003, 2000), aparentemente en prácticamente un tercio de los pacientes los síntomas no resultan influenciados por la exposición a estrógenos; estos pacientes pueden representar un tercer subtipo (3) de AEH de tipo III con respecto a la sensibilidad a estrógenos. n cuarto subtipo (4) de AEH de tipo III aparentemente es la enfermedad descrita por Warin *et al.*, 1986: un tipo familiar de angioedema recurrente con niveles normales de inhibidor de C1, inducido por estrógenos, aunque con síntomas ocasionales de urticaria. Un quinto subtipo (5) puede ser "AEH de tipo III con historia familiar negativa", una expresión que se entiende en la presente memoria como equivalente a "angioedema idiopático", es decir, un angioedema recurrente que no puede atribuirse a ninguna de las formas relacionadas con inhibidor de C1 de angioedema hereditario o adquirido o a cualquiera de las causas inducidas farmacológicamente o físicas conocidas: determinados pacientes clasificados como casos de "angioedema idiopático" pueden representar, de hecho, pacientes con AEH de tipo III, es decir, pacientes de AEH de tipo III en los que la enfermedad todavía no se ha manifestado en ningún familiar (por ejemplo debido a una penetrancia reducida), o pacientes de AEH de tipo III con una historia familiar negativa causada por una mutación *de novo*. Finalmente, un sexto subtipo (6) de AEH de tipo III puede manifestarse en hombres, finalmente sólo en presencia de determinados factores precipitadores (genéticos o ambientales).

El término "predisposición", según la presente invención, se refiere a una condición genética que: (a) incrementa el riesgo de desarrollo de una enfermedad o fomenta o facilita el desarrollo de una enfermedad y/o que (b) facilita la transmisión a la progenie de alelos específicos de un gen que incrementan el riesgo o fomentan el desarrollo de dicha condición o enfermedad.

La expresión "muestra biológica", según la presente invención, se refiere a un espécimen obtenido de un mamífero. Preferentemente dicho espécimen se obtiene de pelo, piel, superficies mucosales, líquidos corporales, incluyendo sangre, plasma, suero, orina, saliva, esputo, lágrimas, líquido cerebroespinal, semen, líquido sinovial, líquido amniótico, leche materna, linfa, esputo pulmonar, secreción bronquial, o heces.

El término "mutación" comprende, entre otros, sustituciones, adiciones, inserciones, inversiones, duplicaciones o deleciones en moléculas de ácidos nucleicos, en las que una o más posiciones de nucleótido pueden resultar afectadas por una mutación. Estas mutaciones se producen respecto a la secuencia de ácidos nucleicos natural. Debido a que la secuencia de ácidos nucleicos "natural" o "normal" del gen del factor de coagulación XII se considera en la presente memoria la secuencia (bases 1 a 10616) proporcionada en GenBank nº de acc. AF 538691 y, con respecto a las secuencias flanqueantes extendidas, la secuencia proporcionada en la secuencia de referencia humana del UCSC Genome Browser, v. 53 (ver *infra*) en julio de 2003. Una mutación puede afectar preferentemente hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o incluso hasta 20, 30, 40, 50 o hasta 1.000 nucleótidos. Sin embargo, también es concebible que resulten afectadas secuencias incluso mayores. Por lo tanto, el término "mutación" se refiere además a, por ejemplo, una deleción, sustitución o inserción de hasta 10.000 o de hasta 20.000 nucleótidos, comprendiendo además la situación en la que la secuencia codificante, no codificante y/o regulador completa de un gen resulte afectada. Las mutaciones pueden implicar regiones génicas codificantes o no codificantes. La expresión "no codificante" preferentemente se refiere a intrones, a las partes no codificantes de exones, a secuencias reguladoras 5'- y 3'-flanqueantes, de esta manera también las secuencias de control de la expresión, incluyendo elementos de control tales como promotores, intensificadores, silenciadores, terminadores de transcripción y sitios de poliadenilación. Es bien conocido por el experto en la materia que las mutaciones en estas regiones de un gen pueden presentar un impacto sustancial sobre la expresión génica, finalmente también con respecto a tejidos específicos. Por ejemplo, las mutaciones en estos sitios pueden resultar en una parada prácticamente completa de la expresión génica o en una sobreexpresión drástica. Sin embargo, las mutaciones en regiones no codificantes también pueden ejercer efectos importantes mediante la alteración del proceso de procesamiento; este tipo de mutaciones puede, por ejemplo, afectar a las secuencias de consenso de intrón en los sitios de procesamiento y de ramificación, en ocasiones activan sitios críticos o crean sitios de procesamiento ectópico.

Por otra parte, una mutación puede residir también en la región codificante de un gen y afectar gravemente a las características estructurales y/o funcionales de la proteína, por ejemplo causando sustituciones de aminoácidos. Sin embargo, incluso las mutaciones denominadas silenciosas o sinónimas no deben ser necesariamente silenciosas. Por ejemplo, las mutaciones dentro de intensificadores o silenciadores de procesamiento exónicos pueden afectar al procesamiento del ARNm, que pueden, por ejemplo, alterar la estructura de la proteína o provocar variabilidad

fenotípica y una penetrancia variable de mutaciones en otros sitios del gen (Liu H.-X. *et al.*, Nature Genet. 27:55-58, 2001; Blencowe, TIBS 25:106-110, 2000; Verlaan *et al.*, Am. J. Hum. Genet. 70, 2002; Pagani *et al.*, Hum. Mol. Genet. 12:1111-1120, 2003).

5 Sin embargo, es bien conocido en la técnica que no cualquier desviación respecto de una secuencia de referencia dada debe resultar necesariamente en una condición de enfermedad o una predisposición a la misma. Por ejemplo, el gen codificante del factor de coagulación XII humano es conocido que existe en varias variaciones que comprenden polimorfismos o variantes polimórficas, tales como las depositadas en el banco de datos de Seattle (<http://pga.gs.washington.edu>, University of Washington, 'Seattle SNPs').

10 El término "polimorfismo" o la expresión "variante polimórfica" se refiere a una variación común en la secuencia de ADN en diferentes individuos (glosario NHGRI). El término "común" se refiere a que existen dos o más alelos cada uno de los cuales se encuentra presente a una frecuencia de por lo menos 1% en una población. Habitualmente se entiende que los polimorfismos o por lo menos la mayoría de los polimorfismos representan variaciones que son benignos, funcionalmente neutros, que no presentan un efecto adverso sobre la función génica. Sin embargo, también resulta evidente que existen variantes polimórficas que pueden presentar un impacto con respecto al desarrollo de una enfermedad. Este impacto puede ser no sólo de predisposición a una enfermedad, sino, en determinados casos, también puede presentar un efecto protector, reduciendo el riesgo de manifestación de una enfermedad.

20 Considerando la existencia de variantes polimórficas, resulta razonable considerar la existencia de numerosas secuencias naturales alternativas. Por diversos propósitos de la presente invención, por ejemplo para el diseño de sondas nucleótidas y cebadores y también para el diseño de oligonucleótidos destinados al uso terapéutico, resultará importante considerar cuidadosamente la existencia de dichas secuencias variantes.

25 Aunque el término "mutación" se refiere básicamente a cualquier alteración o cambio en un gen respecto a su estado natural, con frecuencia se entiende como un cambio causante de enfermedad, como un cambio que causa un trastorno o la susceptibilidad hereditaria a un trastorno.

30 Para el experto en la materia y bajo determinadas circunstancias, la expresión "variante polimórfica" ("polimorfismo") y el término "mutación" presentan la misma connotación y se refieren al mismo fenómeno molecular, es decir, la alteración o desviación respecto a una secuencia natural ejemplificativa.

35 En el contexto de la presente invención, la expresión "mutación asociada a enfermedad" se refiere a una mutación en una molécula de ácidos nucleicos que regula la expresión o codifica el factor de coagulación XII y que se encuentra asociado a angioedema hereditario de tipo III o a una predisposición al mismo. Según la presente invención, una "mutación asociada a enfermedad" preferentemente es una mutación rara, preferentemente con una frecuencia <1%, y más preferentemente una mutación con un efecto de causación de enfermedad importante, una mutación dominante. Sin embargo, según la presente invención, se encuentra contemplado además que existen variantes polimórficas que pueden presentar una influencia sobre la predisposición a enfermedad y/o a la aparición o progreso de una enfermedad (ver infra) y que, de esta manera, representan además una "mutación asociada a enfermedad". Resulta importante indicar que un individuo afectado puede portar más de una mutación asociada a enfermedad. Con el fin de determinar si una mutación se encuentra asociada a enfermedad o no, el experto en la materia puede, por ejemplo, comparar la frecuencia de un cambio en una secuencia específica en pacientes afectados por AEH de tipo III con la frecuencia de dicho cambio de secuencia en individuos de control apropiadamente seleccionados, preferentemente individuos que nunca han manifestado ningún síntoma de angioedema, y concluir a partir de una frecuencia que se desvía de manera estadísticamente significativa en el grupo de pacientes que dicha mutación es una mutación asociada a enfermedad. El experto en la materia conocerá como diseñar dichas comparaciones entre pacientes y controles. Por ejemplo, los pacientes y los controles deben presentar edades y sexos correspondientes. Los controles podrían ser individuos que se consideran sanos, tales como donantes de sangre, aunque aparentemente también resulta posible una muestra de control de tipo poblacional, aunque se aprecia que entre este tipo de muestras puede existir un pequeño porcentaje de individuos incluidos que presentan una predisposición a la enfermedad. De esta manera, preferentemente, los controles deberían ser individuos que nunca han experimentado ninguno de los síntomas del angioedema. Según la presente invención, la expresión "estadísticamente significativo" se refiere a una medida matemática de diferencia entre grupos. Se dice que la diferencia es estadísticamente significativa en el caso de que sea superior a lo que se esperaría por azar solamente. Preferentemente un valor de $P < 0,10$, más preferentemente un valor de $P < 0,05$, todavía más preferentemente un valor de $P < 0,01$, calculado sin utilizar ninguna de las correcciones, tales como la corrección por pruebas múltiples, se considera indicativo de una diferencia significativa.

60 En los casos en los que se encuentra presente más de una mutación en una molécula de ácidos nucleicos, en la que dicha mutación está asociada a AEH de tipo III, puede resultar suficiente detectar la presencia de una mutación únicamente o de un número pequeño de mutaciones que se encuentran presentes de hecho en la molécula de ácidos nucleicos y asociadas a AEH de tipo III. Normalmente, no resulta relevante para el propósito del diagnóstico si dichas mutaciones asociadas son únicamente indicativas, presentando de esta manera por ejemplo un efecto observador, y no causativas, o si son causativas de la aparición o el progreso de la enfermedad.

5 El número de acceso de GenBank AF538691 presenta una secuencia de consenso del gen del factor de coagulación XII humano y de varias variantes polimórficas observadas en individuos caucásicos y negroides. En gran parte dichas variantes polimórficas y otras potencialmente existentes pueden ser funcionalmente neutras. Sin embargo, es posible que por lo menos algunas variantes polimórficas no sean neutras, es decir, que puedan mostrar consecuencias funcionales, cuantitativas o cualitativas como, por ejemplo, influir directamente sobre la susceptibilidad o predisposición al desarrollo de AEH de tipo III o modular el efecto patogénico de otra mutación asociada al angioedema hereditario de tipo III.

10 Por ejemplo, se encuentra contemplado que un polimorfismo común (46C/T) en la 5'-UTR (en el exón 1) del gen del factor de coagulación XII humano pueda resultar importante para la presente invención. Es conocido que dicho polimorfismo se encuentra significativamente asociado a la concentración plasmática de factor de coagulación XII (Kanaji *et al.*, Blood 91:2010-2014, 1998), estando asociado el alelo T a una eficiencia de traducción reducida; en ensayos funcionales y antigénicos, los individuos con el genotipo C/C muestran el 170% de la concentración observada en plasma normal agrupado, mientras que en individuos con el genotipo T/T, la concentración plasmática de factor XII es de 80% de la observada en plasma normal agrupado. Según la presente invención, por lo tanto, puede considerarse que el alelo C es un factor de riesgo cuya presencia puede incrementar el riesgo de desarrollar angioedema, por ejemplo en el caso de que se encuentre presente en un haplotipo con una mutación dominante asociada a enfermedad.

15 Es concebible que, de hecho, algunas de dichas variantes polimórficas representen una mutación asociada a enfermedad. También se encuentra contemplado que dicha situación aparezca por fenómenos de desequilibrio de ligamiento. Considerando dichas limitaciones, se considera en la presente memoria que la secuencia de consenso depositada que se ha indicado anteriormente representa la secuencia "natural".

20 Es importante indicar que la expresión "molécula de ácidos nucleicos que regula la expresión o que codifica el factor de coagulación XII" preferentemente comprende la secuencia genómica completa del gen del factor de coagulación XII, incluyendo las secuencias reguladoras flanqueantes extendidas (ver a continuación), así como secuencias o moléculas de ácidos nucleicos físicamente no relacionadas con el gen del factor de coagulación XII pero que ejercen efectos reguladores sobre la expresión del factor de coagulación XII. La expresión "molécula de ácidos nucleicos que regula la expresión o que codifica el factor de coagulación XII" se refiere además a partes de las secuencias anteriormente indicadas, por ejemplo el promotor de dicho gen.

25 La expresión "que regula la expresión" se refiere a que incluye, incluyendo que incrementa o que reduce la transcripción o la traducción. De acuerdo con lo anterior, el incremento o la reducción se refiere a producir más o menos, respectivamente, ARN o (poli)péptidos. La expresión "que regula la expresión" se refiere además a influir sobre procedimientos de procesamiento, así como a la expresión específica de tejido de un gen. El experto en la materia conocerá que la expresión puede encontrarse regulada, por ejemplo por secuencias intensificadoras o silenciadoras, señales de procesamiento, así como otras secuencias que afectan a los procesos de procesamiento, la unión de factores de transcripción, secuencias de poliadenilación, señales de transporte, terminador de transcripción y similares. También se encuentra contemplado que las secuencias de ácidos nucleicos físicamente no relacionadas con el locus del gen del factor de coagulación XII puedan participar en la regulación de la expresión del factor de coagulación XII y que, de esta manera, puedan presentar un impacto sobre el desarrollo de síntomas de angioedema. Por ejemplo, un locus génico en el brazo corto del cromosoma 10, en torno al marcador D10S1653, que se contempla que esté localizado dentro de la secuencia de nucleótidos que comprende los nucleótidos cr10:10.554.416 a cr10:18.725.506 (UCSC Genome Browser, julio de 2003) se ha demostrado que afecta al nivel plasmático del factor de coagulación XII (Soria *et al.*, Am. J. Hum. Genet. 70:567-574, 2002) y, de esta manera, puede afectar también a la susceptibilidad o al desarrollo de la enfermedad.

35 Las secuencias "codificantes del factor de coagulación XII" se refieren a la secuencia codificante del gen del factor de coagulación XII. Dicha expresión se refiere a la secuencia codificante genómica, así como a la secuencia codificante en una molécula de ARN o de ADNc.

40 La expresión "factor de coagulación XII" preferentemente se refiere al factor de coagulación XII, que es una serina proteasa circulante en el plasma en forma de un zimógeno inactivo de cadena sencilla de aproximadamente 80 kDa, Resulta particularmente preferente según la presente invención el factor de coagulación XII, correspondiente a la secuencia de ARNm proporcionada bajo el nº de acceso de GenBank NM_000505.2 y codificada por la molécula de ácidos nucleicos depositada bajo el número de acceso de GenBank AF538691 que se considera en la presente invención la secuencia del gen natural del factor de coagulación XII y que incluye secuencias promotoras 5' (hasta 1.581 pb cadena arriba del exón 1), secuencias exónicas codificantes y no codificantes, secuencias intrónicas y secuencias reguladoras flanqueantes 3', incluyendo 1.598 pb cadena abajo del final del exón 14, que corresponde al final del ARNm del factor de coagulación XII, tal como se proporciona bajo el número de acceso de GenBank NM_000505.2. Con respecto a las secuencias genómicas que se extienden más allá en sentido cadena arriba y cadena abajo, la secuencia que en la presente memoria se considera que representa la secuencia natural puede obtenerse de la secuencia de referencia humana de julio de 2003 del UCSC Genome Browser, v. 53, es decir, la secuencia del complemento inverso de cr5:176.807.093-176.821.530 (que representa 4.000 pb cadena arriba del

45

50

55

60

65

exón 1 y 3.000 pb cadena abajo del exón 14). La entrada de GenBank AF538691 se refiere al gen del factor de coagulación XII de *Homo sapiens* (factor de Hageman) (F12) del que se conocen de la técnica varias variantes (ver supra). La expresión "factor de coagulación XII" se refiere además a secuencias con una identidad de por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% en comparación la secuencia del número de acceso de GenBank AF538691. Además, la presente invención se refiere además a diversas isoformas de proteína correspondientes a diferentes transcritos producidos mediante procesamiento alternativo (por ejemplo los mostrados en "http://www.ncbi.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=human&l=F12"). Adicionalmente, la presente invención se refiere además a homólogos específicos en otros animales, preferentemente mamíferos, incluyendo la rata, el ratón, el cobaya, el cerdo, la vaca o el conejo. Las variantes polimórficas del factor de coagulación XII pueden comprender además variantes con grandes deleciones en, por ejemplo, regiones intrónicas. Dichas variantes pueden codificar, sin embargo, un (poli)péptido factor de coagulación XII de secuencia natural. Es importante indicar que al alinearla con la secuencia de AF538691, la identidad de secuencia calculada puede ser considerablemente inferior a la esperada para la variación polimórfica normal. De esta manera, resultan preferentes según la presente invención las variantes biológicamente activas y también los fragmentos de factor de coagulación XII codificados por una molécula de ácidos nucleicos con una identidad de secuencia de por lo menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, en comparación con la secuencia del número de acceso del banco de datos AF538691. La identidad de secuencia puede determinarse mediante la utilización del programa Bestfit® (Wisconsin Sequence Analysis Package, versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711). Bestfit® utilizan el algoritmo de homología local de Smith y Waterman para encontrar el mejor segmento de homología entre dos secuencias (Advances in Applied Mathematics 2:482-489, 1981). Al utilizar Bestfit® o cualquier otro programa de alineación de secuencias para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, 95% idéntica a una secuencia de referencia, los parámetros se fijan, evidentemente, de manera que el porcentaje de identidad se calcula a lo largo de la longitud completa de la secuencia de nucleótidos de referencia y se permitan huecos de homología de hasta 5% del número total de nucleótidos en la secuencia de referencia. La identidad entre una primera secuencia y una segunda referencia, también denominada alineación global de secuencias, se determina utilizando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag y colaboradores (Comp. App. Biosci. 6:237-245, 1990). En una alineación de secuencias, la secuencia pregunta y la secuencia de la base de datos son ambas secuencias de ADN. Puede compararse una secuencia de ARN mediante la conversión de los U en T. El resultado de dicha alineación global de secuencias se expresa como un porcentaje de identidad. Los parámetros preferentes utilizados en una alineación de FASTDB de secuencias de ADN para calcular el porcentaje de identidad son: Matriz=Unitaria, k-tupla=4, penalización por no correspondencia=1, penalización por unión=30, longitud de grupo de aleatorización=0, puntuación de corte=1, penalización de hueco=5, penalización por tamaño de hueco 0,05, tamaño de ventana=500 o la longitud de la secuencia de nucleótidos de la base de datos, la que sea más corta.

La presente invención se refiere a la observación de que los pacientes afectados por el angioedema hereditario de tipo III no muestran deficiencias en el inhibidor de la esterasa de C1. Según la presente invención, los síntomas observados en los pacientes afectados por el angioedema hereditario de tipo III pueden asociarse a una mutación en una molécula de ácidos nucleicos codificante del factor de coagulación XII.

Las mutaciones indicadas pueden comprender, aunque sin limitación, por ejemplo (1) una mutación que favorece, directa o indirectamente, la producción de una quinina vasoactiva, (2) una mutación que altera la interacción del factor de coagulación XII con las superficies activadoras o con un receptor de superficie celular o un complejo de receptores de superficie celular o con otra molécula fisiológicamente interactuante, (3) una mutación que resulta en una estabilidad incrementada del factor de coagulación XII, (4) una mutación que resulta en una actividad incrementada del factor de coagulación XII, (5) una mutación que resulta en una alteración de la especificidad de sustrato del factor de coagulación XII, (6) una mutación que resulta en un procesamiento proteolítico aberrante del factor de coagulación XII, o (7) una mutación que resulta en una interacción irregular con el inhibidor de esterasa de C1.

Además, sin respaldo teórico, se cree que determinadas mutaciones o variaciones dentro de determinadas regiones del gen del factor de coagulación XII podrían ser mutaciones que afectan al procesamiento, a la expresión, a la estructura y/o a la función del gen GPRK6 (receptor quinasa 6 acoplado a proteína G) o a una proteína GPRK6, respectivamente. GPRK6 presenta una relación funcional directa, por ejemplo con el receptor β 2-adrenérgico, el receptor del polipéptido intestinal vasoactivo de tipo 1 (VPAC1) y el receptor del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (PRGC) (Shetzline *et al.*, J. Biol. Chem. 277:25519-25526, 2002; Aiyar *et al.*, Eur. J. Pharmacol. 403:1-7, 2000), de esta manera también participando posiblemente en la regulación de mecanismos subyacentes a la patogénesis del angioedema. El gen de GPRK6 se localiza ~15 kb en el lado telomérico del gen del factor de coagulación XII, estando codificado en la cadena contraria. Aparentemente existen determinadas variantes/isoformas de procesamiento de GPRK6 (ver AceView y UCSC Genome Browser, GenBank nº de acceso BX355118, BX463737, BI604127 [isoforma h]) que aparecen a partir de, o se relacionan con, las secuencias genómicas del gen del factor de coagulación XII o de su región promotora extendida.

Tal como se ha mencionado anteriormente, el factor XII (es decir, el factor de coagulación XII) preferentemente es una serina proteasa producida por el hígado, circulante en el plasma humano como zimógeno inactivo de cadena sencilla a una concentración de aproximadamente 30 μ g/ml. A partir de los datos de expresión se asume que existe

producción de factor de coagulación XII también en otros tejidos, posiblemente como isoformas. El factor de coagulación XII presenta un peso molecular de aproximadamente 80 kDa en la electroforesis en gel con SDS y fue originalmente clonado y secuenciado por Cool *et al.* (J. Biol. Chem. 260:13666-13676, 1985) y por Que y Davie (Biochemistry 25:1525-1528, 1986). El gen del factor de coagulación XII humano se encuentra situado en el cromosoma 5, en 5q35.3 (Royle *et al.*, Somat. Cell Mol. Genet. 14:217-221, 1988), presenta un tamaño aproximado de 12 kb y consiste de 14 exones y 13 intrones (Cool y MacGillivray, J. Biol. Chem. 262:13662-13673, 1987). La proteína plasmática madura consiste de 596 aminoácidos (tras un péptido líder de 19 residuos) y se organiza en varios dominios. De extremo N-terminal a extremo C-terminal, dichos dominios son: un dominio de fibronectina de tipo II, un dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico, un dominio de fibronectina de tipo I, otro dominio de tipo factor de crecimiento epidérmico, un dominio kringle, una región rica en prolinas y una región catalítica de serina proteasa.

La activación *in vitro* del factor XII se produce sobre superficies cargadas negativamente (incluyendo vidrio, caolín, Celite, dextran-sulfato y ácido eláxico), mediante autoactivación, mediante división proteolítica, mediante cambio conformacional, o mediante alguna combinación de dichos mecanismos (Pixley y Colman, Methods Enzymol. 222:51-65, 1993). Entre las sustancias activadoras adicionales se incluyen sulfátidos, condroitín-sulfato, endotoxina, algunos proteoglicanos de mastocitos y también proteína A β agregada de la enfermedad de Alzheimer. *In vivo*, la membrana basal vascular subendotelial y/o la superficie de las células endoteliales estimuladas podrían ser importantes para la activación del factor XII (Pixley y Colman, 1993). Sobre las membranas de las células endoteliales, el receptor del activador del plasminógeno-uroquinasa, gC1qR (el receptor que se une a las cabezas globulares del complemento C1q) y la citoqueratina 1 podrían participar en la interacción con el factor XII (Joseph K. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8552-8557, 1996; Joseph K. *et al.*, Thromb. Haemost. 85:119-124, 2001; Mahdi *et al.*, Blood 99:3585-3596, 2002).

La activación primaria del factor XII se debe a la división de la molécula en un enlace crítico Arg₃₅₃-Val₃₅₄ contenido dentro de un puente disulfuro, mediado por, por ejemplo, kalicreína o plasmina (el factor XIIa mismo). El factor XIIa resultante (factor de coagulación α XIIa) es, de esta manera, un enzima de 80 kDa de dos cadenas unidas mediante disulfuro que consiste de una cadena pesada (353 residuos, 50 kDa) y una cadena ligera (243 residuos, 28 kDa). La cadena pesada se une a las superficies cargadas negativamente; la cadena ligera representa la parte de serina proteasa de la molécula, que contiene la tríada canónica Asp₄₄₂, His₃₉₃ y Ser₅₄₄. Dos divisiones posteriores son responsables de la formación de las dos formas de factor XIIf (Kaplan *et al.*, J. Allergy Clin. Immunol. 109:195-209, 2002): estas divisiones se producen en Arg334-Asn335 y Arg343-Leu344 y resultan en la formación de "fragmento de factor XII", FXII_f, también denominado β -FXIIa. FXII_f consiste de la cadena ligera del factor XIIa, correspondiente al dominio de serina proteasa, y un trozo muy pequeño, de 19 o 9 aminoácidos de longitud, de la cadena pesada original. El factor XII_f no presenta el sitio de unión de la superficie activadora, así como la capacidad del factor XIIa de convertir el factor XI en factor XIa. Sin embargo, FXII_f sigue siendo un potente activador de la prekalicreína. En resumen, la activación del zimógeno factor XII resulta en un enzima de tamaño cada vez menor, en una reducción de las propiedades de unión a superficies y en una reducción de la actividad de coagulación, aunque en una capacidad de formación de quinina conservada y finalmente incrementada (Colman y Schmaier, Blood 90:3819-3843, 1997).

La exposición de la presente invención permite identificar específicamente los individuos con: (a) una o más mutaciones en una molécula de ácidos nucleicos codificante del factor de coagulación XII y la asociación de esta mutación o mutaciones con el angioedema hereditario de tipo III del individuo o con la predisposición del mismo a desarrollar AEH de tipo III o a transmitir a su progenie una o más mutaciones específicas asociadas a un riesgo incrementado de desarrollar AEH de tipo III. Dicha molécula de ácidos nucleicos puede ser de ADN o de ARN.

Puede utilizarse cualquier método, incluyendo los métodos conocidos por el experto en la materia, para determinar la presencia o la ausencia de dicha mutación.

En una forma de realización preferida del método de la presente invención de diagnóstico, dicha determinación comprende hibridar bajo condiciones restrictivas a dicha molécula de ácidos nucleicos por lo menos una pareja de sondas de ácidos nucleicos, siendo la primera sonda de dicha pareja complementaria a la secuencia natural de dicha molécula de ácidos nucleicos, y siendo la segunda sonda de dicha pareja, complementaria a la secuencia mutante de dicha molécula de ácidos nucleicos, en la que una correspondencia perfecta, la presencia de hibridación estable, entre (i) la primera sonda de hibridación y la molécula diana de ácidos nucleicos indica la presencia de una secuencia natural, e (ii) la segunda sonda de hibridación y la molécula diana de ácidos nucleicos indica la presencia de una secuencia mutante, en la que la primera sonda de hibridación y la segunda sonda de hibridación permiten una detección diferencial. Dicha secuencia mutante es la secuencia mutante asociada a enfermedad según la forma de realización principal.

La expresión "hibridación bajo condiciones restrictivas" tal como se utiliza en la descripción de la presente invención es bien conocida por el experto en la materia y corresponde a condiciones de elevada astringencia o selectividad. Las condiciones de hibridación restrictiva apropiadas para cada secuencia pueden ser establecidas por el experto en la materia basándose en parámetros bien conocidos, tales como la temperatura, la composición de las moléculas de ácidos nucleicos, las condiciones salinas, etc.; ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning, A Laboratory

Manual", ISBN: 0879695765, CSH Press, Cold Spring Harbor, 2001, o Higgins y Hames (editores), "Nucleic acid hybridization, a practical approach", IRL Press, Oxford, 1985, ver en particular el capítulo "Hybridization Strategy" [Estrategias de hibridación], de Britten y Davidson, 3 a 15. Las condiciones de la hibridación restrictiva son, por ejemplo, condiciones que comprenden la incubación durante la noche a 42°C en una solución que comprende:

- 5 formamida al 50%, 5x SSC (NaCl 750 mM, citrato trisódico 75 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), 5x solución de Denhardt, dextrán-sulfato al 10% y 20 microgramos/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y fragmentado, seguido del lavado de los filtros en 0,1x SSC a aproximadamente 65°C. Otras condiciones de hibridación restrictiva son, por ejemplo, 0,2x SSC (NaCl 0,03 M, citrato sódico 0,003 M, pH 7) a 65°C.
- 10 Dependiendo de las condiciones particulares, por ejemplo la composición de bases de la sonda, el experto en la materia podría tener que modificar, por ejemplo, la concentración salina y la temperatura para encontrar condiciones que: (a) eviten la hibridación de sondas diferentes de la molécula diana de ácidos nucleicos en únicamente una posición y (b) todavía permitan la hibridación de sondas que se correspondan por completo con la misma región de
- 15 la molécula diana de ácidos nucleicos. Sin embargo, dichas condiciones pueden establecerse mediante procedimientos estándares conocidos por el experto en la materia y mediante experimentación rutinaria.

La sonda de hibridación habitualmente es una molécula de ácidos nucleicos que contiene uno o más marcajes. El marcaje puede encontrarse situado en el extremo 5' y/o 3' de la molécula de ácidos nucleicos o encontrarse situada en una posición interna. Entre los marcajes preferentes se incluyen, aunque sin limitación, fluorocromos, por ejemplo carboxifluoresceína (FAM) y 6-carboxi-X-rodamina (ROX), isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, rojo de Texas, ficoeritrina, alofocianina, 6-carboxifluoresceína (6-FAM), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), 6-carboxi-2',4',7',4',7-hexaclorofluoresceína (HEX), 5-carboxifluoresceína (5-FAM) o N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirodamina (TAMRA), marcajes radioactivos, por ejemplo ³²P, ³⁵S, ³H, etc. El marcaje también puede ser un sistema de dos etapas, en el que la sonda se conjuga con biotina, haptenos, etc. que presentan una pareja de unión de elevada afinidad, por ejemplo avidina, anticuerpos específicos, etc., en los que la pareja de unión se conjuga con un marcaje detectable.

Tal como se ha indicado anteriormente, dos sondas utilizadas como pareja deben permitir una detección diferencial. Lo anterior puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante marcaje de las sondas con dos marcajes diferentes que pueden diferenciarse en el procedimiento de detección.

La sonda de hibridación habitualmente es una molécula de ácidos nucleicos de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 2.000 bases de longitud. Al utilizarla para reacciones de hibridación, tales como las reacciones de transferencia southern o northern, la sonda puede ser un oligonucleótido o cebador que típicamente presenta una longitud en el intervalo de entre aproximadamente 15 y 50 bases o que puede ser considerablemente más larga y puede presentar entre aproximadamente 50 bases y aproximadamente 2.000 bases. El término "oligonucleótido", utilizado en una reacción de amplificación, se refiere a una molécula de ácidos nucleicos de típicamente 15 a 50 bases de longitud con suficiente complementariedad para permitir la hibridación específica con una secuencia de ácidos nucleicos codificante o reguladora de la expresión del factor de coagulación XII. Preferentemente un oligonucleótido utilizado para la hibridación o la amplificación presenta una longitud de aproximadamente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 bases. Sin embargo, las sondas de aproximadamente 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950 o 1.000 bases también se encuentran contempladas en la presente invención. Además, según las condiciones particulares seleccionadas para la hibridación, la sonda nucleótida puede ser incluso de varios cientos o miles de bases. Dicha sonda u oligonucleótido puede estar compuesto de ADN o ARN. En el caso de que se utilice como sonda de hibridación puede resultar deseable, por ejemplo, utilizar análogos de ácidos nucleicos con el fin de mejorar la estabilidad y la afinidad de unión. La expresión "ácido nucleico" debe entenderse que comprende dichos análogos. Se han descrito varias modificaciones que alteran la química del esqueleto fosfodiéster, azúcares o bases heterocíclicas. Entre los cambios útiles en la química de los esqueletos se encuentran los fosforotioatos, los fosforoditioatos, en los que ambos oxígenos no puenteados se han sustituido por azufre, las fosforoamiditas, los alquil-fosfortriésteres y los boranofosfatos. Entre los derivados de fosfato aquiral se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, 3'-O'-5'-S-fosforotioato, 3'-S-5'-O-fosforotioato, 3'-CH₂-5'-O-fosfonato y 3'-NH-5'-O-fosforoamidato. Los ácidos péptido-nucleicos sustituyen el esqueleto fosfodiéster entero por un enlace peptídico. Las modificaciones sacáridas también se utilizan para incrementar la estabilidad y la afinidad. También puede utilizarse el a-anómero de la desoxirribosa, en el que la base se encuentra invertida con respecto al b-anómero natural. La 2'-OH del azúcar ribosa puede alterarse para formar azúcares 2'-O-metilo o 2'-O-alilo, lo que proporciona resistencia a la degradación sin comprometer la afinidad. La modificación de las bases heterocíclicas debe mantener el apareamiento correcto de las bases. Entre algunas sustituciones útiles se incluyen la desoxiuridina por desoxitimidina, 5-metil-2'-desoxicitidina y 5-bromo-2'-desoxicitidina por desoxicitidina, 5-propinil-2'-desoxiuridina y 5-propinil-2'-desoxicitidina por desoxitimidina y desoxicitidina, respectivamente.

En otra forma de realización preferida del método de diagnóstico de la presente invención, dicho método comprende hibridar bajo condiciones restrictivas con dicha molécula de ácidos nucleicos una sonda de hibridación específica para una secuencia mutante. Dicha secuencia mutante es la secuencia mutante asociada a enfermedad definida anteriormente.

En otra forma de realización preferida de la presente invención, el método de diagnóstico comprende una etapa de amplificación de ácidos nucleicos y/o de secuenciación de ácidos nucleicos. Preferentemente, la secuenciación de ácidos nucleicos es secuenciación de ADN. Un método ampliamente utilizado de diagnóstico es, por ejemplo, la secuenciación directa del ADN de productos de PCR que contienen una mutación que debe diagnosticarse. El término "amplificación" o "amplificar" se refiere a incrementar el número de copias. El experto en la materia conocerá diversos métodos para amplificar las moléculas de ácidos nucleicos; estos métodos también pueden utilizarse en el método de diagnóstico de la presente invención. Entre los métodos de amplificación se incluyen, aunque sin limitación, la "reacción en cadena de la polimerasa" (PCR), "la reacción en cadena de la ligasa" (LCR, EPA320308), "la reacción de la sonda cíclica" (CPR), "la amplificación por desplazamiento de cadena" (SDA, Walker *et al.*, Nucleic Acid Res. 7:1691-1696, 1992), "los sistemas de amplificación basado en la transcripción" (TAS, Kwoh *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 86:1173, 1989; Gingeras *et al.*, solicitud de patente PCT n° WO 88/10315). Preferentemente, la amplificación del ADN se lleva a cabo mediante la utilización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) [Methods in Molecular Biology, vol. 226 (Bartlett J.M.S. y Stirling D., editores): PCR Protocols, 2a edición; PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification (Erlich H.A., editor), New York, 1992; PCR Protocols: A guide to methods and applications (Innis M.A. *et al.*, editores), Academic Press, San Diego, 1990]. Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos pueden resultar particularmente útiles en los casos en que la muestra contenga únicamente cantidades minúsculas de ácidos nucleicos. En el caso de que dichos ácidos nucleicos sean ARN, podría llevarse a cabo una RT-PCR. A continuación puede llevarse a cabo otra etapa de amplificación que implique una PCR. Alternativamente, en el caso de que dicho ácido nucleico contenido en la muestra sea ADN, puede llevarse a cabo una PCR.

La PCR generalmente consiste en muchas repeticiones de un ciclo que consiste en: (a) una etapa de desnaturalización, que funde ambas cadenas de una molécula de ADN, (b) una etapa de hibridación, que está destinada a permitir que los cebadores se hibriden específicamente a las cadenas separadas de la molécula de ADN, y (c) una etapa de extensión, que alarga los cebadores hibridados mediante la utilización de la información proporcionada por la cadena de molde. Generalmente la PCR puede llevarse a cabo en, por ejemplo, 50 µl de mezcla de reacción que contiene 5 µl de 10x tampón de PCR con MgCl₂ 1,5 mM, 200 µM de cada desoxinucleósido trifosfato, 0,5 µl de cada cebador (10 µM), aproximadamente 10 a 100 ng de ADN de molde y 1 a 2,5 unidades de polimerasa Taq. Los cebadores para la amplificación pueden encontrarse marcados o no marcados. La amplificación del ADN puede llevarse a cabo con, por ejemplo, un ciclador térmico modelo 2400 (Applied Biosystems, Foster City, CA): 2 min. a 94°C, seguido de 35 ciclos que consiste de hibridación (30 s a 50°C), extensión (1 min. a 72°C), desnaturalización (10 s a 94°C) y una etapa final de hibridación a 55°C durante 1 min., así como una etapa de extensión final a 72°C durante 5 min. Sin embargo, el experto en la materia conocerá cómo optimizar dichas condiciones para la amplificación de moléculas específicas de ácidos nucleicos o para reducir la escala o incrementar el volumen de la mezcla de reacción.

Un método adicional de amplificación de los ácidos nucleicos es la "reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa inversa" (RT-PCR, por sus siglas en inglés). Este método se utiliza en el caso de que el ácido nucleico que debe amplificarse consista de ARN. La expresión "transcriptasa inversa" se refiere a un enzima que cataliza la polimerización de los desoxirribonucleósidos trifosfato para formar productos de extensión de cebador que son complementarios a un molde de ácido ribonucleico. El enzima inicia la síntesis en el extremo 3' del cebador y avanza hacia el extremo 5' del molde hasta que termina la síntesis. Son ejemplos de agentes polimerizadores adecuados que convierten la secuencia de ARN diana en una secuencia complementaria de ADN copia (ADNc), la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar y la ADN polimerasa de *Thermus thermophilus*, una ADN polimerasa termoestable con actividad de transcriptasa inversa comercializada por Perkin Elmer. Típicamente, el molde dúplex genómico de ARN/ADNc se desnaturaliza por calor durante la primera etapa de desnaturalización después de la etapa inicial de transcripción inversa, dejando la cadena de ADN disponible como molde de amplificación. Entre las polimerasas adecuadas para la utilización con un molde de ADN se incluyen, por ejemplo, la ADN polimerasa I de *E. coli* o su fragmento Klenow, la ADN polimerasa T.sub.4, la polimerasa Tth y la polimerasa Taq, una ADN polimerasa termoestable aislada a partir de *Thermus aquaticus* y desarrollada y fabricada por Hoffmann-La Roche y disponible comercialmente de Perkin Elmer. Este último enzima se utiliza ampliamente en la amplificación y la secuenciación de ácidos nucleicos. Las condiciones de reacción para utilizar la polimerasa Taq son conocidas de la técnica y se describen en, por ejemplo, "PCR Technology", Erlich H.A., Stockton Press, New York, 1989; o en: Innis M.A., D.H. Gelfand, J.J. Sninsky y T.J. White, PCR Protocols: A guide to methods and applications, Academic Press, New York, 1990. La TI de alta temperatura proporciona una especificidad de cebador más elevada y una eficiencia mejorada. La solicitud copendiente de patente US n° de serie 07/746.121, presentada el 15 de agosto de 1991, describe una "RT-PCR homogénea" en la que los mismos cebadores y polimerasa resultan suficientes para las etapas tanto de transcripción inversa como de amplificación por PCR, y las condiciones de reacción se optimizan de manera que se produzcan ambas reacciones sin modificar los reactivos. La ADN polimerasa de *Thermus thermophilus*, una ADN polimerasa termoestable que puede funcionar como transcriptasa inversa, puede utilizarse para todas las etapas de extensión de cebador, con independencia del molde. Ambos procedimientos pueden llevarse a cabo sin necesidad de abrir el tubo para modificar o añadir reactivos; únicamente se ajusta el perfil de temperaturas entre el primer ciclo (ARN molde) y el resto de los ciclos de amplificación (ADN molde). La reacción de la TI puede llevarse a cabo en, por ejemplo, 20 µl de mezcla de reacción que contiene: 4 µl de 5x tampón ANV-TI, 2 µl de oligo-dT (100 µg/ml), 2 µl de dNTP 10 mM, 1 µl de ARN total, 10 unidades de transcriptasa inversa del AMV y H₂O hasta 20 µl de volumen final. La reacción puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la utilización de las condiciones siguientes: la

reacción se mantiene a 70°C durante 15 minutos para permitir la transcripción inversa. A continuación, la temperatura de reacción se eleva a 95°C durante 1 minuto para desnaturalizar el dúplex de ARN-ADNc. A continuación, la temperatura de reacción se somete a dos ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 20 segundos, seguido de 38 ciclos de 90°C durante 15 segundos y 60°C durante 20 segundos. Finalmente, la temperatura de reacción se mantiene a 60°C durante 4 minutos para la etapa de extensión final, se enfría a 15°C y se mantiene a dicha temperatura hasta el procesamiento posterior de la muestra amplificada.

El término "cebador" u "oligonucleótido" se refiere a una molécula corta de ácidos nucleicos de entre aproximadamente 8 y aproximadamente 30, finalmente de aproximadamente 50 nucleótidos de longitud, natural o sintética, capaz de actuar como punto de inicio de la síntesis de los ácidos nucleicos bajo condiciones en las que se induce la síntesis de un producto de extensión de cebador complementario a una cadena molde de ácidos nucleicos, es decir, en presencia de cuatro nucleósidos trifosfato diferentes o análogos de los mismos y un agente de polimerización (es decir, ADN polimerasa o transcriptasa inversa) en un tampón apropiado y a una temperatura adecuada. Preferentemente, un cebador es un oligodesoxirribonucleótido de cadena sencilla. La longitud apropiada de un cebador depende del uso pretendido del cebador, aunque típicamente se encuentra comprendida para cebadores de PCR y cebadores utilizados en reacciones de secuenciación entre 10 y 25 nucleótidos. Las moléculas de cebador cortas generalmente requieren temperaturas más bajas para formar complejos híbridos suficientemente estables con el molde. Un cebador no debe reflejar necesariamente la secuencia exacta del molde pero debe ser suficientemente complementaria para hibridarse específicamente con un molde, con la condición de que no resulte comprometida su capacidad de mediar en la amplificación. El término "hibridar" se refiere a la unión de dos ácidos nucleicos de cadena sencilla mediante apareamiento de bases complementarias, es decir A con T (en el ARN: U) y G con C. La expresión "pareja de cebadores" se refiere a dos cebadores que se hibridan con las cadenas + y -, respectivamente, de una molécula de ácidos nucleicos de doble cadena y permiten la amplificación de, por ejemplo, fragmentos de ADN, tal como en, por ejemplo, una reacción de PCR. Un cebador puede marcarse, si se desea, mediante la incorporación de un compuesto detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos o químicos. Por ejemplo, entre los marcajes útiles se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, pigmentos fluorescentes, reactivos electrodenso, biotina o péptidos pequeños para los que se dispone de anticuerpos o anticuerpos monoclonales. También puede utilizarse un marcaje para "capturar" el cebador, de manera que facilite una selección de ácidos nucleicos amplificados o fragmentos de los mismos. La carboxifluoresceína (FAM) y la 6-carboxi-X-rodamina (ROX) son marcajes preferentes. Sin embargo, entre otros marcajes preferentes se incluyen los fluorocromos, por ejemplo el isotiocianato de fluoresceína (FITC), la rodamina, el rojo de Texas, la ficoeritrina, la alofocianina, la 6-carboxifluoresceína (6-FAM), la 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), la 6-carboxi-2',4',7',4',7'-hexaclorofluoresceína (HEX), la 5-carboxifluoresceína (5-FAM) o la N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA), y marcajes radioactivos, por ejemplo ³²P, ³⁵S, ³H, etc. El marcaje también puede ser un sistema de dos etapas, en el que el cebador se conjuga con biotina, haptenos, etc. que presentan una pareja de unión de afinidad elevada, por ejemplo avidina, anticuerpos específicos, etc., en los que la pareja de unión se conjuga con un marcaje detectable. El marcaje puede conjugarse con uno de los cebadores o con ambos.

Durante dicho método de diagnóstico, puede llevarse a cabo una etapa de secuenciación de los ácidos nucleicos. Pueden utilizarse cualesquiera métodos conocidos de la técnica para la secuenciación. Preferentemente, la secuencia de ácidos nucleicos se determina mediante un método basado en las técnicas de secuenciación de Sanger o Maxam/Gilbert (ver, por ejemplo, *Methods in Molecular Biology*, vol. 167 (Graham C.A. y Hill A.J.M., editores): DNA sequencing protocols, 2a edición, 2001; Galas D.J. y McComarck S.J., *Genomic Technologies: Present and Future*, Caister Academic Press, Wymondham, Reino Unido, 2002).

En otra forma de realización preferida del método de diagnóstico de la presente invención, dicho método es o comprende un método de discriminación alélica seleccionado de entre el grupo que consiste de hibridación específica de alelo, extensión de cebador específica de alelo, incluyendo la PCR específica de alelo, la ligadura de oligonucleótidos específica de alelo, el división específica de alelo de una endonucleasa flap y/o la división específica de alelo utilizando una endonucleasa de restricción. Estos métodos son conocidos por el experto en la materia y se describen y se hace referencia adicional a los mismos en, por ejemplo, Kwok P-Y. y Chen X., *Curr. Issues Mol. Biol.* 5:43-60, 2003; Kwok P-Y., *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2:235-258, 2001; Syvänen A.-Ch., *Nature Rev. Genet.* 2:930-942, 2001.

En una forma de realización preferida todavía adicional, el método de diagnóstico de la presente invención puede comprender un método de detección seleccionado de entre el grupo que consiste de los métodos de detección de fluorescencia, de fluorescencia con resolución temporal, de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), polarización de fluorescencia, métodos colorimétricos, espectrometría de masas, (químico)luminiscencia, detección electroforética y detección eléctrica. Estos métodos para la detección de una reacción de discriminación de alelos son conocidos por el experto en la materia y se describen y se hace referencia a los mismos en, por ejemplo, Kwok P-Y. y Chen X., *Curr. Issues Mol. Biol.* 5:43-60, 2003; Kwok P-Y., *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2:235-258, 2001; Syvänen A.-Ch., *Nature Rev. Genet.* 2:930-942, 2001.

En determinados casos puede resultar necesario detectar grandes deleciones, inserciones o duplicaciones. Preferentemente, lo anterior puede llevarse a cabo mediante la utilización de métodos bien conocidos de la técnica y

que comprenden, por ejemplo, los métodos de transferencia southern, los métodos de dosificación génica cuantitativos o semicuantitativos, incluyendo la PCR competitiva, la PCR diferencial, la PCR en tiempo real, la hibridación de sondas amplificables multiplex o la PCR de rango largo (Armour *et al.*, Human Mutation 20:325-337, 2002).

Con frecuencia puede resultar deseable obtener, a partir de un único individuo, un diagnóstico alélico en varias regiones o posiciones de la molécula o moléculas de ácidos nucleicos codificantes del factor de coagulación XII o que regulan su expresión. Con este fin, pueden resultar útiles las matrices de ácidos nucleicos, tales como las descritas en el documento nº WO 95/11995.

Además, para algunos fines puede resultar deseable determinar la presencia de dos o más mutaciones/variaciones como haplotipo, es decir, para determinar qué alelos de varias posiciones mutantes/variantes aparecen conjuntamente en un haplotipo. Lo anterior puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos de la técnica, por ejemplo mediante un análisis de segregación intrafamiliar y también y preferentemente mediante métodos que permitan el haplotipado molecular. Por ejemplo, una doble digestión de un único producto de PCR que contiene dos posiciones mutantes/variantes con dos endonucleasas de restricción, siendo capaz cada uno de estos dos enzimas de diferenciar la situación alélica en una de las dos posiciones investigadas, puede rendir dicha información de haplotipo a partir de los tamaños de fragmento obtenidos. Sin embargo, el experto en la materia conoce numerosos otros métodos (ver, por ejemplo, Tost *et al.*, Nucleic Acids Res. 30:e96, 2002; Eitan y Kashi, Nucleic Acids Res. 30:e62, 2002; Pettersson *et al.*, Genomics 82:390-396, 2003; Ding *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:7449-7453, 2003; Odeberg *et al.*, Biotechniques 33:1104, 1106, 1108, 2002; McDonald *et al.*, Pharmacogenetics 12:93-99, 2002; Woolley *et al.*, Nature Biotechnol. 18:760-763, 2000) y se encuentra contemplado que resulten aplicables a los fines de la presente invención.

En todavía otra forma de realización preferida del método de diagnóstico de la presente invención, la sonda o la molécula de ácidos nucleico del sujeto se une a un soporte sólido. Entre los soportes sólidos que pueden utilizarse según la invención se incluyen material de relleno, chips, obleas, placas de microtitulación, entre otros.

La presente invención se refiere además a un método de diagnóstico de angioedema hereditario de tipo III (AEH III) o a una predisposición a la misma en un sujeto que se sospecha que ha desarrollado o que presenta una predisposición a desarrollar un angioedema hereditario de tipo III o en un sujeto que se sospecha que es portador de angioedema hereditario de tipo III, comprendiendo el método la evaluación de la presencia y/o cantidad de un factor de coagulación XII mutante asociado a enfermedad en dicho sujeto, e incluyendo las etapas de: (a) determinar a partir de una muestra biológica de dicho sujeto *in vitro*, la presencia y/o la cantidad de un (poli)péptido codificado por un gen mutante de factor de coagulación XII, afectando la mutación al residuo aminoácido 309, que corresponde al residuo aminoácido 328 de la secuencia ilustrada en SEC ID nº 2, (b) comparar dicha presencia y/o cantidad con la determinada a partir de una muestra de referencia, y (c) diagnosticar, basándose en la diferencia entre las muestras comparadas en la etapa (b), la condición patológica de un angioedema hereditario de tipo III o una predisposición al mismo, en la que el mutante comprende una mutación que afecta al residuo aminoácido 309. El término "(poli)péptido" se refiere alternativamente a péptidos o a (poli)péptidos. Los péptidos convencionalmente son aminoácidos unidos covalentemente de hasta 30 residuos, mientras que los polipéptidos (también denominados en la presente memoria "proteínas") comprenden 31 o más residuos aminoácidos. También se describe que la expresión "evaluar la cantidad" o "determinar la cantidad" se refiere a evaluar o determinar la cantidad de un (poli)péptido codificado por el gen de factor de coagulación XII, que comprende por ejemplo el precursor del factor de coagulación XII o cualquier de sus productos de maduración generados, por ejemplo, mediante procesos de activación, incluyendo la autoactivación y el procesamiento proteolítico del factor de coagulación XII. Por lo tanto, evaluar o determinar la cantidad de factor de coagulación XII se refiere además a determinar la cantidad de (1) FXII maduro, (2) FXIIa (80 kDa, que aparece por la división en Arg353-Val354), (3) FXIIf (2 subformas: 30 kDa/28,5 kDa; 19-péptido o nonapéptido unido mediante S-S a la cadena catalítica, que aparece por la división en Arg334-Arg335 y la división adicional en Arg343-Leu344), (4) una tercera forma de factor XII activado, una molécula de 40 kDa (producida principalmente mediante autoactivación), en la que el dominio de serina proteasa está unido a un fragmento de 12.000 de PM de la cadena pesada (Kaplan y Silverberg, 1987), (5) isoformas proteicas potenciales (AceView, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/av.cgi?db=33&c=Gene&l=F12>), (6) formas o fragmentos de factor de coagulación XII que aparece por un procesamiento proteolítico irregular, finalmente causado por una mutación de la presente invención, o (7) un mutante de cualquiera de las formas (1) a (5), incluyendo cualquiera de los mutantes de la presente invención. Sin embargo, "evaluar la cantidad" o "determinar la cantidad" se refiere además a determinar la cantidad de sustratos y/o los productos de activación de los mismos de cualquiera de las formas de factor de coagulación XII anteriormente indicadas. Preferentemente se determina la proporción entre formas activadas y nativas (no activadas) de dichos sustratos. Entre estos sustratos y (poli)péptidos procesados se incluyen, por ejemplo, (8) factor de coagulación XIa/factor de coagulación XI, (9) factor de coagulación VIIa/factor de coagulación VII, (10) kalicreína/prekalicreína, (11) plasmina/plasminógeno, (12) complemento activado C1r/C1r, (13) complemento activado C1s/C1s, (14) factor de crecimiento de hepatocitos (FCH) activado/factor decrecimiento de hepatocitos (15) proteína estimuladora de macrófagos (PEM) activada/proteína estimuladora de macrófagos. También se encuentra incluida (16) determinación de "productos de división de quininógeno de alto peso molecular" o la proporción "productos de división de quininógeno de alto peso molecular" y "quininógeno de alto peso molecular". Dichos productos de división comprenden quininógeno cortado,

bradiquinina y/o otras quininas. Se encuentran incluidas además: (17) productos de división del componente de complemento C2/componente de complemento C2, (18) productos de división de componente de complemento C4/componente de complemento C4, y (19) receptor de tipo 2 de la bradiquinina activado/receptor de tipo 2 de la bradiquinina.

5 La expresión "evaluar la actividad" o "determinar la actividad" se refiere a determinar una actividad biológica, en la que la actividad biológica se refiere a: (a) las actividades conocidas, preferentemente las de los (poli)péptidos natural y (b) actividades aberrantes, incluyendo las de los (poli)péptidos de factor de coagulación XII mutante que resultan evidentes a partir de la comparación entre la actividad de un (poli)péptido mutante con la de un (poli)péptido natural.
 10 Las actividades conocidas y aberrantes pueden comprender la actividad de cualquiera de las proteínas (1) a (19) indicadas anteriormente. La expresión "evaluar la presencia" o "determinar la presencia" se refiere a determinar cuál de los (poli)péptidos o proteínas anteriormente indicados se encuentra presente en la muestra. Dicha expresión se refiere además a determinar si encuentra presente un (poli)péptido natural o mutante en la muestra. Preferentemente, dicho (poli)péptido es cualquiera de los (poli)péptidos (1) a (7) tal como se ha indicado anteriormente.
 15 En algunos casos, también puede resultar útil analizar cualquiera de los (poli)péptidos (8) a (19) tal como se ha indicado anteriormente, sus formas nativas y/o activadas.

Dicho método de diagnóstico se basa en determinar a partir de una muestra de un individuo que debe ser diagnóstica y de una muestra de referencia, la cantidad y/o la calidad de, por ejemplo, cualquiera de las proteínas listadas en (1) a (19) y determinar, basándose en la diferencia entre dichas muestras, una condición patológica en la muestra de dicho individuo. Dicha condición patológica es angioedema hereditario de tipo III o una predisposición al mismo. La muestra de referencia es una muestra estándar obtenida de un sujeto sano o de sujetos sanos, preferentemente de un sujeto o sujetos no afectados particularmente por síntomas de angioedema.

25 Generalmente puede utilizarse cualquiera de los métodos conocidos de detección de proteínas. Entre ellos se incluyen, por ejemplo, métodos inmunoquímicos basados en anticuerpos, tales como ELISA, RIA, transferencia western, preferentemente siguiendo cualquier tipo de etapa de separación electroforética y similares. Dichos métodos se describen en, por ejemplo, Clark y Hales: *Immunoassays*, en: *Clinical Aspects of Immunology* (P.J. Lachmann *et al.*, editores), vol. 2, 5a edición, Boston, 1993, o en: *Weir's Handbook of Experimental Immunology*, 5a ed., 1996 (Herzenberg L. *et al.*, editores); ver también, por ejemplo, Lämmle *et al.* (*Semin. Thromb. Hemost.* 13:106-114, 1987). Los métodos para la determinación de actividad biológicas de los polipéptidos listados anteriormente son conocidos de la técnica. La actividad biológica puede medirse, por ejemplo, proporcionando sustratos para los (poli)péptidos y midiendo la conversión de sustrato mediante métodos conocidos de la técnica. Por ejemplo, la medición de la actividad de la (pre)kalicreína sobre un sustrato cromogénico, la cual puede seguirse mediante la detección de la división de dicho sustrato, ha sido descrita por Klufft, 1978 (*J. Lab. Clin. Med.* 91:83-95) y en Klufft, 1988 (*Meth. Enzymol.* 163:170-179). Los ensayos funcionales para medir la prekalicreína también han sido descritos por de la Cadena *et al.*, 1987 (*J. Lab. Clin. Med.* 109:601-607, 1987) y Silverberg y Kaplan, 1988 (*Meth. Enzymol.* 163:85-95). Un ensayo funcional para el quininógeno de elevado peso molecular utilizando un sustrato cromogénico ha sido descrito por Scott *et al.*, 1987 (*Thromb. Res.* 48:685-700) y también por Gallimore *et al.* (*Blood Coagul. Fibrinolysis* 13:561-568, 2002).

La presente invención utiliza además métodos para determinar la secuencia de aminoácidos de un (poli)péptido). Dichos métodos son conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, *Methods in Molecular Biology*, vol. 211 (Smith B.J., ed.): *Protein Sequencing Protocols*, 2a edición, 2002). Preferentemente, el análisis de la secuencia de proteínas se lleva a cabo mediante degradación de Edman (P. Edman, *Acta Chem. Scand.* 4:283, 1950) o mediante espectrometría de desorción/ionización láser asistida por matriz y tiempo de vuelo (EM MALDI-TOF). Por lo tanto, mediante la utilización del análisis de secuencias el experto en la materia podrá determinar si un (poli)péptido factor de coagulación XII natural o mutante se encuentra presente en una muestra.

50 Las proteínas presentadas anteriormente incluyen, por una parte, el factor de coagulación XII y sus diversas formas. Éstas son parte de una cascada conocida como, por ejemplo, la ruta intrínseca de coagulación o sistema de contacto o ruta de formación de quinina (ver, por ejemplo, Kaplan *et al.*, *Adv. Immunol.* 66:225-272, 1997; Kaplan *et al.*, *J. Allergy Clin. Immunol.* 109:195-209, 2002). Por otra parte, las proteínas listadas anteriormente son proteínas que siguen al factor de coagulación XII posteriormente en dicha cascada y, además, son proteínas que no están directamente relacionadas con la ruta de formación de quinina pero se ha demostrado que pueden resultar activadas para ella por el factor de coagulación XII, finalmente de manera indirecta. Resulta importante indicar que las mutaciones del factor de coagulación XII pueden presentar un impacto sobre dichas etapas posteriores en la cascada y pueden resultar, por ejemplo, en una activación cuantitativa o cualitativamente anormal de los (poli)péptidos situados posteriormente en la cascada. Este efecto puede medirse y podría permitir deducciones sobre la naturaleza del factor de coagulación XII específico expresado en el individuo a estudio.

Los métodos de la presente invención no se encuentran limitados a la medición de los (poli)péptidos individuales listados anteriormente sino que también se refieren a la medición o determinación de complejos de dichos (poli)péptidos. Dichos complejos son, por ejemplo, complejos que consisten de factor XII activado e inhibidor del complemento C1, o complejos que consisten de kalicreína e inhibidor del complemento C1, o complejos que consisten de kalicreína y alfa2-macroglobulina. Dichos complejos pueden detectarse, por ejemplo, mediante la

utilización de técnicas basadas en ELISA o RIA (Nuijens *et al.*, *Thromb. Hemost.* 58:778-785, 1987; Kaplan *et al.*, *Blood* 66:636-641, 1985; Kaplan *et al.*, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 50:S41-S51, 1989; Dors *et al.*, *Thromb. Haemost.* 67:644-648, 1992).

5 En una forma de realización preferida del método de la presente invención, la muestra biológica consiste de, o se obtiene de, pelo, piel, superficies mucosales, líquidos corporales, incluyendo sangre, plasma, suero, orina, saliva, esputo, lágrimas, líquido cerebroespinal, semen, líquido sinovial, líquido amniótico, leche, linfa, esputo pulmonar, secreción bronquial o heces.

10 La expresión "muestra biológica" se refiere al espécimen obtenido de un mamífero. Preferentemente dicho espécimen se obtiene de pelo, piel, superficies mucosales, líquidos corporales, incluyendo sangre, plasma, suero, orina, saliva, esputo, lágrimas, líquido cerebroespinal, semen, líquido sinovial, líquido amniótico, leche, linfa, esputo pulmonar, secreción bronquial o heces. Sin embargo, resulta importante indicar que muchas otras muestras podrían resultar útiles con este fin, por ejemplo una muestra obtenida con fines histológicos o citológicos.

15 Se conoce de la técnica una diversidad de técnicas para extraer ácidos nucleicos de muestras biológicas. Por ejemplo las descritas en Rotbart *et al.*, en: *PCR Technology* (Erlich ed., Stockton Press, New York) y Han *et al.*, *Biochemistry* 26:1617-1625, 1987. En el caso de que la muestra se relativamente fácil de alterar, el ácido nucleico no es necesario que se purifique antes de la amplificación mediante la técnica de PCR, es decir, en el caso de que la muestra comprenda células, por ejemplo linfocitos o monocitos de sangre periférica, puede llevarse a cabo la lisis y dispersión de los componentes intracelulares meramente mediante suspensión de las células en tampón hipotónico. Los métodos adecuados variarán dependiendo del tipo de espécimen y son bien conocidos por el experto en la materia (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", ISBN 0879695765, CSH Press, Cold Spring Harbor, 2001).

20 Resulta evidente que, para el análisis del ARNm, ADNc o proteínas, la muestra debe obtenerse de un tejido en el que se exprese el factor de coagulación XII/gen del factor de coagulación XII o, respectivamente, de un tejido o líquido corporal en el que se exprese el factor de coagulación XII o en el que se secrete.

30 Se describe además que dicha presencia, cantidad y/o actividad se determina mediante la utilización de un anticuerpo o un aptámero, en el que el anticuerpo o aptámero es específico de: (a) un (poli) péptido codificado por el gen de factor de coagulación XII, (b) un sustrato del (poli) péptido de (a), o (c) un (poli) péptido procesado por el sustrato indicado en (b). El término "anticuerpo" se refiere a anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla o un fragmento de los mismos. Preferentemente el anticuerpo es específico para un polipéptido listado bajo (1) a (19). Los anticuerpos pueden ser anticuerpos biospecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos sintéticos, fragmentos de anticuerpos tales como los fragmentos Fab, F(ab₂)', Fv o scFv, etc., o un derivado químicamente modificado de cualquiera de ellos, todos comprendidos dentro del término "anticuerpo". Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante, por ejemplo, las técnicas originalmente descritas en Köhler y Milstein, *Nature* 256:495, 1975, y en Galfré, *Meth. Enzymol.* 73:3, 1981, que comprende la fusión de células de mieloma de ratón con células de bazo derivadas de mamíferos inmunizados con modificaciones desarrolladas en la técnica. Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos contra los (poli) péptidos anteriormente indicados pueden obtenerse mediante los métodos que se describen en, por ejemplo, Harlow y Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1998. En el caso de que se obtengan derivados de dichos anticuerpos mediante la técnica de expresión fágica, puede utilizarse la resonancia de plasmón superficial en el sistema BIAcore para incrementar la eficiencia de los anticuerpos fágicos que se unen a un epítipo del péptido o polipéptido que debe analizarse (Schier, *Human Antibodies Hybridomas* 7:97-105, 1996; Malmberg, *J. Immunol. Methods* 183:7-13, 1995). La producción de anticuerpos se describe en, por ejemplo, el documento nº WO89/09622.

45 Los anticuerpos pueden marcarse. Preferentemente dicho marcaje se selecciona de entre el grupo que consiste de fluorocromos, por ejemplo isotiocianato de fluoresceína (FITC), rodamina, rojo de Texas, ficocitrina, alofocianina, 6-carboxifluoresceína (6-FAM), 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-2',4',7',4,7-hexaclorofluoresceína (HEX), 5-carboxifluoresceína (5-FAM) o N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxi-rodamina (TAMRA), marcajes radioactivos, por ejemplo ³²P, ³⁵S, ³H, etc. El marcaje puede ser también un sistema de dos etapas, en el que el anticuerpo se conjuga con biotina, haptenos, etc. que presentan una pareja de elevada afinidad de unión, por ejemplo avidina, anticuerpos específicos, etc., en los que la pareja de unión se conjuga con un marcaje detectable. En otra realización preferente de la presente invención el marcaje es una toxina, isótopo radioactivo o marcaje fluorescente.

60 El término "aptámeros" se refiere a moléculas de ARN y también de ADN capaces de unirse a proteínas diana con elevada especificidad, comparable a la especificidad de los anticuerpos. Los métodos para obtener o identificar los aptámeros específicos de una diana deseada son conocidos de la técnica. Preferentemente, dichos métodos pueden basarse en el procedimiento de "evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial" (SELEX) (Ellington y Szostak, *Nature* 346:818-822, 1990; Tuerk y Gold, *Science* 249:505-510, 1990; Fitzwater y Polisky, *Methods Enzymol.* 267:275-301, 1996). Preferentemente, dichos aptámeros pueden ser específicos de cualquiera de los (poli) péptidos listados bajo (1) a (19). La utilización de aptámeros para la detección y cuantificación de

polipéptidos diana se describe en, por ejemplo, McCauley *et al.*, *Anal. Biochem.* 319:244-250, 2003; Jayasena, *Clin. Chem.* 45:1628-1650, 1999.

5 Dicho anticuerpo o aptámero puede ser específico para un (poli)péptido codificado por el gen del factor de coagulación XII. Dichos reactivos permiten la evaluación de la cantidad y/o la calidad de (a) el (poli)péptido o (poli)péptidos factor de coagulación XII y finalmente también para la diferenciación entre los (poli)péptidos factor de coagulación XII natural y mutante, preferentemente mutante asociado a enfermedad. Por ejemplo, la identificación de los (poli)péptidos factor de coagulación XII mediante un procedimiento de inmunotransferencia tras una etapa de separación electroforética podría permitir perfectamente el reconocimiento de un (poli)péptido factor de coagulación XII mutante. Sin embargo, respecto a la diferenciación preferente entre los (poli)péptidos factor de coagulación XII natural y mutante asociado a enfermedad, preferentemente dicho anticuerpo o aptámero es específico para un mutante asociado a enfermedad de la presente invención. Dicho anticuerpo o aptámero no conseguiría unirse al (poli)péptido o (poli)péptidos factor de coagulación XII natural pero se uniría a un mutante asociado a enfermedad con elevada especificidad. Por lo tanto, este anticuerpo o aptámero resultaría más útil para discriminar entre (poli)péptidos factor de coagulación XII natural y mutante. Más preferentemente, el epítipo o región diana reconocido por el anticuerpo o aptámero comprende la posición/región mutante en el factor de coagulación XII.

20 Diversos métodos basados en anticuerpos para la determinación del (poli)péptido o (poli)péptidos factor de coagulación XII, tales como la inmunodifusión radial, el electroinmunoensayo según Laurell, el ensayo de inmunounión de puntos, el radioinmunoensayo, el inmunoensayo enzimático, el ensayo de inmunosorción ligada a enzima, la inmunotransferencia, o similares, han sido descritos o utilizados, por ejemplo por Mannhalter *et al.*, 1987 (*Fibrinolysis* 1:259-263), Gevers Leuven *et al.*, 1987 (*J. Lab. Clin. Med.*), Wuillemain *et al.*, 1990 (*J. Immunol. Methods* 130:133-140), Saito *et al.*, 1976 (*J. Lab. Clin. Med.* 88:506-514), Ford *et al.*, 1996 (*J. Immunoassay* 17:119-131), Lämmle *et al.*, 1987 (*Semin. Thromb. Hemost.* 13:106-114).

25 La presencia, cantidad y/o actividad del (poli)péptido o (poli)péptidos codificados por el gen del factor de coagulación XII pueden determinarse en: (a) un ensayo de coagulación, o en (b) un ensayo amidolítico funcional, o en (c) un ensayo mitogénico, o en (d) un ensayo de unión que mide la unión de un (poli)péptido codificado por el gen del factor de coagulación XII a una pareja de unión.

30 La actividad coagulante del factor de coagulación XII puede cuantificarse utilizando métodos en los que se mide la corrección del tiempo de coagulación anormal, el tiempo parcial de tromboplastina activado prolongado, del plasma de una persona con una deficiencia hereditaria severa del factor de coagulación XII (ver, por ejemplo, Pixley R.A. y Colman R.W., *Methods in Enzymology* 222:51-65, 1993). Los ensayos amidolíticos funcionales para el factor de coagulación XII utilizando diversos sustratos cromogénicos sintéticos (por ejemplo S2302, S2337 y S2222) han sido descritos por, por ejemplo, Vinazzer, 1979 (*Thrombosis Research* 14:155-166), Tans *et al.*, 1987 (*Eur. J. Biochem.* 164:637-642), Gallimore *et al.*, 1987 (*Fibrinolysis* 1:123-127), Walshe *et al.*, 1987 (*Thrombosis Research* 47:365-371), Kluft, 1988 (*Methods Enzymol.* 163:170-179), Stürzebecher *et al.*, 1989 (*Thrombosis Research* 55:709-715).

40 Otro ejemplo de evaluación de la actividad funcional del factor de coagulación XII puede ser una medición de la actividad de activación del factor de crecimiento de hepatocitos que presenta el factor de coagulación XII (Shimomura *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 229:257-261, 1995).

45 Schmeidler-Sapiro *et al.*, 1991 (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4382-4385) han descrito sistemas de ensayo para evaluar la actividad mitogénica del factor de coagulación XII sobre las células HepG2; el factor de coagulación XII, así como el factor de coagulación XIIa (factor de coagulación XII activado por caolín) incrementa la proliferación celular y la incorporación de timidina y leucina en las células HepG2. Gordon *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:2174-2179, 1996) han evaluado la actividad de factor de crecimiento que presenta el factor XII sobre varias otras células diana. Puede modificarse cualquiera de los métodos anteriormente indicados y utilizarse para determinar la actividad de los (poli)péptidos codificados por el gen del factor de coagulación XII. Pueden utilizarse diversos activadores en dichos ensayos, por ejemplo dextrán-sulfato, caolín, un reactivo basado en cefalina-ácido elálgico (Walshe *et al.*, *Thromb. Res.* 47:365-371, 1987) u otros, y es concebible que el grado y/o naturaleza de la activación conseguida podría ser diferente para el (poli)péptido o (poli)péptidos que son formas mutantes asociadas a enfermedad del factor de coagulación XII que para el factor de coagulación XII natural.

55 La expresión "pareja de unión" se refiere a una molécula capaz de interactuar con un (poli)péptido codificado por el gen del factor de coagulación XII. La actividad de unión de los (poli)péptidos de factor de coagulación XII puede determinarse mediante la utilización de un ensayo de unión. El experto en la materia conocerá a partir de estudios *in vitro* que el factor de coagulación XII puede unirse, por ejemplo, a superficies o sustancias, proteínas o complejos de proteínas activadores. La técnica anterior informa, por ejemplo, sobre la unión del factor de coagulación XII a complejos de gC1q-R, citoqueratina-1 y receptor del activador del plasminógeno uroquinasa presente sobre la superficie de las células endoteliales (Joseph *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8552-8557, 1996; Joseph *et al.*, *Thromb. Haemost.* 85:119-124, 2001; Mahdi *et al.*, *Blood* 99:3585-3596, 2002). La pareja de unión también puede ser un anticuerpo. Los ensayos de unión se describen en detalle en la técnica anterior y pueden ser utilizados por el experto en la materia para determinar si una muestra contiene uno o más (poli)péptidos de factor de coagulación XII con características de unión normales o aberrantes. Lo anterior permitirá extraer conclusiones sobre la naturaleza

del (poli)péptido o (poli)péptidos de factor de coagulación XII presentes en la muestra a estudio.

En la presente memoria se describe además un método de identificación de un compuesto modulador de la actividad del factor de coagulación XII que resulta adecuado como medicamento o compuesto cabeza de serie para un medicamento destinado al tratamiento y/o a la prevención del angioedema hereditario de tipo III, comprendiendo el método las etapas de: (a) puesta en contacto *in vitro* de un (poli)péptido factor de coagulación XII o un (poli)péptido funcionalmente relacionado y el modulador potencial, y (b) ensayo de la modulación de la actividad del factor de coagulación XII, en el que la modulación de la actividad del factor de coagulación XII es indicativa de la idoneidad del compuesto como medicamento o compuesto cabeza de serie para un medicamento destinado al tratamiento y/o a la prevención del angioedema hereditario de tipo III.

El término "modulador" o "compuesto modulador" se refiere a un compuesto que altera la actividad y/o la expresión y/o la secreción de factor de coagulación XII. Lo anterior incluye además la modulación de un "(poli)péptido funcionalmente relacionado", de esta manera estando relacionados (a) uno o más (poli)péptidos o la expresión de los mismos con la función y/o la expresión y/o la secreción del factor de coagulación XII, preferentemente relacionados funcionalmente con el factor de coagulación XII antes o después dentro del sistema de contacto/ruta de la quinina. En principio un modulador puede presentar un efecto activador o inhibidor. También se encuentra contemplado que el modulador pueda modular diferencialmente únicamente una o más de las diversas funciones del factor de coagulación XII. El modulador puede ser, por ejemplo, una 'molécula pequeña', un aptámero o un anticuerpo (ver posteriormente). El modulador puede ser un compuesto que interactúa con un (poli)péptido factor de coagulación XII y, más preferentemente, un compuesto inhibidor.

La expresión "puesta en contacto" se refiere a poner en contacto el (poli)péptido diana, preferentemente un (poli)péptido factor de coagulación XII con un modulador potencial. Dicho (poli)péptido factor de coagulación XII preferentemente es un polipéptido seleccionado de entre cualquiera de los (poli)péptidos (1) a (7) anteriormente indicados. Mediante la puesta en contacto del (poli)péptido con un modulador potencial de la actividad, el experto en la materia puede someter a ensayo el impacto del modulador sobre la actividad del (poli)péptido. Se han descrito anteriormente ejemplos de ensayos para la medición de diversas actividades de los (poli)péptidos de factor de coagulación XII, incluyendo la unión a sustancias activadoras u otras parejas de unión, y puede utilizarse para el ensayo de moduladores potenciales.

El (poli)péptido o (poli)péptidos de factor de coagulación XII utilizados para la puesta en contacto con un modulador potencial pueden generarse de diversas fuentes. Por ejemplo, el (poli)péptido o (poli)péptidos de factor de coagulación XII pueden aislarse a partir de plasma humano, de individuos sanos o de pacientes afectados por AEH de tipo III; con este fin, pueden utilizarse diversos métodos conocidos de la técnica, por ejemplo los descritos por Pixley y Colman, 1993 (Methods Enzymol. 222:51-65). Alternativamente, también puede producirse sintéticamente uno o más (poli)péptidos de factor de coagulación XII. Además, el (poli)péptido o (poli)péptidos de factor de coagulación XII pueden expresarse recombinantemente. Con este fin, pueden introducirse en una célula huésped moléculas de ácidos nucleicos codificantes de (poli)péptidos de factor de coagulación XII. El término "introducir" se refiere al procedimiento de transfección o transformación de una célula huésped con dicha molécula de ácidos nucleicos. La introducción del constructo en la célula huésped puede llevarse a cabo mediante transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección u otros métodos. Dichos métodos se describen en muchos manuales de laboratorio estándares, tales como Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology, 1986. Dicha molécula de ácidos nucleicos introducida en la célula huésped comprende un marco de lectura abierto codificante de un (poli)péptido factor de coagulación XII en forma expresable. Un vector de expresión de mamífero típico contiene el elemento promotor, que media en el inicio de la transcripción de ARNm, la secuencia codificante de la proteína, y señales necesarias para la terminación de la transcripción y la poliadenilación del transcrito. Entre los elementos adicionales pueden incluirse intensificadores, secuencias de Kozak y secuencias intermedias flanqueadas por sitios donantes y aceptores para el procesamiento del ARN. Puede conseguirse una transcripción altamente eficiente con los promotores temprano y tardío de SV40, las repeticiones terminales largas (RTL) procedentes de retrovirus, por ejemplo VSR, HTLV1, HIV1 y el promotor temprano del citomegalovirus (CMV). Sin embargo, también pueden utilizarse elementos celulares (por ejemplo el promotor de la actina humana). Entre los vectores de expresión adecuados para la utilización en la práctica de la presente invención se incluyen, por ejemplo, vectores tales como pSVL y pMSG (Pharmacia, Uppsala, Suecia), pRSVcat (ATCC nº 37152), pSV2dhfr (ATCC nº 37146) y pBC12MI (ATCC nº 67109). Entre las células huésped de mamífero que podrían utilizarse se incluyen Hela humanas, 293, H9 y Jurkat, células NIH3T3 y C127 de ratón, Cos 1, Cos 7 y CV1, células QC1-3 de codorniz, células L de ratón y células de ovario de hámster chino (CHO). Alternativamente, el (poli)péptido recombinante puede expresarse en líneas celulares estables que contienen el constructo génico integrado en un cromosoma. La cotransfección con un marcador seleccionable, tal como dhfr, gpt, neomicina o higromicina permite la identificación y aislamiento de las células transfectadas. El ácido nucleico transfectado también puede amplificarse para expresar grandes cantidades del (poli)péptido codificado). El marcador DHFR (dihidrofolato reductasa) resulta útil para desarrollar líneas celulares que portan varios cientos o incluso varios miles de copias del gen de interés. Otro marcador de selección útil es el enzima glutamina sintasa (GS) (Murphy *et al.*, Biochem. J. 227:277-279, 1991; Bebbington *et al.*, Bio/Technology 10:169-175, 1992). Mediante la utilización de dichos marcadores se cultivan las células de mamífero en medio selectivo y se seleccionan las células con la resistencia más alta. Con frecuencia se utilizan células de ovario de

hámster chino (CHO) y células NSO para la producción de proteínas. Los vectores de expresión pC1 y pC4 contienen el promotor fuerte (LTR) del virus del sarcoma de Rous (Cullen *et al.*, Molecular and Cellular Biology 5:438-447, 1985) más un fragmento del intensificador del CMV (Boshart *et al.*, Cell 41:521-530, 1985). Múltiples sitios de clonación, por ejemplo con los sitios de corte de enzima de restricción Bam HI, Xba I y Asp 718, facilitan la clonación del gen de interés. Los vectores contienen además del intrón 3', la señal de poliadenilación y de terminación del gen preproinsulina de rata. Tal como se ha indicado anteriormente, los vectores de expresión preferentemente incluyen por lo menos un marcador seleccionable. Entre dichos marcadores se incluyen la dihidrofolato reductasa, G418 o la resistencia a neomicina para el cultivo de células eucarióticas, y los genes de resistencia a tetraciclina, canamicina o ampicilina para el cultivo en *E. coli* y otras bacterias. Entre los ejemplos representativos de huéspedes apropiados se incluyen, aunque sin limitarse a ellos, células bacterianas tales como *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como células de levadura; células de insecto, tales como células de *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células animales, tales como células CHO, COS, 293 y del melanoma de Bowes, y células vegetales. Los medios y condiciones de cultivo apropiados para las células huésped anteriormente indicadas son conocidos de la técnica.

El polipéptido expresado recombinantemente puede contener residuos aminoácidos adicionales con el fin de incrementar la estabilidad o para modificar el reconocimiento de la proteína. Por ejemplo, puede añadirse una región de aminoácidos adicionales, en particular aminoácidos cargados, al extremo N-terminal del polipéptido con el fin de mejorar la estabilidad y persistencia en la célula huésped, durante la purificación durante la manipulación y almacenamiento posteriores. Además, pueden añadirse fracciones peptídicas al polipéptido para facilitar la purificación. Dichas regiones pueden eliminarse antes de la preparación final del polipéptido. La adición de fracciones peptídicas a polipéptidos para provocar la secreción o la excreción, para mejorar la estabilidad y para facilitar la purificación, entre otros, son técnicas familiares y rutinarias de la técnica. Una proteína de fusión preferente comprende una región heteróloga de inmunoglobulina que resulta útil para estabilidad y purificar las proteínas. Por ejemplo, el documento nº EP-A-0 464 533 (contrapartida canadiense nº 2045869) da a conocer proteínas de fusión que comprenden diversas partes de región constante de moléculas de inmunoglobulina conjuntamente con otra proteína humana o parte de la misma. En muchos casos, la parte Fc en una proteína de fusión resulta muy ventajosa para la utilización en la terapia y el diagnóstico y, de esta manera, resulta en, por ejemplo, propiedades farmacocinéticas mejoradas (documento nº EP-A 0 232 262). Por otra parte, para algunos usos resultaría deseable poder deleccionar la parte Fc tras la expresión, detección y purificación de la proteína de fusión de la manera ventajosa descrita. Éste es el caso cuando la parte Fc demuestra ser un impedimento para, por ejemplo, la actividad catalítica del (poli) péptido factor de coagulación XII. En el descubrimiento de fármacos, por ejemplo, se han fusionado proteínas humanas tales como IL-5_h con partes Fc para ensayos de cribado de alto rendimiento con el fin de identificar antagonistas de IL-5_h. Ver D. Bennett *et al.*, J. Molecular Recognition 8:52-58, 1995, y K. Johanson *et al.*, J. Biol. Chem. 270:9459-9471, 1995. El (poli) péptido o (poli) péptidos factor de coagulación XII pueden recuperarse y purificarse a partir de cultivos celulares recombinantes mediante métodos bien conocidos, incluyendo la precipitación con sulfato amónico o etanol, la extracción con ácido, la cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, la cromatografía en fosfocelulosa, la cromatografía de interacción hidrofóbica, la cromatografía de afinidad y/o la cromatografía de hidroxilapatito. Más preferentemente, se utiliza para la purificación la cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC").

La etapa de puesta en contacto del (poli) péptido factor de coagulación XII recuperado, con un modulador potencial es esencialmente una etapa mediante la que se somete a ensayo la eficacia de un modulador potencial. Generalmente se encuentra presente el (poli) péptido factor de coagulación XII bajo condiciones que se suponen son las condiciones fisiológicas, o en una solución de ensayo que representa dichas condiciones. Al examinar, por ejemplo, la actividad enzimática, pueden resultar importantes lo siguiente: tras la determinación de las concentraciones óptimas de sustrato y enzima, la adición de un modulador candidato a la mezcla de reacción en un abanico de concentraciones. Las condiciones de ensayo idealmente deberían ser similares a las condiciones bajo las que el modulador está activo, es decir, bajo pH, temperatura y fuerza iónica, etc. fisiológicos. Por ejemplo, en el caso de que el modulador sea un inhibidor de la actividad de proteasa, los inhibidores adecuados mostrarán una inhibición de proteasa fuerte a concentraciones que no inducen efectos secundarios tóxicos en el sujeto. Los inhibidores que compitan para la unión con el sitio activo de la proteasa pueden requerir concentraciones iguales o superiores a la concentración de sustrato, mientras que los inhibidores capaces de unión irreversible al sitio activo de la proteasa pueden añadirse a concentraciones del orden de la concentración del enzima. La conversión del sustrato, es decir, la división proteolítica, se mide convenientemente mediante la utilización de sustratos marcados, tales como péptidos marcados que representan el sitio de división de un sustrato natural del factor de coagulación XII.

Uno de los métodos de detección de proteasa más populares es la utilización de la transferencia de energía por resonancia fluorescente entre un fluoróforo donante en un extremo de la cadena peptídica y un inhibidor en el otro extremo de la cadena peptídica. Estos métodos han sido revisados por Knight, "Fluorimetric assays of proteolytic enzymes", Methods in Enzymol. 248:18-34, 1995. En dicho método, la división proteolítica del enlace peptídico que conecta el fluoróforo y el inhibidor libera a éste último, que se aleja por difusión del fluoróforo. Lo anterior resulta en un incremento de la fluorescencia. Una variación de este método de inhibidor se enseña en las patentes US nº 5.605.809 y nº 6.037.137. Esta variación lleva a un primer fluoróforo a situarse en estrecha proximidad a un segundo fluoróforo a través de un esqueleto peptídico plegado. Esta técnica presenta la ventaja de que el sitio de

división de proteasa no es necesario que sea inmediatamente contiguo a ninguno de los fluoróforos. Sin embargo, adolece de la desventaja de que, para evitar perturbar la estructura plegada, la longitud del sitio de división de proteasa debe caer idealmente entre los 2 y 15 residuos aminoácidos de longitud. Otro método muy popular es la utilización de fracciones fluorescentes inhibidas por péptidos, tales como el fluoróforo 7-amino-4-metilcoumarina (AMC), el fluoróforo 7-amino-4-cabamoilmetilcoumarina (Harris *et al.*, PNAS 97:7754-7759, 2000) o el fluoróforo rodamina-110 inhibido por péptido (Mangel *et al.*, patente US nº 4.557.862). En éste, la fluorescencia intrínseca de un fluoróforo es inhibida por uno o más péptidos unidos covalentemente y la fluorescencia se restaura con la división del péptido. Aunque la molécula de rodamina 110 funciona con una eficiencia elevada, utiliza luz visible para la excitación y la emisión y de otro modo es un marcaje excelente para los ensayos de proteasa basados en la fluorescencia; presenta pocas desventajas que limiten su utilización. La molécula de rodamina 110 es divalente y normalmente incorpora dos péptidos de secuencia idéntica, con ambos grupos peptídicos "N" terminales expuestos. Lo anterior presenta la desventaja de que los péptidos con esta polaridad no pueden incorporarse en el interior de una cadena peptídica de mayor tamaño. De esta manera, este marcaje se ha utilizado principalmente para ensayos de sustrato de proteasa en los que la molécula de rodamina-110 representa efectivamente el grupo "C" terminal final en el sustrato. Se enseñan variaciones de los métodos con la molécula rodamina-110, adecuados para los ensayos de caspasa, en la patente US nº 6.248.904.

El ensayo de actividad de proteasa de los (poli)péptidos de factor de coagulación XII puede llevarse a cabo en solución o con el (poli)péptido factor de coagulación XII o el sustrato o el modulador dispuesto ordenadamente sobre un soporte sólido, por ejemplo una placa de microtitulación. Los métodos de micromatrices han pasado a utilizarse ampliamente para la investigación farmacéutica y bioquímica, y se encuentra disponible comercialmente un gran número de micromatrices. La utilización de micromatrices de péptidos, construidos mediante métodos fotoquímicos, para el reconocimiento de anticuerpos y patrones de péptidos se enseña en Fodor *et al.*, Science 252:767-773, 1991. La utilización de micromatrices de péptidos para la unión de proteína quinasas o entre proteínas se enseña en MacBeath y Schreiber, Science 289:1760-1763, 2000. En ella se activaron químicamente portaobjetos de vidrio para unir covalentemente los péptidos y se aplicaron como puntos diversos péptidos en los portaobjetos utilizando equipos convencionales de aplicación de puntos. Los péptidos formaron un enlace covalente con el vidrio derivatizado. Los métodos alternativos para unir péptidos a soportes sólidos se enseñan en la patente US nº 6.150.153, que enseña la utilización de capas de polietilenimina para facilitar los enlaces peptídicos. La patente US nº 4.762.881 enseña la utilización de la incorporación de una benzoilfenilalanina artificial a un péptido y permitir que éste se una a un sustrato sólido que presenta un hidrógeno activo (tal como poliestireno) utilizando luz ultravioleta. La patente US nº 4.681.870 enseña métodos para derivatizar superficies de sílice para introducir grupos amino o carboxilo y después acoplar las proteínas a dichos grupos. Las patentes US nº 5.527.681 y nº 5.679.773 enseñan métodos para la síntesis y expresión de polímeros inmovilizados adecuados para las micromatrices y diversos métodos de marcaje fluorescente para detectar la división proteolítica.

Para micromatrices de sustratos de proteasa, los péptidos de la micromatriz contendrán además fracciones de detección (etiquetas fluorescentes, inhibidores fluorescentes, etc.) para generar una señal detectable correspondiente al nivel de división proteolítica de la zona de péptido particular en cuestión. Los péptidos se encuentran unidos a la superficie del soporte sólido (covalente o no covalentemente) en grado suficiente para evitar la difusión de los péptidos unidos con la aplicación de la muestra líquida y las etapas posteriores de digestión y procesamiento. Durante la utilización, la micromatriz completa se expone a una muestra líquida, que contiene un (poli)péptido factor de coagulación XII bajo estudio. La muestra típicamente se cubre con una tapa opcional para ayudar a distribuir la muestra uniformemente en la matriz y para evitar la evaporación. Típicamente la tapa es de un material plano transparente, tal como un cubreobjetos de vidrio o plástico, que permita la observación de las zonas de péptido durante el curso de la reacción de digestión. Durante la reacción de digestión con proteasa, los péptidos con secuencias diferenciales o modificaciones diferentes típicamente resultarán digeridas en una cantidad diferente. La señal detectable generada por las fracciones de detección unidas a cada región peptídica serán interrogadas, típicamente en múltiples puntos temporales durante la reacción de digestión. Lo anterior proporciona información sobre la actividad proteolítica relativa del (poli)péptido factor de coagulación XII estudiado en presencia de un modulador o inhibidor de proteasa potencial, proporcionando de esta manera información sobre la idoneidad del modulador para la modulación, inhibiendo finalmente la actividad del factor de coagulación XII. Opcionalmente, al final de reacción, puede añadirse una proteasa no específica o un agente reactivo con una fracción marcada no específica, a la micromatriz con el fin de que sirva como control positivo o negativo.

En el método indicado de identificación de un compuesto modulador, el (poli)péptido factor de coagulación XII de la etapa (a) puede encontrarse presente en cultivo celular o sobrenadante de cultivo celular o en una muestra del sujeto o purificarse a partir de cualquiera de dichas fuentes. El cultivo celular podría ser, por ejemplo, un cultivo celular en el que un (poli)péptido factor de coagulación XII se expresa recombinantemente, o un cultivo de células, por ejemplo de hepatocitos, y preferentemente de origen humano, que expresa naturalmente el factor de coagulación XII. La muestra del sujeto podría ser, por ejemplo, plasma sanguíneo y el sujeto podría encontrarse afectado o no afectado por angioedema hereditario de tipo III.

En el método indicado de identificación de un compuesto modulador, dichos ensayos pueden llevarse a cabo mediante la evaluación de la interacción física entre un (poli)péptido factor de coagulación XII y el modulador y/o el efecto del modulador sobre la función de dicho (poli)péptido factor de coagulación XII.

El experto en la materia conoce diversos métodos de detección de la interacción entre una proteína y una pareja de unión potencial o modulador. Uno de dichos métodos, por ejemplo, puede estar basado en el ensayo de parejas de unión potenciales que se aplican como puntos sobre un soporte sólido. En caso de encontrarse unidos a un soporte sólido, la incubación de dichas parejas de unión potenciales con una solución que contiene, por ejemplo, (poli)péptido factor de coagulación XII podría identificar posiciones en el soporte sólido ocupadas por parejas de unión candidatas. La unión de, por ejemplo, uno o más (poli)péptidos de factor de coagulación XII a dicha pareja de unión puede detectarse mediante diversos métodos conocidos de la técnica. Por ejemplo, la unión de factor de coagulación XII a una pareja de unión podría visualizarse mediante incubación del soporte sólido con un anticuerpo marcado específico para el factor de coagulación XII. Los métodos preferentes comprenden métodos de detección basados en Biacore y métodos basados en ELISA.

También se encuentra contemplado en la presente invención que el (poli)péptido dirigido por el modulador potencial pueda ser, en lugar de un (poli)péptido factor de coagulación XII, un (poli)péptido funcionalmente relacionado, antes o después dentro del sistema de contacto, con el factor de coagulación XII, es decir, interactuando con el factor de coagulación XII. Sin embargo, tal como se encuentra adicionalmente contemplado en la presente memoria, lo anterior puede provocar una modulación de la actividad del factor de coagulación XII.

Un modulador puede estar basado en compuestos conocidos que también pueden modificarse con el fin de adaptar el compuesto a los requisitos del (poli)péptido específico que es la diana. El modulador puede ser, por ejemplo, una molécula pequeña, un aptámero o un anticuerpo (ver posteriormente).

Preferentemente, el modulador es una molécula pequeña o un compuesto molecular pequeño y puede seleccionarse mediante cribado de una biblioteca de moléculas pequeñas ("biblioteca de moléculas pequeñas"). La expresión "molécula pequeña" o "compuesto molecular pequeño" se refiere a un compuesto que presenta un peso molecular relativo no superior a 1.000 D y preferentemente no superior a 500 D. Puede ser de naturaleza orgánica o inorgánica. Se conoce de la técnica un gran número de bibliotecas de moléculas pequeñas, las cuales se encuentran disponibles comercialmente. De esta manera, por ejemplo, un modulador puede ser cualquiera de los compuestos contenidos en dicha biblioteca o un compuesto modificado derivado de un compuesto contenido en dicha biblioteca. Preferentemente, dicho modulador se une al (poli)péptido diana codificado por el gen del factor de coagulación XII con suficiente especificidad, en el que suficiente especificidad se refiere preferentemente a una constante de disociación (Kd) inferior a 500 nM, más preferentemente inferior a 200 nM, todavía más preferentemente inferior a 50 nM, todavía más preferentemente inferior a 10 nM y todavía más preferentemente inferior a 1 nM.

También se encuentra contemplado diseñar compuestos moleculares pequeños utilizando los métodos de modelaje denominados moleculares. Los compuestos moleculares pequeños pueden derivarse, por ejemplo, de péptidos. Resultan preferentes los compuestos que mimetizan el estado de transición de sustratos del factor de coagulación XII. Los compuestos adecuados pueden ser, por ejemplo, sustratos derivados de péptidos que no contengan un enlace peptídico divisible. Preferentemente, dichos compuestos contienen un sitio de división de un sustrato natural del factor de coagulación XII, en el que el enlace peptídico entre P1 y P1' se sustituye por un enlace no divisible.

Los compuestos basados en péptidos y otros, tales como compuestos basados en estructuras heterocíclicas, pueden ser, por ejemplo, inhibidores conocidos de las serina proteasas o nuevos compuestos o compuestos derivarse de inhibidores preexistentes mediante derivatización. Preferentemente, dichos compuestos se diseñan mediante modelaje informático, en el que el modelaje informático se refiere a la utilización de herramientas de cribado virtuales para la búsqueda de compuestos que se unen, por ejemplo, al sitio de unión a sustrato del factor de coagulación XII mediante la utilización de herramientas de modelaje de homologías. Generalmente, estos métodos se basan en la estructura tridimensional de las proteínas, preferentemente de proteínas cristalizadas conjuntamente con un sustrato. Más preferentemente, el sustrato se sustituye por un modulador o inhibidor candidato.

El diseño de moléculas con relaciones estructurales particulares con parte de una molécula proteica como el factor de coagulación XII está bien establecido y se encuentra descrito en la literatura (ver, por ejemplo, Cochran, Chem. Biol. 7:85-94, 2000; Grzybowski *et al.*, Acc. Chem. Res. 35:261-269, 2002; Velasquez-Campoy *et al.*, Arch. Biochem. Biophys. 380:169-175, 2001; D'Aquino *et al.*, Proteins: Struct. Func. Genet. Suppl. 4:93-107, 2000). Cualquiera de dichos métodos denominados "de modelaje molecular" para el diseño racional de fármaco puede utilizarse para encontrar un modulador del factor de coagulación XII. La mayoría de estos métodos de modelaje molecular tiene en consideración la forma, la distribución de cargas y la distribución de grupos hidrofóbicos, grupos iónicos y enlaces e hidrógeno en el sitio de interés de la molécula proteica. Utilizando esta información, que puede derivarse, por ejemplo, de la estructura cristalina de proteínas y complejos de proteína-sustrato, estos métodos sugieren mejoras para las moléculas propuestas existentes, construir nuevas moléculas que por sí misma se espera que presenten buena afinidad de unión, cribar bibliotecas virtuales de compuestos para dichas moléculas, o de otro modo proporcionar soporte al diseño interactivo de nuevos compuestos farmacológicos *in silico*. Algunos programas tales como GOLD (G. Jones *et al.*, Development and J. Mol. Biol. 267:727-748, 1997), FLEXX (B. Kramer *et al.*, Structure, Functions, and Genetics 37:228-241, 1999), FLEXE (M. Rarey *et al.*, JMB 261:470-489, 1996), DOCK (Kuntz I.D., Science 257:1078-1082, 1992), AUTODOCK (Morris *et al.*, J. Computational Chemistry 19:1639-1662, 1998) son

programas de cribado virtual diseñados para calcular la posición de unión y la conformación, así como la energía de unión correspondiente de un compuesto orgánico a una proteína. Estos programas están especialmente diseñados para permitir un gran número de "anclajes", es decir, cálculos de la conformación con la energía de unión máxima de un compuesto a un sitio de unión, por unidad de tiempo. Su energía de unión no siempre es un valor real, pero puede relacionarse estadísticamente con una energía de unión real mediante un procedimiento de validación. Estos métodos conducen a moléculas, denominadas en la presente memoria "aciertos", que deben evaluarse mediante métodos experimentales bioquímicos, estructurales-biológicos, moleculares-biológicos o fisiológicos para su actividad biológica esperada. La expresión "modelaje molecular" o "técnicas de modelaje molecular" se refiere a técnicas que generan uno o más modelos 3D de un sitio de unión a ligando u otra característica estructural de una macromolécula. Las técnicas de modelaje molecular pueden llevarse a cabo manualmente, con ayuda de un ordenador, o con una combinación de ellas. Las técnicas de modelaje molecular pueden aplicarse, por ejemplo, a las coordenadas atómicas con el fin de derivar un abanico de modelos 3D y para investigar la estructura de los sitios de unión a ligando. El experto en la materia dispone de una diversidad de métodos de modelaje molecular para la utilización según la invención (G. Klebe y H. Gohlke, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2644-2676, 2002; Jun Zeng: *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* 3:355-362, 2000; Andrea G. Cochran, *Current Opinion in Chemical Biology* 5:654-659, 2001).

El modulador puede ser un inhibidor de la actividad del factor de coagulación XII, seleccionado de entre el grupo que consiste de: (a) un aptámero o anticuerpo o fragmento inhibidor, o derivado de los mismos, que se une específicamente a un (poli)péptido factor de coagulación XII y/o que inhibe específicamente la actividad del factor de coagulación XII, (b) un inhibidor de molécula pequeña del factor de coagulación XII y/o la actividad del factor de coagulación XII, y (c) un inhibidor de serina proteasa seleccionado de entre el grupo (I) que consiste de inhibidores proteicos natural y modificados o manipulados de serina proteasas, incluyendo el inhibidor de la esterasa C1, la antitrombina III, la α 2-antiplasmina, la α 1-antitripsina, serpina ovoalbúmina y α 2-macroglobulina, o seleccionado de entre el grupo (II) de inhibidores de tipo Kunitz, incluyendo el inhibidor de la tripsina pancreática bovina.

El inhibidor puede ser un aptámero, preferentemente un aptámero que se une específicamente al factor de coagulación XII. El término "aptámero" se refiere a moléculas de ARN y también de ADN capaces de unirse a proteínas diana con elevadas afinidad y especificidad, comparables a la afinidad y especificidad de los anticuerpos monoclonales. Los métodos para obtener o identificar los aptámeros específicos para una diana deseada son conocidos en la técnica. Preferentemente, dichos métodos pueden basarse en el procedimiento de "evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial" (SELEX, por sus siglas en inglés) (Ellington y Szostak, *Nature* 346:818-822, 1990; Tuerk y Gold, *Science* 249:505-510, 1990; Fitzwater y Polisky, *Methods Enzymol.* 267:275-301, 1996). Pueden utilizarse diversas modificaciones químicas, por ejemplo la utilización de 2'-fluoropirimidinas en la biblioteca de partida y la unión de un polietilenglicol al extremo 5' de un aptámero para garantizar la estabilidad y para incrementar la biodisponibilidad de los aptámeros (ver, por ejemplo, Toulme, *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 2:318-324, 2000).

El inhibidor también puede ser un anticuerpo o fragmento o derivado de uno de los mismos. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "anticuerpo o fragmento o derivado de uno de los mismos" se refiere a un anticuerpo policlonal, anticuerpo monoclonal, anticuerpo quimérico, anticuerpo de cadena sencilla, anticuerpo Fv de cadena sencilla, anticuerpo humano, anticuerpo humanizado o fragmento Fab de unión específica al factor de coagulación XII y/o a un mutante del factor de coagulación XII.

Los anticuerpos indicados en la presente memoria pueden prepararse mediante cualquiera de entre una diversidad de métodos conocidos de la técnica. Por ejemplo, pueden inducirse anticuerpos policlonales mediante la administración de proteína purificada, un (poli)péptido factor de coagulación XII o un fragmento antigénico de los mismos, en un animal huésped.

Tal como se ha mencionado anteriormente, el anticuerpo también puede ser un anticuerpo monoclonal. Dichos anticuerpos monoclonales pueden prepararse utilizando tecnología de hibridoma (Köhler *et al.*, *Nature* 256:495, 1975; Köhler *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 6:511, 1976; Köhler *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 6:292, 1976; Hammerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas*, Elsevier, N.Y., páginas 563 a 681, 1981). En general, dichos procedimientos implican inmunizar un animal (preferentemente un ratón) con un antígeno de proteína factor de coagulación XII. Se extraen los esplenocitos de dichos ratones inmunizados y se fusionan con una línea celular de mieloma adecuada. Puede utilizarse cualquier línea celular de mieloma adecuada según la presente invención; sin embargo, resulta preferible utilizar la línea celular de mieloma parental (SP2/0), disponible de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. Tras la fusión, las células de hibridoma resultantes se mantienen selectivamente en medio HAT y después se clonan mediante dilución limitante, tal como indican Wands *et al.* (*Gastroenterology* 80:225-232, 1981). Las células de hibridoma obtenidas mediante dicha selección seguidamente se someten a ensayo para identificar los clones que secretan anticuerpos capaces de unirse al antígeno de proteína factor de coagulación XII.

Se apreciará que Fab y F(ab)₂ y otros fragmentos de los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse según los métodos dados a conocer en la presente memoria. Dichos fragmentos se producen típicamente mediante división proteolítica, utilizando enzimas tales como la papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para

producir fragmentos F(ab')₂).

Para la utilización *in vivo* de anticuerpos en el ser humano, puede resultar preferido utilizar anticuerpos monoclonales quiméricos "humanizados". Dichos anticuerpos pueden producirse utilizando constructos genéticos derivados de células de hibridoma productoras de los anticuerpos monoclonales indicados anteriormente. Los métodos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos de la técnica. Ver, para una revisión, Morrison, Science 229:1202, 1985; Oi *et al.*, BioTechniques 4:214, 1986; Cabilly *et al.*, patente US nº 4.816.567; Taniguchi *et al.*, patente EP 0 171 496; Morrison *et al.*, patente EP 0 173 494; Neuberger *et al.*, documento nº WO 8601533; Robinson *et al.*, documento nº WO 8702671; Boulianne *et al.*, Nature 312:643, 1984; Neuberger *et al.*, Nature 314:268, 1985.

Preferentemente, los anticuerpos se unen específicamente a un (polipéptido) factor de coagulación XII y entre ellos se incluyen IgG (incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), IgA (incluyendo IgA1 e IgA2), IgD, IgE o IgM e IgY. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "anticuerpo" pretende incluir anticuerpos completos, incluyendo anticuerpos completos de cadena sencilla y fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Más preferentemente, los anticuerpos son fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno humanos y entre ellos se incluyen, aunque sin limitación, Fab, Fab' y F(ab')₂, Fd, Fv de cadena sencilla (scFv), anticuerpos de cadena sencilla, Fv unidos mediante disulfuro (sdFv) y fragmentos que comprenden un dominio V_L o V_H. Los anticuerpos pueden ser de cualquier origen animal, incluyendo de aves y de mamíferos. Preferentemente los anticuerpos son humanos, murinos, de conejo, de cabra, de cobaya, de camello, de caballo o de pollo.

La "unión específica" de anticuerpos puede describirse, por ejemplo, en términos de su reactividad cruzada. Preferentemente los anticuerpos específicos son anticuerpos que no unen a polipéptidos con una identidad inferior al 98%, inferior al 95%, inferior al 90%, inferior al 85%, inferior al 80%, inferior al 75%, inferior al 70% e inferior al 65% (calculada utilizando métodos conocidos de la técnica) a un (poli) péptido codificado por el gen del factor de coagulación XII. Sin embargo, los anticuerpos pueden describirse además o especificarse en términos de su afinidad de unión. Entre las afinidades de unión preferentes se incluyen aquellas con una constante de disociación o K_d inferior a 5x10⁻⁶ M, 10⁻⁶ M, 5x10⁻⁷ M, 10⁻⁷ M, 5x10⁻⁸ M, 10⁻⁸ M, 5x10⁻⁹ M, 10⁻⁹ M, 5x10⁻¹⁰ M, 10⁻¹⁰ M, 5x10⁻¹¹ M, 10⁻¹¹ M, 5x10⁻¹² M, 10⁻¹² M, 5x10⁻¹³ M, 10⁻¹³ M, 5x10⁻¹⁴ M, 10⁻¹⁴ M, 5x10⁻¹⁵ M y 10⁻¹⁵ M.

Además, el inhibidor puede ser una "molécula pequeña" o "compuesto molecular pequeño". Tal como se ha indicado anteriormente, la expresión "molécula pequeña" se refiere a un compuesto que presenta un peso molecular relativo no superior a 1.000 D y preferentemente no superior a 500 D. Dicho compuesto puede ser de diferentes naturaleza química, por ejemplo puede estar basado en péptidos o estar basado en estructuras heterocíclicas. Los inhibidores de molécula pequeña de las serina proteasas han sido extensivamente revisados, por ejemplo por Leung *et al.* (J. Med. Chem. 43:305-341, 2000) y Walker y Lynas (Cell. Mol. Life Sci. 58:596-624, 2001). Entre las sustancias comentadas por dichos autores se incluyen, por ejemplo: (i) inhibidores basados en péptidos, tales como inhibidores basados en fósforo (incluyendo ésteres de α-aminoalquil-difenilfosfonato y ésteres de fosfonato mixtos), inhibidores que contienen flúor (incluyendo, por ejemplo, trifluorometil-cetonas [así como análogos que contienen la fracción trifluorometil-cetona con características peptídicas inferiores], inhibidores basados en difluorometilcetona y basados en pentafluoroetil-cetona), inhibidores basados en ácidos peptidil-borónicos (incluyendo, por ejemplo, sustancias que contienen boroArg o boroLys o boro-metoxi-propilglicina o boroPro), inhibidores basados en los denominados "sustratos inversos" (incluyendo, por ejemplo, compuestos que contienen una función ácido p-metoxibenzoico) e inhibidores basados en péptidos con nuevos grupos funcionales (incluyendo, por ejemplo, compuestos con grupos C-terminales aceptores de electrones basados en α-ceto-heterociclos, tales como α-ceto-benzoxazolas o α-ceto-tiazolas), (ii) inhibidores derivados de productos naturales, tales como cicloteonamidas (análogos de pentapéptidos macrocíclicos), aeruginosinas y radiosumina, (iii) inhibidores basados en andamiajes heterocíclicos y otros no peptídicos, tales como heterociclos N-hidroxisuccinimida y compuestos relacionados, compuestos basados en el andamiaje isocoumarina e inhibidores basados en β-lactamo (incluyendo, por ejemplo, los compuestos derivados en cefalosporina y análogos de β-lactamos monocíclicos y bicíclicos) y (iv) compuestos potenciados con metal, tales como compuestos basados en bis(5-amidino-2-bencimidazolil)metano (BABIM). La totalidad de dichos (tipos de) sustancias, así como los derivados de los mismos, se consideran aplicables en el contexto de la presente invención.

Cualquiera de los inhibidores de proteasa conocidos puede resultar útil para desarrollar moduladores o moduladores inhibitorios de la actividad del factor de coagulación XII, aunque los inhibidores de las serina proteasas pueden resultar particularmente útiles. Puede modificarse cualquiera de los compuestos conocidos, por ejemplo con el fin de modificar sus características de unión o su especificidad.

Con respecto a los inhibidores proteicos naturales o manipulados de las serina proteasas, se han llevado a cabo cambios o modificaciones selectivos de las características de inhibición naturales o de la especificidad natural, por ejemplo con mutantes P2 del inhibidor de C1 (Zahedi *et al.*, J. Immunol. 167:1500-1506, 2001), un mutante P1 de la α1-antitripsina (Schapira *et al.*, J. Clin. Invest. 76:645-647, 1985), diversos mutantes P1-P2-P3 de la α1-antitripsina (Sulikowski *et al.*, Protein Science 11:2230-2236, 2002) un mutante P1-P2 de la α1-antitripsina (Schapira *et al.*, J. Clin. Invest. 80:582-585, 1988), diversos mutantes P3-P4 del inhibidor de tripsina pancreático bovino (Grzesiak *et al.*, J. Biol. Chem. 275:33346-33352, 2000), entre ellos un mutante P3 con elevada especificidad para el factor XIIa.

En particular con respecto a (a) y (b), también se encuentra contemplado que el "inhibidor de la actividad del factor de coagulación XII" pueda ser un compuesto que no presente como diana principal un (poli) péptido factor de coagulación XII, pero que sin embargo inhiba la actividad del factor de coagulación XII, por ejemplo mediante la inhibición de la activación del factor de coagulación XII debido a la interferencia con una proteína activadora. Se describe además un método de identificación de un compuesto que modula la expresión y/o la secreción del factor de coagulación XII, que resulta adecuado como medicamento o compuesto cabeza de serie para un medicamento destinado al tratamiento y/o prevención del angioedema hereditario de tipo III, comprendiendo el método las etapas de: (a) puesta en contacto *in vitro* de una célula que expresa o es capaz de expresar el factor de coagulación XII con un modulador potencial de la expresión y/o la secreción, y (b) someter a ensayo la expresión y/o secreción alterada, en la que el modulador es: (i) un compuesto de molécula pequeña, un aptámero o un anticuerpo o fragmento o derivado del mismo, que modula específicamente la expresión y/o la secreción del factor de coagulación XII, o (ii) un ARNip o ARNhp, un ribozima o una molécula antisentido de ácidos nucleicos que se hibrida específicamente con una molécula de ácidos nucleicos codificante del factor de coagulación XII o que regula la expresión del factor de coagulación XII. La expresión "hibridación específica" se refiere a que el ARNip, ARNhp, ribozima o molécula antisentido de ácidos nucleicos se hibrida con la molécula diana de ácidos nucleicos, codificante del factor de coagulación XII o que resulta su expresión. Preferentemente, "hibridación específica" se refiere además a que no resulta afectado ningún otro gen o transcrito.

Un compuesto modulador afectará a la expresión y/o a la secreción del factor de coagulación XII. El experto en la materia conoce varias técnicas para el seguimiento de un efecto sobre la expresión o la secreción de las proteínas. Por ejemplo, puede realizarse un seguimiento de la expresión de las proteínas mediante la utilización de técnicas tales como la transferencia western, la inmunofluorescencia o la inmunoprecipitación. Alternativamente, también puede llevarse a cabo el seguimiento de la expresión, por ejemplo, mediante el análisis de la cantidad de ARN transcrito a partir de un gen del factor de coagulación XII.

La expresión "puesta en contacto con una célula" se refiere a la introducción de un compuesto modulador potencial en una célula. En la medida en que el compuesto es una molécula de ácidos nucleicos, la puesta en contacto puede llevarse a cabo mediante cualquiera de las técnicas de transfección conocidas, tales como la electroporación, la transfección con fosfato de calcio, la lipofección y similares. Sin embargo, el ácido nucleico también puede introducirse en la célula utilizando sistemas de vector basados en virus.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "ARNip" se refiere a "ARN interfiriente pequeño"; el término "ARNhp" se refiere a "ARN en horquilla pequeño". En la interferencia de ARN, los ARN interfirientes pequeños (ARNip) se unen al ARNm diana de una manera específica de secuencia, facilitando su degradación y evitando de esta manera la traducción de la proteína codificada. La transfección de las células con ARNip puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante la utilización de agentes lipofílicos (entre ellos la OligofectamineTM y Transit-TKOTTM) y también mediante electroporación.

Los métodos para la expresión estable de ARN interfiriente pequeño o ARN en horquilla pequeño en los mamíferos y también en células humanas son conocidos por el experto en la materia y se describen en, por ejemplo, Paul *et al.*, 2002 (Nature Biotechnology 20:505-508), Brummelkamp *et al.*, 2002 (Science 296:550-553), Sui *et al.*, 2002 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:5515-5520), Yu *et al.*, 2002 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:6047-6052), Lee *et al.*, 2002 (Nature Biotechnology 20:500-505), Xia *et al.*, 2002 (Nature Biotechnology 20:1006-1010). Se ha demostrado en varios estudios que un enfoque de ARNi resulta adecuado para el desarrollo de un tratamiento potencial de las enfermedades de herencia dominante, mediante el diseño de un ARNip con diana específicamente en el alelo mutante asociado a enfermedad, silenciando selectivamente de esta manera la expresión del gen mutante (Miller *et al.*, 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:7195-7200; González-Alegre *et al.*, Ann. Neurol. 53:781-787, 2003).

Las moléculas de ARNip son esencialmente de doble cadena pero pueden comprender extremos protuberantes 3' o 5'. Pueden comprender además secuencias que no son idénticas o esencialmente idénticas al gen diana, aunque estas secuencias deben encontrarse localizadas fuera de la secuencia de identidad. La secuencia de identidad o identidad sustancial es de por lo menos 14, y más preferentemente de por lo menos 19, nucleótidos de longitud. Preferentemente no excede de 23 nucleótidos. Opcionalmente, el ARNip comprende dos regiones de identidad o identidad sustancial en las que se intercala una región de no identidad. La expresión "identidad sustancial" se refiere a una región que presenta una o dos no correspondencias de la cadena de sentido del ARNip respecto al ARNm diana, o no correspondencias de 10% a 15% de la longitud total de ARNip respecto al ARNm diana dentro de la región de identidad. Dichas no correspondencias pueden ser el resultado de una sustitución, adición, delección o duplicación, etc. de nucleótidos. El ARNdc de más de 23 pero no más de 40 pb puede contener también tres o cuatro no correspondencias.

La interferencia del ARNip con el ARNm diana presenta el efecto de que la transcripción/traducción se reduce en por lo menos el 50%, preferentemente en por lo menos el 75%, más preferentemente en por lo menos 90%, todavía más preferentemente en por lo menos 95%, tal como por lo menos 98% y más preferentemente por lo menos 99%.

Además, el modulador puede ser una molécula antisentido de ácidos nucleicos se hibrida específicamente con una

molécula de ácidos nucleicos codificante del factor de coagulación XII o que regula la expresión del factor de coagulación XII. La expresión "molécula antisentido de ácidos nucleicos" se refiere a una molécula de ácidos nucleicos que puede utilizarse para controlar la expresión génica. La técnica subyacente, la tecnología de antisentido, puede utilizarse para controlar la expresión génica mediante ADN o ARN antisentido o mediante la formación de una triple hélice.

Las técnicas antisentido se comentan en, por ejemplo, Okano, J. *Neurochem.* 56:560, 1991; "Oligodeoxynucleotides as Antisense Inhibitors of Gene Expression", CRC Press, Boca Raton, FL, 1988, o en: Phillips M.I. (ed.), *Antisense Technology, Methods in Enzymology*, vol. 313, Academic Press, San Diego, 2000. La formación de triples hélices se comenta en, por ejemplo, Lee *et al.*, *Nucleic Acids Research* 6:3073, 1979; Cooney *et al.*, *Science* 241:456, 1988, y en Dervan *et al.*, *Science* 251:1360, 1991. Los métodos se basan en la unión de un polinucleótido diana a un ADN o ARN complementario. Por ejemplo, la parte codificante 5' de un polinucleótido que codifica un (poli)péptido factor de coagulación XII puede utilizarse para diseñar un oligonucleótido de ARN antisentido de entre aproximadamente 10 y 40 pares de bases de longitud. Se diseña un oligonucleótido de ADN para que resulte complementario a una región génica que participa en la transcripción, evitando de esta manera la transcripción y la producción de factor de coagulación XII. El oligonucleótido de ARN antisentido hibrida con el ARNm *in vivo* y bloquea la traducción de la molécula de ARN en polipéptido factor de coagulación XII.

El término "ribozima" se refiere a moléculas de ARN con actividad catalítica (ver, por ejemplo, Sarver *et al.*, *Science* 247:1222-1225, 1990); sin embargo, también se conocen catalizadores de ADN (desoxirribozimas). Los ribozimas y su potencial de desarrollo de nuevas herramientas terapéuticas se comentan en, por ejemplo, Steele *et al.*, 2003 (*Am. J. Pharmacogenomics* 3:131-144) y en Puerta-Fernández *et al.*, 2003 (*FEMS Microbiology Reviews* 27:75-97). Aunque pueden utilizarse ribozimas que cortan el ARNm en secuencias de reconocimiento específicas de sitio para destruir los ARNm del factor de coagulación XII, resulta preferente la utilización de horquillas de acción en trans o ribozimas cabeza de martillo ("hammerhead"). Los ribozimas cabeza de martillo cortan los ARNm en localizaciones dictadas por regiones flanqueantes que forman pares de bases complementarios con el ARNm diana. El único requisito es que el ARNm diana presente la secuencia siguiente de dos bases: 5'-UG-3'. La construcción y producción de ribozimas cabeza de martillo es bien conocida de la técnica y se describe en mayor detalle en Haseloff y Gerlach, *Nature* 334:585-591, 1988. Existen numerosos sitios potenciales de división de ribozima cabeza de martillo dentro de la secuencia de nucleótidos del ARNm del factor de coagulación XII que resultarán evidentes para el experto en la materia. Preferentemente, el ribozima se manipula de manera que el sitio de reconocimiento de división se encuentre situado próximo al extremo 5' del ARNm del factor de coagulación XII, es decir, para incrementar la eficiencia y minimizar la acumulación intracelular de transcritos de ARNm no funcionales. La ARNasa P es otro enfoque de ribozima que se utiliza para la inhibición selectiva de los ARN patógenicos. Los ribozimas pueden estar compuestos de oligonucleótidos modificados (por ejemplo para una estabilidad mejorada, reconocimiento, etc.) y deben administrarse en las células que expresan el factor de coagulación XII. Los constructos de ADN codificantes del ribozima pueden introducirse en la célula de la manera indicada anteriormente para la introducción de otras moléculas de ácidos nucleicos. Un método preferido de administración implica la utilización de un constructo de ADN "codificante" del ribozima bajo el control de un promotor constitutivo fuerte, tal como, por ejemplo, un promotor pol III o pol II, de manera que las células transfectadas produzcan cantidades suficientes del ribozima para destruir los mensajes endógenos de factor de coagulación XII e inhiban la traducción. Debido a que los ribozimas, al contrario que las moléculas antisentido, son catalíticas, generalmente se requiere una concentración intracelular más baja para una acción eficiente. La reparación del ARN mediada por ribozimas es otra opción terapéutica que aplica tecnologías de ribozimas (Watanabe y Sullenger, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 44:109-118, 2000) y también puede resultar útil para el propósito de la presente invención. Con este fin, puede utilizarse intrones de grupo I catalíticos en una reacción de corte y empalme en trans para sustituir un segmento defectuoso de ARNm diana con el fin de aliviar un fenotipo mutante.

Según la presente invención, el factor de coagulación XII es un mutante asociado a enfermedad del factor de coagulación XII tal como se ha definido anteriormente. Tal como se ha indicado anteriormente, con el fin de determinar si una mutación está asociada a enfermedad o no, el experto en la materia podrá, por ejemplo, comparar la frecuencia de un cambio de una secuencia específica, por ejemplo en el gen del factor de coagulación XII, en pacientes afectados por AEH de tipo III, con la frecuencia en individuos de control apropiadamente seleccionados y concluir a partir de una desviación estadísticamente significativa de la frecuencia en el grupo de pacientes que dicha mutación es una mutación asociada a enfermedad.

Dicho modulador puede ser selectivo para un mutante asociado a enfermedad del factor de coagulación XII, comprendiendo el método: (a) comparar el efecto del modulador sobre la actividad o expresión y/o secreción del factor de coagulación XII natural y del asociado a enfermedad, y (b) seleccionar un compuesto que (i) module la actividad del factor de coagulación XII asociado a enfermedad o la expresión y/o secreción del mismo y que (ii) no afecte a la actividad del factor de coagulación XII natural o la expresión y/o secreción del mismo. Mediante la utilización de este método el experto en la materia puede determinar si un compuesto modulador es un modulador general del factor de coagulación XII o si es selectivo para el factor de coagulación XII asociado a enfermedad. También resulta posible y se encuentra contemplado que un modulador afecte preferentemente al factor de coagulación XII asociado a enfermedad, y parcialmente, aunque en menor grado, también al factor de coagulación XII natural.

Además se describen los mutantes o mutaciones asociados a enfermedad siguientes: (a) un mutante localizado en el dominio de la fibronectina de tipo II, dentro de la región de las posiciones aminoácidas 1 a 76, y/o una mutación localizada en la secuencia de ácidos nucleicos codificante del dominio de la fibronectina de tipo II, dentro de las posiciones del ARNm 107 a 334, (b) un mutante localizado en el dominio 1 de tipo FCE, dentro de la región de las posiciones aminoácidas 77 a 113, y/o una mutación localizada en la secuencia de ácidos nucleicos codificante del dominio 1 de tipo FCE, dentro de las posiciones de ARNm 335 a 445, (c) un mutante localizado en el dominio de la fibronectina de tipo I, dentro de la región de las posiciones aminoácidas 114 a 157, y/o una mutación localizada en la secuencia de ácidos nucleicos codificante del dominio de la fibronectina de tipo I, dentro de las posiciones de ARNm 446 a 577, (d) un mutante localizado en el dominio 2 de tipo FCE, dentro de la región de las posiciones aminoácidas 158 a 192, y/o una mutación localizada en la secuencia de ácidos nucleicos codificante del dominio 2 de tipo FCE, dentro de las posiciones de ARNm 578 a 682, (e) un mutante localizado en el dominio kringle, dentro de la región de posiciones aminoácidas 193 a 276, y/o una mutación localizada en la secuencia de ácidos nucleicos codificante del dominio kringle, dentro de las posiciones de ARNm 683 a 934, (f) un mutante localizado en la región rica en prolina, dentro de la región de las posiciones aminoácidas 277 a 331, y/o una mutación localizada en la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la región rica en prolina, dentro de las posiciones de ARNm 935 a 1099, (g) un mutante localizado en la región de sitios de división proteolítica, dentro de la región de las posiciones aminoácidas 332 a 353, y/o una mutación localizada en la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la región de sitios de división proteolítica, dentro de las posiciones de ARNm 1.100 a 1.165, (h) un mutante localizado en el dominio de serina proteasa, dentro de la región de posiciones aminoácidas 354 a 596, y/o una mutación localizada en la secuencia de ácidos nucleicos codificante del dominio de serina proteasa, dentro de las posiciones de ARNm 1.166 a 1.894, (i) un mutante localizado en el péptido de señal, dentro de la región de posiciones aminoácidas -19 a -1, y/o una mutación localizada en la secuencia de ácidos nucleicos codificante del péptido de señal, dentro de las posiciones de ARNm 50 a 106, (j) una mutación localizada en las regiones no traducidas (RNT) del ARNm del factor de coagulación XII, dentro de las posiciones de ARNm 1 a 49 y/o 1.895 a 2.048, (k) una mutación situada en un intrón del gen del factor de coagulación XII, y/o (l) una mutación localizada en una secuencia genómica reguladora flanqueante del gen del factor de coagulación XII, dentro de la región que comprende 4.000 pb cadena arriba del sitio de inicio de transcripción del gen del factor de coagulación XII y/o dentro de la región que comprende 3.000 pb cadena abajo de la secuencia de nucleótidos que representa la 3'-RNT del ARNm del factor de coagulación XII.

La numeración anteriormente indicada de los residuos aminoácidos del factor de coagulación XII humano se refiere a la numeración tal como se proporciona en, por ejemplo, Cool y MacGillivray, 1987 (J. Biol. Chem. 262:13662-13673). La numeración de las posiciones de ARNm se refiere a GenBank nº de acceso NM_000505.2. Los intrones del gen del factor de coagulación XII preferentemente son los intrones uno a trece tal como se proporcionan en, por ejemplo, los datos Seattle (<http://pga.gs.washington.edu/data/f12/f12.ColorFasta.html>) o en el UCSC Genome Browser/julio de 2003 secuencia de referencia humana/cr5:176.810.093-176.817.530. También según la secuencia de referencia humana de julio de 2003 del UCSC Genome Browser, las secuencias reguladoras flanqueantes del gen del factor de coagulación XII, tal como se proporcionan anteriormente, comprenden las posiciones nucleótidas cr5:176.817.531 a 176.821.030 y las posiciones nucleótidas cr5:176.807.093 a 176.810.092.

Según la presente invención, dicho mutante es un mutante que afecta al residuo aminoácido 309 del factor de coagulación XII humano. Lo anterior se refiere a la observación, tal como se indica en detalle en los Ejemplos de la presente invención, de que en un número significativo de pacientes estudiados podía detectarse una mutación en la región codificante de la región rica en prolina del gen del factor de coagulación XII humano. Esta mutación es un ejemplo de las mutaciones esperadas según las enseñanzas de la presente invención y que resultan útiles para el diagnóstico del AEH III, así como para la evaluación diagnóstica de cualquier paciente que se presente con angioedema o síntomas relacionados con angioedema. El experto en la materia ahora podrá utilizar los conocimientos dados a conocer en la presente memoria y adaptar los métodos convencionales o utilizar los métodos de la presente invención con el fin de, por ejemplo, diagnosticar un paciente que se sospecha que ha desarrollado o que presenta una predisposición a desarrollar un angioedema hereditario de tipo III o en un sujeto que se sospecha que es un portador de angioedema hereditario de tipo III. Además, el experto en la materia podrá buscar mutaciones específicas adicionales dentro del gen del factor de coagulación XII, tal como se espera según las enseñanzas de la presente invención.

Tal como se utiliza en la presente memoria, las posiciones 309 y 310 se refieren a la numeración de la proteína madura de factor de coagulación XII, en la que el primer aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína madura de factor XII es el residuo aminoácido número 1.

En una forma de realización más preferida de la presente invención, dicho residuo aminoácido en la posición 309 se sustituye por un residuo aminoácido básico o cargado positivamente. La expresión "residuo aminoácido básico o cargado positivamente" se refiere a arginina, lisina e histidina.

En otra forma de realización más preferida de la presente invención, dicho residuo aminoácido básico o cargado positivamente es una lisina o arginina.

En otra forma de realización preferida, el método de la presente invención comprende el ensayo *in vitro* de una

muestra de un donante de sangre para determinar si la sangre de dicho donante o componente de la misma pueden utilizarse para la transfusión en un paciente que lo requiere, en el que un ensayo positivo indica una predisposición para angioedema hereditario de tipo III, excluyendo la transfusión de sangre o componentes de la misma de dicho donante.

5 En la presente memoria también se describe la utilización de (a) un (poli) péptido codificado por el gen del factor de coagulación XII o un fragmento del mismo, (b) un modulador del factor de coagulación XII identificado mediante cualquier de los métodos según las reivindicaciones 13 a 21, (c) una molécula de ácidos nucleicos capaz de expresar el factor de coagulación XII o un fragmento del mismo, y/o (d) una molécula de ácidos nucleicos capaz de expresar un modulador de la actividad del factor de coagulación XII o la expresión y/o secreción del mismo, para la preparación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento y/o prevención del angioedema hereditario de tipo III. Dicho modulador del factor de coagulación XII puede ser cualquiera de los compuestos moduladores identificados mediante los métodos de la presente invención, o cualquiera de los compuestos moduladores dados a conocer en la presente invención. De esta manera, el modulador puede afectar a la expresión del gen del factor de coagulación XII o puede modular la secreción o la función del factor de coagulación XII. Preferentemente, el compuesto modulador es un inhibidor de la actividad del factor de coagulación XII o de la expresión o secreción del mismo. La utilización de (a) y (c) puede encontrarse comprendida, por ejemplo, con el propósito de una vacunación, basada en proteínas o basada en ADN, para estimular una respuesta inmunológica contra el factor de coagulación XII (ver posteriormente).

20 Los componentes activos de una composición farmacéutica tales como, por ejemplo, un compuesto molecular pequeño o un anticuerpo, se formulan y se dosifican de una manera consistente con las buenas prácticas, considerando la condición clínica del paciente individual, el sitio de administración de la composición farmacéutica, el método de administración, la programación de la administración y otros factores conocidos por el experto en la materia. La "cantidad eficaz" de los componentes de la composición farmacéutica para los fines de la presente memoria se determina de esta manera a partir de dichas consideraciones.

25 En términos generales, la cantidad farmacéuticamente eficaz total de, por ejemplo, un compuesto proteico administrado por vía parenteral en cada dosis se encontrará comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 1 µg/kg/día y 10 mg/kg/día de peso corporal del paciente, aunque, tal como se ha indicado anteriormente, lo anterior estará sometido al criterio terapéutico. La duración del tratamiento necesario para observar cambios y el intervalo posterior al tratamiento para que se produzcan respuestas aparentemente varía según el efecto deseado. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía oral, rectal, parenteral, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (tal como mediante polvos, pomadas, gotas o parche transdérmico), bucal o en forma de un spray oral o nasal. La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un relleno, diluyente, material de encapsulado o auxiliar de formulación de cualquier tipo sólido, semisólido o líquido no tóxico. El término "parenteral" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a, por ejemplo, modos de administración que incluyen la inyección y la infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intraarticular.

40 La composición farmacéutica también se administra convenientemente mediante sistemas de liberación sostenida. Entre los ejemplos adecuados de composiciones de liberación sostenida se incluyen las matrices de polímeros semipermeables en forma de artículos conformados, por ejemplo películas o microcápsulas. Entre las matrices de liberación sostenida se incluyen los poliláctidos (patente US nº 3.773.919 y la patente EP 0 058 481), los copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman U. *et al.*, *Biopolymers* 22:547-556, 1983), metacrilato de poli(2-hidroxietilo) (R. Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277, 1981, y R. Langer, *Chem. Tech.* 12:98-105, 1982), acetato de etilén-vinilo (R. Langer *et al.*, *Id.*) o ácido poli-D-(-)-3-hidroxitútrico (patente EP 0 133 988). Las composiciones de liberación sostenida incluyen además, por ejemplo, componentes atrapados en liposomas. Los liposomas que contienen los componentes activos de la composición farmacéutica se preparan mediante métodos conocidos *per se*: patente DE nº 3.218.121; Epstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82:3688-3692, 1985; Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77:4030-4034, 1980; patentes EP 0 052 322, EP 0 036 676, EP 0 088 046, EP 0 143 949, EP 0 142 641; solicitud de patente japonesa nº 83-118008, patentes US nº 4.485.045 y nº 4.544.545, y la patente EP 0 102 324. Ordinariamente los liposomas son de tipo unilamelar pequeño (de aproximadamente 200 a 800 Angstroms) en los que el contenido de lípidos es superior a aproximadamente 30 por ciento molar de colesterol, ajustando la proporción seleccionada para optimizar la terapia.

55 Los componentes que deben utilizarse para la administración terapéutica deben ser estériles. La esterilidad se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estéril (por ejemplo membranas de 0,2 micrómetros). Las composiciones terapéuticas generalmente se introducen en un recipiente que presenta una abertura de acceso estéril, por ejemplo una bolsa o vial de solución intravenosa que presenta un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica.

60 Se encuentra adicionalmente contemplado en relación a la utilización descrita, que dicho factor de coagulación XII o dicho (poli) péptido sea un factor de coagulación XII mutante o (poli) péptido mutante o un fragmento del mismo. En particular, el mutante puede ser un mutante asociado a enfermedad del factor de coagulación XII o un fragmento del mismo, que puede utilizarse, por ejemplo, para la preparación de una vacuna para estimular una respuesta

- inmunológica. En este caso, un fragmento del factor de coagulación XII comprendería por lo menos 5, 6, 7, 8 o 9 residuos aminoácidos consecutivos del factor de coagulación XII para proporcionar un inmunógeno eficaz. Con este fin el fragmento puede ser un fragmento que comprende la posición mutante del (poli)péptido factor de coagulación XII asociado a enfermedad. La utilización de constructos de péptidos quiméricos modificados y otros métodos para crear una inmunogenicidad suficiente son conocidos de la técnica (ver, por ejemplo, Rittershaus *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20:2106-2112, 2000). Alternativamente, resulta concebible manipular el factor de coagulación XII de manera que el mutante resultante pueda, por ejemplo, desplazar un (poli)péptido factor de coagulación XII mutante asociado a enfermedad de uno de sus parejas de interacción. La administración de dicho constructo recombinante, es decir mutante de factor de coagulación XII en un huésped puede, por lo tanto, resultar útil en el tratamiento, finalmente también en la prevención, del AEH de tipo III. Con respecto a un modulador utilizado para la preparación de una composición farmacéutica y/o una molécula de ácidos nucleicos que expresa un modulador se encuentra contemplado en la presente memoria que la especie (poli)péptido, gen o ARNm del factor de coagulación XII diana, sea o contenga un mutante o mutación asociada a enfermedad.
- En relación a la utilización descrita, se encuentra contemplado que el mutante sea o se base en: (a) un mutante localizado en el dominio de la fibronectina de tipo II, dentro de la región de las posiciones aminoácidas 1 a 76, y/o una mutación localizada en la secuencia de ácidos nucleicos codificante del dominio de fibronectina de tipo II, dentro de las posiciones de ARNm 107 a 334, (b) un mutante localizado en el dominio 1 de tipo FCE, dentro de la región de las posiciones aminoácidas 77 a 113, y/o una mutación situada en la secuencia de ácidos nucleicos codificante del dominio 1 de tipo FCE, dentro de las posiciones de ARNm 335 a 445, (c) un mutante localizado en el dominio de fibronectina de tipo I, dentro de la región de posiciones aminoácidas 114 a 157, y/o una mutación localizada en la secuencia de ácidos nucleicos codificante del dominio de fibronectina de tipo I, dentro de las posiciones de ARNm 446 a 577, (d) un mutante localizado en el dominio 2 de tipo FCE, dentro de la región de posiciones aminoácidas 158 a 192, y/o una mutación localizada en la secuencia de ácidos nucleicos codificante del dominio 2 de tipo FCE, dentro de las posiciones de ARNm 578 a 682, (e) un mutante localizado en el dominio kringle, dentro de la región de posiciones aminoácidas 193 a 276, y/o una mutación localizada en la secuencia de ácidos nucleicos codificante del dominio kringle, dentro de las posiciones de ARNm 683 a 934, (f) un mutante localizado en la región rica en prolinas, dentro de la región de posiciones aminoácidas 277 a 331, y/o una mutación localizada en la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la región rica en prolinas, dentro de las posiciones de ARNm 935 a 1.009, (g) un mutante localizado en la región de sitios de división proteolítica, dentro de la región de posiciones aminoácidas 332 a 353, y/o una mutación localizada en la secuencia de ácidos nucleicos codificante de la región de sitios de división proteolítica dentro de las posiciones de ARNm 1.100 a 1.165, (h) un mutante localizado en el dominio de serina proteasa, dentro de la región de posiciones aminoácidas 354 a 596, y/o una mutación localizada en la secuencia de ácidos nucleicos codificante del dominio de serina proteasa, dentro de las posiciones de ARNm 1.166 a 1.894, (i) un mutante localizado en el péptido de señal dentro de la región de posiciones aminoácidas -19 a -1, y/o una mutación localizada en la secuencia de ácidos nucleicos codificante del péptido de señal, dentro de las posiciones de ARNm 50 a 106, (j) una mutación localizada en las regiones no traducidas (RNT) del ARNm del factor de coagulación XII, dentro del ARNm en las posiciones 1 a 49 y/o 1.895 a 2.048, (k) una mutación localizada en un intrón del gen del factor de coagulación XII, y/o (l) una mutación localizada en una secuencia genómica reguladora flanqueante del gen del factor de coagulación XII, dentro de la región que comprende 4.000 pb cadena arriba del sitio de inicio de transcripción del gen del factor de coagulación XII y/o dentro de la región que comprende 3.000 pb cadena abajo de la secuencia de nucleótidos que representa la RNT-3' del ARNm del factor de coagulación XII. La numeración de las secuencias, etc. es la indicada de manera general anteriormente (ver anteriormente).
- En relación a la utilización descrita, dicho mutante localizado en la región rica en prolinas puede ser un mutante que afecta al residuo aminoácido 309 o 310 del factor de coagulación XII humano.
- En relación a la utilización descrita, dicho residuo aminoácido en la posición 309 puede sustituirse por un residuo aminoácido básico o cargado positivamente. La expresión "residuo aminoácido básico o cargado positivamente" se refiere a arginina, lisina e histidina.
- En relación a la utilización descrita, dicho residuo aminoácido básico o cargado positivamente puede ser una lisina o una arginina.
- En relación a la utilización descrita, se encuentra contemplado que el modulador sea un inhibidor del factor de coagulación XII, de la actividad, expresión y/o secreción del mismo, que comprende: (a) un aptámero o un anticuerpo inhibidor o fragmento o derivado del mismo, de unión específica y/o específicamente inhibidor de la actividad de (i) factor de coagulación XII asociado a enfermedad o (ii) factor de coagulación XII natural y asociado a enfermedad, (b) un inhibidor de molécula pequeña de (i) el factor de coagulación XII asociado a enfermedad y/o la actividad del factor de coagulación XII asociado a enfermedad, o (ii) el factor de coagulación XII natural y asociado a enfermedad y la actividad del factor de coagulación XII asociado a enfermedad, (c) un inhibidor de serina proteasa de (i) el factor de coagulación XII asociado a enfermedad o de (ii) factor de coagulación XII natural y asociado a enfermedad seleccionado de un primer grupo que consiste de inhibidores proteicos naturales y modificados o manipulados de serina proteasas, incluyendo el inhibidor de la esterasa C1, antitrombina III, α 2-antiplasmina, α 1-antitripsina, serpina ovoalbúmina y α 2-macroglobulina, o seleccionado de un segundo grupo que consiste de inhibidores de tipo Kunitz, incluyendo el inhibidor de tripsina pancreático bovino, o (d) un ARNip o ARNhp, un

ribozima o una molécula antisentido de ácidos nucleicos que se hibrida específicamente con una molécula de ácidos nucleicos codificante del factor de coagulación XII o que regula la expresión del factor de coagulación XII, que afecta a: (i) el factor de coagulación XII asociado a enfermedad o (ii) el factor de coagulación XII natural y asociado a enfermedad. En general, puede ser un tipo preferible de tratamiento utilizar como diana específicamente el factor de coagulación XII mutante asociado a enfermedad, la activación, expresión y/o secreción del mismo. Sin embargo, también puede resultar posible utilizar un inhibidor con diana en el factor de coagulación XII natural así como mutante asociado a enfermedad, la actividad, expresión o secreción del mismo; dicha opción aparentemente resulta particularmente razonable en el caso de que el tratamiento no sea un tratamiento a largo plazo o a plazo ultralargo.

En la presente memoria se describe además un método de terapia génica en un mamífero, caracterizado por la administración de una cantidad eficaz de una molécula de ácidos nucleicos capaz de expresarse en el mamífero: (a) ARNip o ARNhp, un ribozima o una molécula antisentido de ácidos nucleicos que se hibrida específicamente con una molécula de ácidos nucleicos codificante de factor de coagulación XII o que regula la expresión del mismo, (b) un aptámero o un anticuerpo inhibidor o fragmento o derivado del mismo, de unión específica al (poli)péptido factor de coagulación XII, (c) factor de coagulación XII o un fragmento del mismo, o (d) un inhibidor de serina proteasa seleccionado de entre el grupo (i) que consiste de inhibidores proteicos naturales y modificados o manipulados de serina proteasas, incluyendo el inhibidor de esterasa C1, antitrombina III, α 2-antiplasmina, α 1-antitripsina, serpina ovoalbúmina y α 2-macroglobulina, o seleccionado del grupo (ii) de inhibidores de tipo Kunitz, incluyendo el inhibidor de tripsina pancreático bovino.

El método de la terapia génica se refiere a la introducción de secuencias de ácidos nucleicos, ADN, ARN y/o secuencias de ADN o ARN antisentido, en un mamífero. Este método requiere un constructo de ácidos nucleicos capaz de expresar en el mamífero: (a) ARNip o ARNhp, un ribozima o una molécula antisentido de ácidos nucleicos que se hibrida específicamente con una molécula de ácidos nucleicos codificante o reguladora de la expresión del factor de coagulación XII, (b) un aptámero o un anticuerpo inhibidor o fragmento o derivado del mismo, de unión específica al (poli)péptido factor de coagulación XII, (c) factor de coagulación XII o un fragmento del mismo, o (d) un inhibidor proteico de serina proteasa, por ejemplo inhibidor de la esterasa C1, antitrombina III, α 2-antiplasmina, α 2-macroglobulina, α 1-antitripsina, una serpina ovoalbúmina o un inhibidor de tipo Kunitz, modificado o manipulado de manera que inhiba específicamente el factor de coagulación XII, preferentemente el factor de coagulación XII mutante asociado a enfermedad, y cualesquiera otros elementos genéticos necesarios para la expresión de la molécula deseada de (poli)péptido o ácido nucleico en el tejido diana. Dicha terapia génica y técnicas de administración son conocidas de la técnica; ver, por ejemplo, el documento nº WO90/11092, o: M.I. Phillips (ed.): Gene Therapy Methods. Methods in Enzymology, vol. 346, Academic Press, San Diego, 2002. De esta manera, por ejemplo, las células de un paciente pueden manipularse *ex vivo* con un constructo de ácidos nucleicos que comprende un promotor ligado operablemente con la molécula de ácidos nucleicos correspondiente a la molécula que debe introducirse, proporcionando seguidamente las células manipuladas al paciente que debe tratarse. Dichos métodos son bien conocidos de la técnica. Por ejemplo, ver Belldegrun A. *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. 85:207-216, 1993; Ferrantini M. *et al.*, Cancer Research 53:1107-1112, 1993; Ferrantini M. *et al.*, J. Immunology 153:4604-4615, 1994; Kaido T. *et al.*, Int. J. Cancer 60:221-229, 1995; Ogura H. *et al.*, Cancer Research 50:5102-5106, 1990; Santodonato L. *et al.*, Human Gene Therapy 7:1-10, 1996; Santodonato L. *et al.*, Gene Therapy 4:1246-1255, 1997, y Zhang J.-F. *et al.*, Cancer Gene Therapy 3:31-38, 1996. Las células que se manipulan pueden ser, por ejemplo, células sanguíneas o hepáticas. El constructo de ácidos nucleicos utilizado en la terapia génica puede administrarse mediante cualquier método que administre material inyectable en las células de un animal, tal como, la inyección en el espacio intersticial de los tejidos (corazón, músculo, piel, pulmones, hígado y similares). La molécula de ácidos nucleicos utilizada en la terapia génica puede administrarse en un portador líquido o acuoso farmacéuticamente aceptable.

Las moléculas de ácidos nucleicos pueden administrarse en forma de una molécula desnuda de ácidos nucleicos. El término "desnuda" aplicado a una molécula de ácidos nucleicos, ADN o ARN, se refiere a secuencias que se encuentran libres de cualquier vehículo de administración que actúe ayudando, estimulando o facilitando la entrada en la célula, incluyendo secuencias víricas, partículas víricas, formulaciones de liposomas, lipofectina o agentes de precipitación y similares. Sin embargo, las moléculas de ácidos nucleicos utilizadas en la terapia génica también pueden administrarse en formulaciones de liposomas y formulaciones de lipofectina y similares que pueden prepararse mediante métodos bien conocidos por el experto en la materia. Dichos métodos se describen en, por ejemplo, las patentes US nº 5.593.972, nº 5.589.466 y nº 5.580.859.

Los constructos de vector utilizados en el método de terapia génica preferentemente son constructos que no se integran en el genoma del huésped ni contienen secuencias que permitan la replicación. Entre los vectores apropiados se incluyen pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG, disponibles de Stratagene; pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL, disponibles de Pharmacia, y pEF1/V5, pcDNA3.1 y pRc/CMV2, disponibles de Invitrogen. Otros vectores adecuados resultarán fácilmente evidentes para el experto en la materia. Puede utilizarse cualquier promotor fuerte conocido por el experto en la materia para regular la expresión a partir de la molécula de ácidos nucleicos utilizada en terapia génica. Entre los promotores adecuados se incluyen promotores adenovíricos, tales como el promotor tardío mayor adenovírico, o promotores heterólogos, tales como el promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor del virus sincitial respiratorio (VSR), promotores inducibles tales como el promotor MMT, el promotor metalotioneína, promotores de choque térmico, el promotor albúmina, el promotor ApoAI, los promotores de globina humana, los

promotores de timidina quinasa vírica, tales como el promotor de timidina quinasa del virus herpes simple, las RTL retrovíricas, el promotor b-actina y los promotores de la hormona del crecimiento humana. El promotor también puede ser el promotor nativo del factor de coagulación XII o de cualquiera de los polipéptidos expresados en terapia génica. Al contrario que otras técnicas de terapia génica, una ventaja principal de la introducción de secuencias de ácidos nucleicos desnudos en las células diana es la naturaleza transitoria de la síntesis de la molécula e ácidos nucleicos en las células. Algunos estudios han demostrado que pueden introducirse secuencias de ADN no replicantes en las células para proporcionar la producción del polipéptido deseado durante periodos de hasta seis meses.

Las moléculas de ácidos nucleicos utilizadas en terapia génica pueden administrarse en el espacio intersticial de los tejidos en un animal, incluyendo de músculo, piel, cerebro, pulmón, hígado, bazo, médula ósea, timo, corazón, linfa, sangre, hueso, cartílago, páncreas, riñón, vesícula biliar, estómago, intestino, testículo, ovario, útero, recto, sistema nervioso, ojo, glándula y tejido conectivo. El espacio intersticial de los tejidos comprende el líquido intercelular, la matriz mucopolisacárida entre las fibras reticulares de los tejidos orgánicos, fibras elásticas en las paredes de vasos o cámaras, fibras de colágeno de tejidos fibrosos o dicha misma matriz dentro del tejido conectivo que envaina las células musculares o en las lagunas de los huesos. Pueden administrarse convenientemente mediante inyección en los tejidos que comprenden dichas células. Se administran y expresan preferentemente en células que no se dividen persistentes, las cuales se encuentran diferenciadas, aunque la administración y la expresión puede conseguirse en células no diferenciadas o menos completamente diferenciadas, tales como, por ejemplo, células madre de fibroblastos sanguíneos o de la piel. Las células musculares *in vivo* son particularmente competentes en su capacidad de incorporar y expresar polinucleótidos.

Para la inyección de secuencias de ácidos nucleicos desnudos, una cantidad de administración eficaz de ADN o ARN se encontrará comprendida en el intervalo de entre aproximadamente 0,0005 mg/kg de peso corporal y aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. Preferentemente la dosis es de entre aproximadamente 0,005 mg/kg y aproximadamente 20 mg/kg y más preferentemente de entre aproximadamente 0,05 mg/kg y aproximadamente 5 mg/kg. Evidentemente, tal como apreciará el experto ordinario en la materia, dicha dosis variará según el tejido sitio de inyección. La dosis apropiada y eficaz de moléculas de ácidos nucleicos puede ser fácilmente determinada por el experto ordinario en la materia y puede depender de la condición bajo tratamiento y de la vía de administración. La vía preferente de administración es la vía parenteral de inyección en el espacio intersticial de los tejidos. Sin embargo, también pueden utilizarse otras vías parenterales, tales como la inhalación de una formulación de aerosol, en particular para la administración en pulmones o tejidos bronquiales, garganta o membranas mucosas de la nariz.

Las moléculas de ácidos nucleicos desnudos se administran mediante cualquier método conocido de la técnica, incluyendo, aunque sin limitación, la inyección con aguja directa en el sitio de administración, la inyección intravenosa, la administración tópica, la infusión con catéter y las denominadas "pistolas génicas". Estos métodos de administración son conocidos de la técnica. Los constructos también pueden administrarse con vehículos de administración tales como secuencias víricas, partículas víricas, formulaciones de liposomas, lipofectina, agentes de precipitación, etc.

Entre las preparaciones de liposomas para la utilización en la presente invención se incluyen preparaciones catiónicas (cargadas positivamente), aniónicas (cargadas negativamente) y neutras. Sin embargo, los liposomas catiónicos resultan particularmente preferentes debido a que puede formarse un complejo de carga fuerte entre el liposoma catiónico y el ácido nucleico polianiónico. Se ha demostrado que los liposomas catiónicos actúan como mediadores en la administración intracelular del ADN plasmídico (Felgner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7416, 1987), ARNm (Malone *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6077-6081, 1989) y factores de transcripción purificados (Debs *et al.*, J. Biol. Chem. 265:10189-10192, 1990) en forma funcional. Los liposomas catiónicos se encuentran fácilmente disponibles. Por ejemplo, los liposomas de N[1,2,3-dioleiloxi]propil]-N,N,N-trietilamonio (DOTMA) resultan particularmente útiles y se encuentran disponibles bajo la marca comercial Lipofectin, de GIBCO BRL, Gran Island, N.Y. (ver también Felgner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7416, 1987). Entre otros liposomas disponibles comercialmente se incluyen Transfectace (DDAB/DOPE) y DOTAP/DOPE (Boehringer). Pueden prepararse otros liposomas catiónicos a partir de materiales fácilmente disponibles utilizando técnicas bien conocidas. Ver, por ejemplo, la publicación de patente PCT nº WO 90/11092 para una descripción de la síntesis de liposomas de DOTAP (1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamonio)propano). La preparación de los liposomas de DOTMA se explica en la literatura; ver, por ejemplo, Felgner *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417. Pueden utilizarse métodos similares para preparar liposomas a partir de otros materiales lipídicos catiónicos. De manera similar, se encuentran fácilmente disponibles liposomas aniónicos y neutros, tal como de Avanti Polar Lipids (Birmingham, Ala.) o pueden prepararse fácilmente utilizando materiales fácilmente disponibles. Entre dichos materiales se incluyen fosfatidilcolina, colesterol, fosfatidiletanolamina, dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), entre otros. Estos materiales también pueden mezclarse con las materias primas DOTMA y DOTAP en proporciones adecuadas. Los métodos para preparar liposomas utilizando dichos materiales son bien conocidos de la técnica. Por ejemplo, puede utilizarse dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG) y dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) disponibles comercialmente en diversas combinaciones para preparar liposomas convencionales, con o sin la adición de colesterol. De esta manera, por ejemplo, pueden prepararse vesículas de DOPG/DOPC mediante el secado de 50 mg de cada uno de DOPG y

DOPC bajo un flujo de gas nitrógeno en un vial de sonicación. La muestra se deja bajo una bomba de vacío durante la noche y se hidrata al día siguiente con agua desionizada. A continuación, la muestra se sonica durante 2 horas en un vial tapado, utilizando un sonicador Heat Systems modelo 350. Alternativamente, pueden prepararse vesículas cargadas negativamente sin sonicación para producir vesículas multilamelares o mediante extrusión a través de membranas Nucleopore para producir vesículas unilamelares de tamaño discreto. Se conocen otros métodos y se encuentran disponibles para el experto en la materia.

Generalmente, la proporción entre ácidos nucleicos y liposomas es de entre aproximadamente 10:1 y aproximadamente 1:10. Preferentemente, la proporción es de entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente 1:5. Más preferentemente, la proporción es de entre aproximadamente 3:1 y aproximadamente 1:3. Todavía más preferentemente, la proporción es de aproximadamente 1:1.

Las células pueden manipularse, *ex vivo* o *in vivo*, utilizando una partícula retroviral que contiene ARN que comprende una secuencia codificante de cualesquiera de las moléculas de ácidos nucleicos o (poli)péptidos utilizados en el método de terapia génica. Entre los retrovirus a partir de los que pueden derivarse vectores plásmido retroviral se incluyen, aunque sin limitación, el virus de la leucemia murina de Moloney, el virus de la necrosis del bazo, el virus del sarcoma de Rous, el virus del sarcoma de Harvey, el virus de la leucosis aviar, el virus de la leucemia del mono gibón, el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus del sarcoma mieloproliferativo y el virus de tumor mamario. El vector plásmido retroviral se utiliza para transducir líneas celulares en empaquetamiento para formar líneas celulares productoras. Entre los ejemplos de células en empaquetamiento que pueden transfectarse se incluyen, aunque sin limitación, las líneas celulares PE501, PA317, R-2, R-AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2, RCRE, RCRIP, GP+E-86, GP+envAm12 y DAN, tal como se indica en Miller, Human Gene Therapy 1:5-14, 1990. El vector puede transducir células en empaquetamiento mediante cualesquiera medios conocidos de la técnica. Entre dichos medios se incluyen, aunque sin limitación, la electroporación, la utilización de liposomas y la precipitación con CaPO₄. En una alternativa, el vector plásmido retroviral puede encapsularse en un liposoma, o acoplarse con un lípido, y después administrarse en un huésped. La línea celular productora genera partículas de vector retroviral infecciosas que incluyen la molécula de ácidos nucleicos codificante del (poli)péptido o el ácido nucleico terapéuticamente activo, tal como ARNip, destinado a la utilización para la terapia génica. A continuación, estas partículas de vector retroviral pueden utilizarse para transducir células eucarióticas, *in vitro* o *in vivo*.

Las células pueden manipularse, *ex vivo* o *in vivo*, con una molécula de ácidos nucleicos que debe utilizarse en terapia génica, contenida en un vector adenovirus. El adenovirus puede manipularse de manera que exprese un constructo de interés y simultáneamente se inactiva en términos de su capacidad de replicarse en un ciclo vital vírico lítico normal. La expresión en el adenovirus se consigue sin integración del ADN vírico en un cromosoma de la célula huésped, disipando las preocupaciones sobre la mutagénesis por inserción. Además, se han utilizado adenovirus como vacunas entéricas vivas durante muchos años con un excelente perfil de seguridad (Schwartz A.R. *et al.*, Am. Rev. Respir. Dis. 109:233-238, 1974). Finalmente, se ha demostrado la transferencia génica mediada por adenovirus en varios casos, incluyendo la transferencia de la alfa-1-antitripsina y CFTR en los pulmones de ratas algodonerías (Rosenfeld M.A. *et al.*, Science 252:431-434, 1991; Rosenfeld *et al.*, Cell 68:143-155, 1992). Además, varios amplios estudios que intentaban establecer que un adenovirus era el agente causativo en el cáncer humano han sido uniformemente negativos (Green M. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:6606, 1979). Los vectores adenovirales adecuados que resultan útiles en la presente invención se describen en, por ejemplo, Kozarsky y Wilson, Curr. Opin. Genet. Devel. 3:499-503, 1993; Rosenfeld *et al.*, Cell 68:143-155, 1992; Engelhardt *et al.*, Human Genet. Ther. 4:759-769, 1993; Yang *et al.*, Nature Genet. 7:362-369, 1994; Wilson *et al.*, Nature 365:691-692, 1993, y la patente US nº 5.652.224. Por ejemplo, el vector adenovirus Ad2 resulta útil y puede cultivarse en células 293 humanas. Estas células contienen la región E1 de adenovirus y expresan constitutivamente E1a y E1b, que complementan los adenovirus defectuosos al proporcionar los productos de los genes delecionados del vector. Además de Ad2, también resultan útiles otras variedades de adenovirus (por ejemplo Ad3, Ad5 y Ad7). Los adenovirus utilizados pueden ser deficientes en replicación. Los adenovirus deficientes en replicación requieren la ayuda de un virus ayudante y/o una línea celular en empaquetamiento para formar partículas infecciosas. El virus resultante es capaz de infectar células y puede expresar un gen de interés que se encuentra operablemente ligado a un promotor pero que no puede replicarse en la mayoría de células. Los adenovirus deficientes en replicación pueden deleccionarse en uno o más de la totalidad o una parte de los genes siguientes: E1a, E1b, E3, E4, E2a o L1 a L5.

Asimismo se describe un animal transgénico no humano que comprende como transgén: (a) un gen codificante de un factor de coagulación XII asociado a enfermedad humana, (b) (i) un gen codificante de factor de coagulación XII asociado a enfermedad humana, e (ii) un gen codificante de factor de coagulación XII natural humano, (c) una molécula de ácidos nucleicos que causa una expresión alterada del factor de coagulación XII humano y un gen codificante del factor de coagulación XII natural humano, y/o (d) un gen de factor de coagulación XII específico de especie que se encuentra específicamente alterado para que contenga una mutación asociada a enfermedad humana.

Dicho animal transgénico descrito de (a) a (d) resultará muy importante, por ejemplo, para el estudio de las consecuencias fisiopatológicas de determinadas alteraciones del factor de coagulación XII, y para el cribado de nuevos medicamentos eficaces en el tratamiento y/o la prevención del angioedema hereditario de tipo III. Preferentemente, dicho animal es un animal mamífero, incluyendo, aunque sin limitación, la rata, el ratón, el gato, el

hámster, el perro, el conejo, el cerdo o el mono, aunque también puede ser, por ejemplo, *C. elegans* o un pez, tal como el pez torpedo.

El animal transgénico no humano descrito de (b) resultará valioso para, por ejemplo, estudiar una situación heterocigótica, incluyendo posibles efectos negativos dominantes de una mutación asociada a enfermedad. Además, podría permitir la investigación de potenciales efectos diferenciales de un medicamento, incluyendo cualquiera de los moduladores comentados anteriormente, sobre el factor de coagulación XII natural y asociado a enfermedad. El animal transgénico no humano descrito de (c) podría permitir, por ejemplo, el estudio de las consecuencias y el potencial tratamiento de un ácido nucleico mutado que conduce a una expresión alterada del factor de coagulación XII humano. Tal como se contempla en la presente memoria, dicha mutación podría estar relacionada, por ejemplo, con una molécula de ácidos nucleicos que en el genoma humano no está físicamente relacionada con el gen del factor de coagulación XII. También se encuentra contemplado que, por ejemplo en el caso de una mutación en una posición altamente conservada o dentro de un motivo funcionalmente conservado, pueda imitarse la enfermedad o predisposición a enfermedad humana en el animal mediante la alteración del gen de factor de coagulación XII específico de especie del animal para que contenga una mutación asociada a enfermedad humana.

Un método para la producción de un animal no humano transgénico, por ejemplo un ratón transgénico, comprende la introducción del polinucleótido deseado, por ejemplo un ácido nucleico codificante de factor de coagulación XII natural o mutante asociado a enfermedad humana, o la administración dirigida del vector en una célula germinal, una célula embrionaria, una célula madre o un huevo o célula derivada del mismo. La producción de embriones transgénicos y el cribado de los mismos puede llevarse a cabo, por ejemplo, tal como se indica en A.L. Joyner Ed., Gene Targeting, A Practical Approach, Oxford University Press, 1993. El ADN de las membranas embrionarias de los embriones pueden analizarse utilizando, por ejemplo, transferencias southern con una sonda apropiada. Se describe en la técnica un método general para generar animales no humanos transgénicos, ver, por ejemplo, el documento nº WO 94/24274. Para generar organismos no humanos transgénicos (que incluyen animales no humanos dianas homólogas), resultan preferentes las células madre embrionarias (células ME). Las células ME murinas, tales como la línea AB-1 cultivadas sobre capas de células nodriza SNL76/7 mitóticamente inactivas (McMahon y Bradley, Cell 62:1073-1085, 1990), esencialmente tal como se indica en: Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E.J. Robertson, ed. (Oxford: IRL Press), 1987, páginas 71 a 112, pueden utilizarse para la modificación génica homóloga dirigida. Entre otras líneas ME adecuadas se incluyen, aunque sin limitación, la línea E14 (Hooper *et al.*, Nature 326:292-295, 1987), la línea D3 (Doetschman *et al.*, J. Embryol. Exp. Morph. 87:27-45, 1985), la línea CCE (Robertson *et al.*, Nature 323:445-448, 1986), la línea AK-7 (Zhuang *et al.*, Cell 77:875-884, 1994). El éxito de la generación de una línea de ratón a partir de células ME que portan una mutación diana específica depende de la pluripotencialidad de las células ME (es decir, de su capacidad, tras la inyección de las mismas en un embrión huésped en desarrollo, tal como un blastocito o mórula, de participar en la embriogénesis y contribuir a las células germinales del animal resultante). Los blastocitos que contienen las células ME inyectadas se deja que se desarrollen en los úteros de hembras no humanas pseudogestantes y nacen como animales quiméricos. Los animales transgénicos resultantes son quiméricos para células que presentan la recombinasa o los loci informadores y se retrocruzan y criban para la presencia del transgén o transgenes correctamente dirigidos, mediante PCR o análisis de transferencia southern en ADN de biopsia de la cola de la progenie, de manera que se identifican los animales transgénicos heterocigóticos para la recombinasa o el locus/loci informadores.

Los métodos para producir moscas transgénicas, tales como *Drosophila melanogaster*, también se encuentran descritos en la técnica; ver, por ejemplo, el documento nº US-A-4.670.388, Brand y Perrimon, Development 118:401-415, 1993, y Phelps y Brand, Methods (abril de 1998) 14:367-379. Pueden generarse gusanos transgénicos, tales como *C. elegans*, tal como se indica en Mello *et al.*, Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences, Embo J. 10:3959-70, 1991; Plasterk, Reverse genetics: from gene sequence to mutant worm, Methods Cell Biol. 48:59-80, 1995.

El animal transgénico no humano descrito puede expresar adicionalmente ARNip o ARNhp, un ribozima o una molécula antisentido de ácidos nucleicos que se hibrida específicamente con el transgén o transgenes o con el gen específico de especie alterado contenido en el animal transgénico. Preferentemente, dicho transgén o transgenes son de origen humano. Dicho enfoque puede resultar útil, por ejemplo, para estudiar opciones para el tratamiento y/o la prevención, por ejemplo mediante la utilización de interferencia de ARN.

También puede resultar deseable inactivar la expresión o función de la proteína factor de coagulación XII en una determinada etapa de desarrollo y/o de vida del animal transgénico. Lo anterior puede conseguirse mediante la utilización, por ejemplo, de promotores específicos de tejido, del desarrollo y/o regulados celularmente y/o inducibles que regulan la expresión de, por ejemplo, una molécula antisentido o ribozima dirigida contra un ARNm codificante de un (poli)péptido factor de coagulación XII. Un sistema inducible adecuado es, por ejemplo, la expresión génica regulada por tetraciclina, tal como se indica en, por ejemplo, Gossen y Bujard (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551, 1992) y Gossen *et al.* (Trends Biotech. 12:58-62, 1994). De manera similar, la expresión de una proteína factor de coagulación XII mutante puede controlarse mediante dichos elementos reguladores.

Los genes específicos de especie nativa de animal transgénico no humano codificantes del factor de coagulación XII

pueden inactivarse. El término "inactivación" se refiere a la inactivación reversible o irreversible. Los métodos apropiados para obtener dicha inactivación son bien conocidos de la técnica. Dicho enfoque puede resultar útil para eliminar cualesquiera efectos de los genes específicos de especie de factor de coagulación XII del animal al estudiar, por ejemplo, los efectos fisiopatológicos y/o el posible reconocimiento terapéutico del transgén o transgenes humanos.

También se describe la utilización de cualquiera de los animales transgénicos de la presente invención, para el cribado de compuestos para la utilización en el diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento del angioedema hereditario de tipo III.

La presente invención se refiere además a una molécula de ácidos nucleicos que comprende la secuencia de nucleótidos del factor de coagulación XII humano o un fragmento del mismo, que presenta una mutación en una posición correspondiente a la posición 6.927 del nº de acceso de GenBank AF 538691, en el que la C natural se sustituye por una A o por una G. Esta secuencia puede presentar, por ejemplo, 5' y 3' respecto a la secuencia de nucleótidos del factor de coagulación XII humano, secuencias foráneas. Además, por ejemplo regiones intrónicas pueden, por ejemplo, mutarse o sustituirse por una secuencia de ácidos nucleicos foránea.

Dicha molécula presenta una longitud de por lo menos 30, 50, 100, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000 y 6.000. Preferentemente, la longitud máxima de dicha molécula de ácidos nucleicos es de hasta 30, 50, 100, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000, 6.000 o hasta 20.000 nucleótidos o bases. Además, la molécula de ácidos nucleicos puede ser una molécula de ácidos nucleicos de cadena sencilla o de doble cadena.

El término "fragmento tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una parte del gen del factor de coagulación XII humano. Dicho fragmento comprendido en la molécula de ácidos nucleicos de la presente invención puede presentar una longitud de por lo menos 30, 50, 100, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000 o 6.000. Preferentemente, la longitud máxima de dicho fragmento es de hasta 30, 50, 100, 1.000, 2.000, 3.000, 4.000, 5.000 o 6.000 nucleótidos o bases. Además, la molécula de ácidos nucleicos puede ser una molécula de ácidos nucleicos de cadena sencilla o de doble cadena.

La expresión "molécula de ácidos nucleicos" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a ADN o ARN, incluyendo ADNc, ARNhp, ARNm, ARN no procesado, procesado o parcialmente procesado y ADN genómico.

Además, la presente invención se refiere además a un oligonucleótido que contiene por lo menos 17 nucleótidos de (a) la secuencia de nucleótidos mutante de la presente invención, que comprende la posición 6.927, en la que el oligonucleótido contiene un nucleótido correspondiente a la posición mutante 6.927, o (b) la secuencia complementaria de (a). El término "oligonucleótido" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una molécula de ácidos nucleicos útil, por ejemplo, como cebador para reacciones de PCR o como sonda para la detección específica de la mutación de la presente invención. Dicho oligonucleótido puede presentar una longitud de por lo menos 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos. Preferentemente, la longitud máxima de dicho oligonucleótido es de hasta 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 50 o 100 nucleótidos de longitud. Sin embargo, también oligonucleótidos de mayor tamaño se encuentran comprendidos dentro de la presente invención. El oligonucleótido puede estar compuesto de bases de ácido ribonucleico o bases de ácido desoxirribonucleico. Estos pueden ser mixtos y/o modificados.

La presente invención se refiere además a un (poli)péptido o un fragmento del mismo, codificado por la molécula de ácidos nucleicos de la presente invención. Este (poli)péptido contiene un residuo aminoácido básico o cargado positivamente en la posición correspondiente a la posición 309 de la secuencia de aminoácidos del factor de coagulación XII humano. Preferentemente, dicho residuo aminoácido es una lisina, una arginina o una histidina.

Se describe además un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para el (poli)péptido de la presente invención. Este anticuerpo es un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo que contiene la posición mutante 309. Sin embargo, también resulta concebible que la mutación pueda inducir un cambio conformacional en el (poli)péptido factor de coagulación XII, generando de esta manera nuevos epítopos fuera de dicha región que puedan permitir la unión específica al (poli)péptido mutante pero no al (poli)péptido factor de coagulación natural. Preferentemente, dicho anticuerpo es capaz de discriminar entre el factor de coagulación XII natural con respecto a la posición 309 y el mutante que presenta un residuo aminoácido básico o cargado positivamente en dicha posición. El anticuerpo puede ser cualquier anticuerpo tal como se define en la presente memoria, incluyendo un anticuerpo policlonal o monoclonal. El término anticuerpo incluye además fragmentos de anticuerpo tal como se indica en la presente memoria.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal.

Se describe además un hibridoma productor del anticuerpo monoclonal de la presente invención.

Finalmente, la presente invención se refiere además a la utilización de un kit para el diagnóstico del angioedema hereditario de tipo III o de una susceptibilidad o predisposición al mismo, comprendiendo dicho kit: (a) por lo menos

una molécula de ácidos nucleicos capaz de hibridarse bajo condiciones restrictivas a una molécula de ácidos nucleicos codificante del factor de coagulación XII, (b) un enzima de restricción capaz de discriminar entre el ácido nucleico natural y mutante asociado a enfermedad codificante del factor de coagulación XII, y/o (c) una pareja de cebadores complementarios de un ácido nucleico codificante de factor de coagulación XII asociado a enfermedad, (d) la molécula de ácidos nucleicos de la presente invención, y/o (e) el polipéptido de la presente invención, y/o el oligonucleótido de la presente invención, y opcionalmente instrucciones de utilización.

El mutante asociado a enfermedad afecta al residuo aminoácido 328 de la secuencia SEC ID nº 2.

En otra forma de realización preferida (a) de la utilización de la presente invención de un kit es una pareja de cebadores capaz de amplificar el exón 9 del gen del factor de coagulación XII humano o una parte del mismo que comprende la posición mutante tal como se define en la presente invención o una sonda o pareja de sondas y opcionalmente instrucciones de utilización.

La molécula o moléculas de ácidos nucleicos de (a) pueden resultar adecuadas, por ejemplo, para la utilización como sondas o cebadores. El kit puede proporcionar además medios para la detección de una reacción, por ejemplo, medios de detección de marcaje de nucleótido, anticuerpos secundarios marcados o medios de detección por tamaño. Los diversos compuestos del kit pueden envasarse en uno o más recipientes, opcionalmente disueltos en tampón adecuado para el almacenamiento.

Leyendas de las figuras

Figura 1: secuencia de ARNm de referencia del factor de coagulación XII humano tal como se proporciona en el número de acceso de GenBank NM_000505, conjuntamente con la secuencia de aminoácidos en la posición mutante. Se encuentra subrayado el nucleótido afectado por las dos mutaciones de nueva identificación.

Figura 2: secuencia genómica de referencia del gen del factor de coagulación XII tal como se proporciona en el número de acceso de GenBank AF538691. Se encuentran subrayadas las posiciones variables observadas en los pacientes estudiados y conocidos de la literatura; se encuentra señalada una variación adicional de nueva observación en dos pacientes del presente estudio, en *negrita/cursiva*.

Figura 3: estructura del gen del factor de coagulación XII humano; la flecha indica la posiciones de las mutaciones sin sentido en el exón 9.

Figura 4: diagrama del pedigrí que ilustra la transmisión de la enfermedad a través de un macho no afectado clínicamente.

Los Ejemplos ilustran la invención:

Ejemplo 1: diseño de cebador oligonucleótido para la amplificación y secuenciación del gen del factor de coagulación XII

Se diseñaron parejas de cebadores oligonucleótidos para amplificar el gen completo del factor de coagulación XII humano, incluyendo secuencias flanqueantes. La Tabla 1 presenta las secuencias correspondientes de dichos cebadores.

Tabla 1: secuencias de cebador oligonucleótido (F=directo, R=inverso)

ID de cebador	Secuencia del cebador
F12-Ex1-F	5'-aggaagtgctccactggctt-3'
F12-Ex1-R	5'-tgacagagatttctccaagacc-3'
F12-Ex2-F	5'-ctatgtggaagggtgaggccag-3'
F12-Ex2-R	5'-ctcaaggatcacacagctcacg-3'
F12-Ex3-4-F	5'-tgagggtctgtcctttcctga-3'
F12-Ex3-4-R	5'-ggtgtgtgggtctggtgatac-3'
F12-Ex5-6-F	5'-gtaggttcaagaagggccttg-3'
F12-Ex5-6-R	5'-gagctcctccccggcac-3'
F12-Ex7-F	5'-gagcagatggttgggaacg-3'
F12-Ex7-R	5'-tgaggagaaagggggtc-3'
F12-Ex8-F	5'-ggtctggggcaagcagaag-3'
F12-Ex8-R	5'-tgtagccacacgacggg-3'
F12-Ex9-F	5'-GAACGTGACTGCCGAGCAAG-3'
F12-Ex9-R	5'-aggagcaggggctgaggac-3'
F12-Ex10-F	5'-gaaggaggagccgagaggg-3'
F12-Ex10-R	5'-ggtaggggagaggcagcg-3'

ID de cebador	Secuencia del cebador
F12-Ex11-12-F	5'-aggaaagctggaacacgggatt-3'
F12-Ex11-12-R	5'-ataccaagctcgcggtctct-3'
F12-Ex13-F	5'-cccattcaaatcctggctttc-3'
F12-Ex13-R	5'-AATCACCTGGGTCGGAAAC-3'
F12-Ex14-F	5'-GTGCCAGGTGAGCTCTTAGCC-3'
F12-Ex14-R	5'-cctgttctctgagagctgtgga-3'
F12-Intr2-pt1-F	5'-tgtatggtgcagtggtgcagt-3'
F12-Intr2-pt1-R	5'-ggcatgtaggtaatttagtctggaa-3'
F12-Intr2-pt2-F	5'-ccttttagatgaagggtacctgcc-3'
F12-Intr2-pt2-R	5'-gagaaactttgggtgtgggt-3'
F12-Intr2-pt3-F	5'-ctgacttgggggtgagct-3'
F12-Intr2-pt3-R	5'-tgccactattttcaaggca-3'
F12-Intr2-pt4-F	5'-ccattgcatctaaaggtccatc-3'
F12-Intr2-pt4-R	5'-tcacacttggctttgctgg-3'
F12-Intr2-pt5-F	5'-acacacgcttctccctaagg-3'
F12-Intr2-pt5-R	5'-ggagtagactcctgactccaca-3'
F12-Intr2-pt6-F	5'-agtattattaagtgctactttgtggc-3'
F12-Intr2-pt6-R	5-CAGTGAGAActgcagggacaac-3'
F12-Intr4-F	5'-gaggggactgtgataggcag-3'
F12-Intr4-R	5'-ACACAGGTCCCTCCTTTCTGG-3'
F12-Intr12-F	5'-AGACCACGCTCTGCCAGGT-3'
F12-Intr12-R	5'-gtaaaccactcatgccctcc-3'
F12-P(-1)-F	5'-cgtcttctctcatgtccagc-3'
F12-P(-1)-R	5'-actggccaaaggcttggaaat-3'
F12-P(-2)-F	5'-cacagcatcttccatcctcc-3'
F12-P(-2)-R	5'-atctggggccatcttagcatt-3'
F12-P(-3)-F	5'-gtgcctcacaacacagtggt-3'
F12-P(-3)-R	5'-cacattgatgacaccttgcac-3'
F12-P(-4)-F	5'-tgtgcctagccataactgacca-3'
F12-P(-4)-R	5'-tggactccaagcccaggt-3'
F12-P(-5)-F	5'-gtcacgtcaatgacttgaacc-3'
F12-P(-5)-R	5'-cgacattgagaactagtactgatgg-3'
F12-3'UTR-pt1-F	5'-TCAATAAAGTGCTTTGAAAATGCTGA-3'
F12-3'UTR-pt1-R	5'-tagagacgggttcatcgtgt-3'
F12-3'UTR-pt2-F	5'-gaaatacttagcattggccggg-3'
F12-3'UTR-pt2-R	5'-aaccattcaaccccagattgt-3'
F12-Ex9-seqint1-R	5'-ccccacttctaacctccc-3'
F12-P(-1)-S2-R	5'-tttgagacggagtctcgt-3'
F12-Ex9-ARMS-Mt1-F	5'-cgccgaagcctcagccca-3'
F12-Ex9-ARMS-Mt1-R	5'-gcccgtcatcgaagacagact-3'
F12-Ex9-RFLP-Mt2-F	5'-cccgggtgccctaggcttc-3'
F12-Ex9-RFLP-Mt2-R	5'-ctgccggcgcagaaactgt-3'
F12-Intr10-RFLP-Mt3-F	5'-aagcgggaactgggact-3'
F12-Intr10-RFLP-Mt3-R	5'-gctgaacgtaaggcgacaggag-3'

Ejemplo 2: amplificación del gen del factor de coagulación XII y secuenciación directa de los productos de PCR

- 5 Se amplificaron 50 a 100 ng de ADN genómico mediante PCR en un volumen total de reacción de 50 µl que contenía MgCl₂ 2,5 mM, 200 µM de cada uno de dATP, dCTP, dGTP y dTTP, 5 µl de un tampón de PCR 10x (de Invitrogen o de Applied Biosystems), 50 pmoles de cada cebador oligonucleótido y 1,25 unidades de ADN polimerasa Taq. Ocasionalmente, debió optimizarse el tampón mediante la adición de reactivos desnaturalizantes tales como DMSO y glicerol u otros compuestos o composiciones que es conocido que mejoran la eficiencia y
- 10 especificidad de la amplificación.

En general, las reacciones se termociclaron con una etapa inicial de desnaturalización de 95°C/5 min. [10 min. al utilizar la ADN polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems)] seguido de 35 ciclos de 94°C/40 s; T_{hibridación}/40 s; 72°C/45 s. Para los amplímeros 20 y 29 se seleccionaron subperiodos de cada ciclo de 60 s/60 s/120 s. Una etapa

15 final de elongación de 72°C/10 min. completó la amplificación. Las temperaturas de hibridación para las parejas específicas de cebadores y los tamaños de los amplímeros se presentan en la tabla 2.

Se llevó a cabo la secuenciación directa de los productos de PCR siguiendo procedimientos estándares (utilizando condiciones de ciclado del terminador BigDye™, purificación de los productos reaccionados utilizando la

ES 2 570 505 T3

precipitación con etanol, secuenciador automático ABI 3730) conocidos por el experto en la materia (Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", ISBN: 0879695765, CSH Press, Cold Spring Harbor, 2001).

Tabla 2: tamaños de amplímero y temperaturas de hibridación

5

Amplímero	Pareja de cebadores	Tamaño (pb)	T _{hib.} (°C)
1	F12-Ex1-F y F12-Ex1-R	478	62°C
2	F12-Ex2-F y F12-Ex2-R	469	62°C
3	F12-Ex3-4-F y F12-Ex3-4-R	504	62°C
4	F12-Ex5-6-F y F12-Ex5-6-R	546	62°C
5	F12-Ex7-F y F12-Ex7-R	386	60°C
6	F12-Ex8-F y F12-Ex8-R	386	59°C
7	F12-Ex9-F y F12-Ex9-R	459	59°C
8	F12-Ex10-F y F12-Ex10-R	550	59°C
9	F12-Ex11-12-F y F12-Ex11-12-R	548	60°C
10	F12-Ex13-F y F12-Ex13-R	445	60°C
11	F12-Ex14-F y F12-Ex14-R	507	60°C
12	F12-Intr2-pt1-F y F12-Intr2-pt1-R	651	63°C
13	F12-Intr2-pt2-F y F12-Intr2-pt2-R	557	63°C
14	F12-Intr2-pt3-F y F12-Intr2-pt3-R	598	60°C
15	F12-Intr2-pt4-F y F12-Intr2-pt4-R	548	57°C
16	F12-Intr2-pt5-F y F12-Intr2-pt5-R	540	63°C
17	F12-Intr2-pt6-F y F12-Intr2-pt6-R	584	57°C
18	F12-Intr4-F y F12-Intr4-R	489	59°C
19	F12-Intr12-F y F12-Intr12-R	518	59°C
20	F12-P(-1)-F y F12-P(-1)-R	1.275	64°C
21	F12-P(-2)-F y F12-P(-2)-R	547	62°C
22	F12-P(-3)-F y F12-P(-3)-R	642	60°C
23	F12-P(-4)-F y F12-P(-4)-R	442	60°C
24	F12-P(-5)-F y F12-P(-5)-R	655	60°C
25	F12-3'UTR-pt1-F y F12-3'UTR-pt1-R	559	58°C
26	F12-3'UTR-pt2-F y F12-3'UTR-pt2-R	559	59°C
27	F12-Ex9-ARMS-Mt1-F y F12-Ex9-ARMS-Mt1-R	257	63°C
28	F12-Ex9-RFLP-Mt2-F y F12-Ex9-RFLP-Mt2-R	390	64°C
29	F12-Intr10-RFLP-Mt3-F y F12-Intr10-RFLP-Mt3-R	1.204	60°C

Ejemplo 3: secuenciación del gen del factor de coagulación XII en pacientes no relacionados con angioedema hereditario de tipo III

5 Inicialmente se estudiaron veinte pacientes no relacionados en los que se había diagnosticado angioedema hereditario de tipo III. Todos los pacientes (así como miembros de la familia estudiados después, ver a continuación) habían proporcionado su consentimiento informado. Todos estos pacientes habían experimentado ataques recurrentes de angioedema; en todos los pacientes, los ensayos inmunoquímicos, así como los funcionales del inhibidor del complemento C1, habían mostrado valores normales. Todos presentaban una historia familiar positiva (por lo menos un familiar había experimentado ataques de angioedema). Todos eran mujeres y de raza caucásica.

10 En dichos 20 pacientes, se amplificó y secuenció la totalidad de los 14 exones (con secuencias intrónicas flanqueantes) del gen del factor de coagulación XII. Se estudió aproximadamente 1 kb de secuencia del promotor en 18 de dichos pacientes.

15 En comparación con los datos informados anteriormente, se identificaron por primera vez dos mutaciones sin sentido ('mutación 1' y 'mutación 2').

20 Ambas mutaciones sin sentido se encontraban localizadas en el exón 9 del gen del factor de coagulación XII, más concretamente ambas se localizaban en exactamente la misma posición, es decir la segunda posición del codón codificante del residuo aminoácido 309 de la proteína madura (correspondiente al residuo aminoácido 328 en la numeración del producto de traducción primario [por ejemplo nº de acc. de Swissprot P00748]).

25 La secuencia natural de dicho codón es ACG (codificante de un residuo de treonina). La 'mutación 1' es una sustitución C→A (1032C→A; numeración según el nº de acceso de GenBank NM_000505) que resulta en un triplete AAG codificante de un residuo de lisina.

30 La 'mutación 2' es una sustitución C→G (1032C→G) que resulta en un triplete AGG codificante de un residuo de arginina.

De esta manera, con respecto a ambas mutaciones, el residuo de treonina natural es sustituido por un residuo aminoácido básico. Ambas sustituciones son transversiones.

35 Ambas sustituciones pueden alterar el patrón putativo de O-glucosilación en dicha región (McMullen y Fujikawa, J. Biol. Chem. 260:5328-5341, 1985; O'Connell *et al.*, BBRC 180:1024-1030, 1991). Es conocido que la glucosilación afecta al plegamiento, localización y tráfico de las proteínas, a la solubilidad de las proteínas, a la antigenicidad, a la actividad biológica y a la vida media, así como a las interacciones célula-célula. Resulta importante que en la proteína natural (según, por ejemplo, OglycBase 6.00 (<http://www.cbs.dtu.dk/databases/OGLYCBASE/Oglyc.base.html>), Thr309, así como Thr310 de la proteína madura (correspondiente a Thr328 y Thr329 del nº de acc. P00748) se predice que están glucosiladas y la mutación sin sentido de Thr309 también podría afectar a la glucosilación de Thr310 (O'Connell *et al.*, BBRC 180:1024-1030, 1991).

45 En todos los casos, los pacientes eran heterocigóticos para la mutación, según un patrón de herencia dominante de la enfermedad.

La mutación Thr309Lys ('mutación 1': 1032C→A) se observó en cinco de los 20 pacientes no relacionados.

50 La mutación Thr309Arg ('mutación 2': 1032C→G) se observó en uno de los 20 pacientes no relacionados.

A continuación, se examinaron selectivamente con respecto a su secuencia del exón 9, seis pacientes no relacionados adicionales en los que se había diagnosticado AEH de tipo III. Dos de estos seis pacientes eran heterocigóticos para la mutación Thr309Lys ('mutación 1': 1032C→A). De esta manera, el 31% (8/26) de los pacientes no relacionados que se estudiaron eran heterocigóticos para una mutación sin sentido que afectaba al residuo Thr309. Considerando que entre los 61 controles sanos no se observó ningún portador individual de dicha mutación (ver posteriormente), estos datos son altamente significativos (prueba exacta de Fisher para la comparación de 26 pacientes con los 61 controles secuenciados: $p=0,000027$).

60 Dos de los 20 pacientes estudiados inicialmente revelaron una sustitución de nucleótido (g.7418C>T) en el intrón 10 que no había sido observada anteriormente durante el curso de estudios en un número considerable de individuos (normales) (<http://pga.gs.washington.edu/>; documento nº WO 01/79228). En la posición 7418 de la secuencia genómica de referencia (nº de acc. de GenBank AF 538691), estos dos pacientes eran Y heterocigóticos (C/T), mientras que la secuencia natural era C. Ambos pacientes eran simultáneamente heterocigóticos para una mutación sin sentido del codón 309 (un paciente 1032C→A y el otro paciente 1032C→G). Para el segundo paciente se pudo demostrar mediante estudios familiares que el alelo que portaba la mutación sin sentido (1032C→G) era g.7418C; la hija afectada de dicho paciente heredó la mutación sin sentido, pero no el alelo g.7418T. Aunque en esta situación no

se produce cosegregación de la enfermedad y el alelo g.7418T, actualmente no puede excluirse una relación entre esta variación rara y la enfermedad. La secuencia del intrón 10, incluyendo la posición variable g.7418C>T, finalmente puede encontrarse contenida en determinados transcritos del gen del factor de coagulación XII (ver, por ejemplo, nº de acc. de GenBank CR616520 y CR601747).

5 En el presente estudio también se observaron algunas variaciones de secuencia comunes, conocidas de la literatura y/o de bases de datos de PNU (algunos de ellos, por ejemplo, observados entre los 23 individuos normales en el proyecto de secuenciación Seattle, ver anteriormente):

- 10 • var(1627) (g.1627C>T con respecto a la secuencia genómica de referencia AF 538691; 46C>T con respecto a la secuencia de ARNm de referencia NM_000505) en el exón 1 (amplímero 1);
- var(6570) (g.6570C>T, 760C>T) en el exón 8 (amplímero 6);
- 15 • un polimorfismo de inserción/delección de mononucleótido en el intrón 9 [g.6981delG] con respecto a la secuencia genómica de referencia AF 538691], que resulta en una longitud variable (8g/9g) de una repetición de mononucleótido (g) (amplímero 7); var (7040) (g.7040C>T) en el intrón 9 (amplímero 7, así como en el amplímero 8);
- 20 • var(7532) (g.7532T>C) en el intrón 10 (amplímero 9);
- var(640) (g.640A>G) en la región del promotor (amplímero 20);
- var(654) (g.654C>T) en la región del promotor (amplímero 20);
- 25 • var(668) (g.668A>C) en la región del promotor (amplímero 20).

Ejemplo 4: estudios familiares

30 Con respecto a cuatro de los pacientes portadores de una mutación sin sentido del residuo Thr309, se estudió la familia extendida. Tres de las cuatro familias segregaron la mutación Thr309Lys; la cuarta familia segregó la mutación Thr309Arg. En total diez pacientes (todas mujeres) resultaron afectados por síntomas de angioedema en estas cuatro familias.

35 Se produjo una cosegregación completa entre enfermedad y presencia de la mutación sin sentido (respectiva): los diez individuos afectados por síntomas de angioedema eran heterocigóticos para la mutación Thr309Lys o la mutación Thr309Arg, respectivamente.

40 El examen de la secuencia del exón 9 en un total de 37 miembros de dichas cuatro familias reveló, además de los individuos clínicamente afectados, varios portadores de mutación adicionales que eran aparentemente asintomáticos en la actualidad (la mayoría hombres, aunque en una familia también dos mujeres); esta observación concuerda completamente con la penetrancia incompleta de la enfermedad y la preferencia de afectación del sexo femenino. Notablemente, el historial médico detallado reveló que por lo menos dos hombres que portaban la mutación Thr309Lys presentaban antecedentes durante una década de ataques de dolor abdominal inexplicado, concordando perfectamente con el diagnóstico de enfermedad angioedema monosintomática (gastrointestinal).

Entre los portadores de mutación asintomáticos también se identificaron dos hombres que se concluyó a partir del diagrama del pedigrí que debían haber transmitido la enfermedad (ver, por ejemplo, la figura 4, un pedigrí que ilustra la transmisión de la enfermedad a través de un portador masculino asintomático).

50 Datos haplotípicos

En algunos de los pacientes no emparentados, pudo establecerse la fase de ligamiento entre la mutación sin sentido (heterocigótica) del residuo Thr309 y posiciones variables adicionales (en algunos casos con ayuda de análisis de segregación). Por ejemplo, se concluyó que la mutación 1032C→G se produce en un haplotipo g.1627C - g.6981delG - g.7040C - g.7532T. Además, la mutación 1032C→A aparentemente está asociada a dicho haplotipo.

Ejemplo 5: estudios en individuos de control sanos

60 En 61 individuos de control sanos (donantes de sangre), se amplificó y secuenció el fragmento de exón 9 (amplión 7, tabla 2) del gen del factor de coagulación XII. Con respecto a la secuencia exónica de este fragmento, y en particular respecto al codón 309 (de la proteína madura), la totalidad de dichos individuos de control eran aparentemente homocigóticos para la secuencia natural. En particular, ningún individuo de control mostró la mutación 1032C→A o la mutación 1032C→G.

65 De esta manera, con respecto a la presencia de una mutación sin sentido del codón 309, existe una diferencia

altamente significativa entre los pacientes y los controles sanos (prueba exacta de Fisher para la comparación de 26 pacientes con los 61 controles secuenciados: $p=0,000027$).

5 Se observaron dos variabilidades polimórficas intrónicas (conocidas) entre los individuos de control: un polimorfismo de inserción/delección de mononucleótido en el intrón 9 [g.6981delG con respecto a la secuencia genómica de referencia AF 538691], que resulta en una longitud variable de una repetición de mononucleótido (g) (alelo 8g: 0,54; alelo 9g: 0,46), y un polimorfismo de nucleótido único (g.7040C>T) al final del intrón 9 (=var(7040) en los datos 'Seattle's SNPs') (C: 0,55; T: 0,45, contados en 57 individuos). Pudieron diagnosticarse 57 individuos con respecto a
10 ambas variabilidades. Existía un completo desequilibrio de ligamiento entre el alelo 8g y g.7040C y entre el alelo 9g y g.7040T, respectivamente.

Además de los 61 individuos de control examinados mediante secuenciación del fragmento del exón 9, se estudiaron otros 35 individuos de control mediante un ensayo de RFLP específico (ver posteriormente) diseñado para la
15 detección de la mutación 1032C→G. Los resultados indicaron que la mutación 1032C→G no se encontraba presente en ninguno de dichos 35 individuos de control. De esta manera, en total ninguno de los 96 individuos de control portaba la mutación 1032C→G.

Ejemplo 6: detección específica de alelos mutantes. Ensayo de diseño para el genotipado

20 A. Ensayo de amplificación específica de alelo (ARMS) para la detección de la mutación 1032C→A (Thr309Lys)

Para la amplificación específica de la mutación 1032C→A, se diseñó la pareja de cebadores siguiente (ver también la tabla 1):

25 F12-Ex9-ARMS-MT1-F: 5'-cgccgaagcctcagcccaa-3'

F12-Ex9-ARMS-MT1-R: 5'-gcggtcatcgaagacagact-3'

30 El extremo 3' del cebador directo (subrayado) se encuentra situado en la posición mutante y, en este caso, la secuencia del cebador corresponde al alelo mutante (1032C→A); con respecto a la secuencia natural, la secuencia del cebador representa una no correspondencia (de manera que no resulta posible ninguna amplificación).

En presencia de la mutación 1032C→A (un alelo 1032C→A), dicha pareja de cebadores amplificará un fragmento de 256 pb de tamaño. Sin embargo, en el caso de que la mutación 1032C→A no se encuentre presente en la muestra a
35 estudio (en ausencia de la mutación), no se amplificará ningún producto.

Con el fin de proporcionar un control interno para la reacción de amplificación por PCR con éxito, se incluyó una segunda pareja de cebadores (F12-Ex11-12-F/F12-Ex11-12-R, ver la tabla 1) en la mezcla de reacción, resultando
40 en un fragmento constante de 548 pb de tamaño.

El ensayo se validó en aproximadamente 90 muestras de las que se había secuenciado previamente el fragmento del exón 9 (estas muestras incluían 15 muestras heterocigóticas para la mutación 1032C→A). Se observó una concordancia completa entre los resultados de la secuenciación y el resultado del ensayo ARMS.

45 Debe indicarse que, para excluir la posibilidad remota de aparición homocigótica de la mutación 1032C→A, puede resultar necesario secuenciar aquellas muestras que son positivas en el ensayo o llevar a cabo adicionalmente en dichas muestras un procedimiento similar específico para el alelo natural.

50 B. Ensayo RFLP (polimorfismo de longitudes de fragmentos de restricción) para la detección de la mutación Thr309Arg (1032C→G)

La mutación 1032C→G crea un nuevo sitio de restricción para la endonucleasa de restricción BstN I (secuencia de reconocimiento: cc↓wgg).

55 Se diseñó una pareja de cebadores (ver también la tabla 1) de manera que el producto amplificado contuviese un sitio BstN I constante, además del sitio variable dependiente de la mutación:

F12-Ex9-RFLP-Mt2-F: 5'-cccgggtgcccttaggcttc-3'

60 F12-Ex9-RFLP-Mt2-R: 5'-ctgccggcgagaaactgt-3'

Las condiciones de la PCR fueron las utilizadas para el amplímero del exón 9, excepto en que se utilizó una temperatura de hibridación de 64°C (Tabla 2).

65 El producto no digerido presentaba un tamaño de 390 pb. La presencia de un sitio de restricción BstN I constante en el fragmento amplificado proporciona un control conveniente de la digestión interna. La división en este sitio BstN I

constante produjo en todos los individuos un fragmento de 143 pb de tamaño. A continuación, dependiendo de la ausencia o presencia de la mutación 1032C→C, se produjo un fragmento de 247 pb (alelo natural) o dos fragmentos de 67 pb y 180 pb (alelo 1032C→G).

- 5 C. Ensayo RFLP (polimorfismo de longitudes de fragmentos de restricción) para la detección de la mutación g.7418C>T en el intrón 10

La mutación g.7418C>T en el intrón 10 del gen del factor de coagulación XII crea un nuevo sitio de restricción Nla III (secuencia de reconocimiento: CATG↓).

- 10 Se diseñó una pareja de cebadores (F12-Intr10-RFLP-Mt3-F, F12-Intr10-RFLP-Mt3-R; ver la tabla 1) de manera que el producto amplificado contuviese un sitio Nla III constante, además del sitio variable dependiente de la mutación.

- 15 El producto no digerido presentaba un tamaño de 1.203 pb. La presencia de dos sitios de restricción Nla III constantes en el fragmento amplificado proporciona un control conveniente de la digestión interna. La división en estos sitios Nla III constante produjo en todos los individuos un fragmento de 262 pb de tamaño (a parte de un segundo fragmento constante de 11 pb). A continuación, dependiendo de la ausencia o presencia de la mutación g.7418C>T, se produjo un fragmento de 930 pb (alelo natural) o dos fragmentos de 526 pb y 404 pb (alelo g.7418C>T).

20 **Listado de secuencias**

- <110> Dewald, Georg
- 25 <120> Angioedema hereditario de tipo III
- <130> G 3152 PCT
- <150> 04 01 1790.5
- 30 <151> 2004-05-18
- <160> 5
- <170> PatentIn versión 3.1
- 35 <210> 1
- <211> 2048
- <212> ARN
- <213> Homo sapiens
- 40 <220>
- <221> misc_feature
- <223> /nota="producto de traducción tal como se proporciona en el nº de acceso de GenBank NM_000505.2"
- 45 <400> 1

```

cuauugaucu ggacuccugg auaggcagcu ggaccaacgg acggacgcca ugagggcucu      60
gcugcuccug ggguuccugc uggugagcuu ggagucaaca cuuucgauuc caccuuggga      120
agcccccaag gagcauaagu acaaagcuga agagcacaca gucguucuca cugucaccgg      180
ggagcccugc cacuuccccu uccaguacca ccggcagcug uaccacaaau guaccacaaa      240
gggccggcca ggcccucagc ccuggugugc uaccaccccc aacuuugauc aggaccagcg      300
augggggauc uguuuggagc ccaagaaagu gaaagaccac ugcagcaaac acagccccug      360
ccagaaagga gggaccugug ugaacaugcc aagcggcccc cacugucucu guccacaaca      420
    
```

ES 2 570 505 T3

```

ccucacugga aaccacugcc agaaagagaa gugcuuugag ccucagcuuc uccgguuuuu 480
ccacaagaau gagauauggu auagaacuga gcaagcagcu guggccagau gccagugcaa 540
ggguccugau gcccacugcc agcggcuggc cagccaggcc ugccgcacca acccgugccu 600
ccaugggggu cgcugccuag agguggaggg ccaccgccug ugccacugcc cggugggcua 660
caccggaccc uucugcgacg uggacaccaa ggcaagcugc uaugauggcc gcgggcucag 720
cuaccgcggc cuggccagga ccacgcucuc gggugcgccc ugucagccgu gggccucgga 780
ggccaccuac cggaacguga cugccgagca agcgcggaac uggggacugg gcggccacgc 840
cuucugccgg aaccgggaca acgacaucgg cccguggugc uucgugcuga accgcgaccg 900
gcugagcugg gaguacugcg accuggcaca gugccagacc ccaaccagg cggcgccucc 960
gaccccgug ucccuaggc uucaugucc acucaugccc gcgcagccgg caccgccgaa 1020
gccucagccc acgaccggga ccccgccuca gucccagacc cggggagccu ugccggcgaa 1080
gcgggagcag ccgccuucc ugaccaggaa cggcccacug agcugcgggc agcggcuccg 1140
caagagucug ucuucgauga cccgcgucgu uggcgggcug guggcgcuac gcggggcgca 1200
cccuacauc gccgcgug uacuggggcca caguuucugc gccggcagcc uaucgcccc 1260
cugcugggug cugacggccg cucacugccu gcaggaccgg cccgcacccg aggaucugac 1320
gguggugcuc ggccaggaac gccguaacca cagcugugag ccgugccaga cguuggccgu 1380
gcgcuccuac cgcuuacagc aggccuucuc gcccgucagc uaccagcacg accuggcucu 1440
guugcgccuu caggaggau gggacggcag cugcgcguc cugucgccuu acguucagcc 1500
ggugugccug ccaagcggcg ccgcgcgacc cuccgagacc acgcucugcc agguggccgg 1560
cugggggccac caguucgagg gggcggagga auaugccagc uuccugcagg aggcgcaggu 1620
accguuccuc ucccuggagc gcugcucagc cccggacgug cacggauccu ccauccucc 1680
cggcaugcuc ugccgagggg uccucgaggg cggcaccgau gcgugccagg gugauuccgg 1740
aggcccgcug gugugugagg accaagcugc agagcgcggg cucacccugc aaggcaucau 1800
cagcugggga ucgggcugug gugaccgcaa caagccaggc gucuacaccg auguggccua 1860
cuaccuggcc uggauccggg agcacaccgu uuccugauug cucagggacu caucuuccc 1920
uccuugguga uuccgcagug agagaguggc uggggcaugg aaggcaagau ugugucccau 1980
ucccccagug cggccagcuc cgcgccagga uggcgaggaa cucaauaaag ugcuuugaaa 2040
augcugag 2048

```

<210> 2
 <211> 615
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MISC_FEATURE

10 <223> /nota="producto de traducción tal como se proporciona en el nº de acceso de GenBank NM_000502.2; la longitud de 615 residuos corresponde a la suma de un péptido de señal de 19 residuos de longitud (-19 a -1) y una proteína madura de 596 residuos aminoácidos de longitud (1 a 596)"

<400> 2

ES 2 570 505 T3

Met Arg Ala Leu Leu Leu Leu Gly Phe Leu Leu Val Ser Leu Glu Ser
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Ile Pro Pro Trp Glu Ala Pro Lys Glu His Lys Tyr Lys
 20 25 30

Ala Glu Glu His Thr Val Val Leu Thr Val Thr Gly Glu Pro Cys His
 35 40 45

Phe Pro Phe Gln Tyr His Arg Gln Leu Tyr His Lys Cys Thr His Lys
 50 55 60

Gly Arg Pro Gly Pro Gln Pro Trp Cys Ala Thr Thr Pro Asn Phe Asp
 65 70 75 80

Gln Asp Gln Arg Trp Gly Tyr Cys Leu Glu Pro Lys Lys Val Lys Asp
 85 90 95

His Cys Ser Lys His Ser Pro Cys Gln Lys Gly Gly Thr Cys Val Asn
 100 105 110

Met Pro Ser Gly Pro His Cys Leu Cys Pro Gln His Leu Thr Gly Asn
 115 120 125

His Cys Gln Lys Glu Lys Cys Phe Glu Pro Gln Leu Leu Arg Phe Phe
 130 135 140

His Lys Asn Glu Ile Trp Tyr Arg Thr Glu Gln Ala Ala Val Ala Arg
 145 150 155 160

Cys Gln Cys Lys Gly Pro Asp Ala His Cys Gln Arg Leu Ala Ser Gln
 165 170 175

Ala Cys Arg Thr Asn Pro Cys Leu His Gly Gly Arg Cys Leu Glu Val
 180 185 190

ES 2 570 505 T3

Glu Gly His Arg Leu Cys His Cys Pro Val Gly Tyr Thr Gly Pro Phe
 195 200 205

Cys Asp Val Asp Thr Lys Ala Ser Cys Tyr Asp Gly Arg Gly Leu Ser
 210 215 220

Tyr Arg Gly Leu Ala Arg Thr Thr Leu Ser Gly Ala Pro Cys Gln Pro
 225 230 235 240

Trp Ala Ser Glu Ala Thr Tyr Arg Asn Val Thr Ala Glu Gln Ala Arg
 245 250 255

Asn Trp Gly Leu Gly Gly His Ala Phe Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp
 260 265 270

Ile Arg Pro Trp Cys Phe Val Leu Asn Arg Asp Arg Leu Ser Trp Glu
 275 280 285

Tyr Cys Asp Leu Ala Gln Cys Gln Thr Pro Thr Gln Ala Ala Pro Pro
 290 295 300

Thr Pro Val Ser Pro Arg Leu His Val Pro Leu Met Pro Ala Gln Pro
 305 310 315 320

Ala Pro Pro Lys Pro Gln Pro Thr Thr Arg Thr Pro Pro Gln Ser Gln
 325 330 335

Thr Pro Gly Ala Leu Pro Ala Lys Arg Glu Gln Pro Pro Ser Leu Thr
 340 345 350

Arg Asn Gly Pro Leu Ser Cys Gly Gln Arg Leu Arg Lys Ser Leu Ser
 355 360 365

Ser Met Thr Arg Val Val Gly Gly Leu Val Ala Leu Arg Gly Ala His
 370 375 380

Pro Tyr Ile Ala Ala Leu Tyr Trp Gly His Ser Phe Cys Ala Gly Ser
 385 390 395 400

Leu Ile Ala Pro Cys Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Gln Asp
 405 410 415

Arg Pro Ala Pro Glu Asp Leu Thr Val Val Leu Gly Gln Glu Arg Arg
 420 425 430

Asn His Ser Cys Glu Pro Cys Gln Thr Leu Ala Val Arg Ser Tyr Arg
 435 440 445

ES 2 570 505 T3

Leu His Glu Ala Phe Ser Pro Val Ser Tyr Gln His Asp Leu Ala Leu
 450 455 460

Leu Arg Leu Gln Glu Asp Ala Asp Gly Ser Cys Ala Leu Leu Ser Pro
 465 470 475 480

Tyr Val Gln Pro Val Cys Leu Pro Ser Gly Ala Ala Arg Pro Ser Glu
 485 490 495

Thr Thr Leu Cys Gln Val Ala Gly Trp Gly His Gln Phe Glu Gly Ala
 500 505 510

Glu Glu Tyr Ala Ser Phe Leu Gln Glu Ala Gln Val Pro Phe Leu Ser
 515 520 525

Leu Glu Arg Cys Ser Ala Pro Asp Val His Gly Ser Ser Ile Leu Pro
 530 535 540

Gly Met Leu Cys Ala Gly Phe Leu Glu Gly Gly Thr Asp Ala Cys Gln
 545 550 555 560

Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Asp Gln Ala Ala Glu Arg
 565 570 575

Arg Leu Thr Leu Gln Gly Ile Ile Ser Trp Gly Ser Gly Cys Gly Asp
 580 585 590

Arg Asn Lys Pro Gly Val Tyr Thr Asp Val Ala Tyr Tyr Leu Ala Trp
 595 600 605

Ile Arg Glu His Thr Val Ser
 610 615

<210> 3

<211> 10616

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

10 <223> /nota="producto de traducción tal como se proporciona en el nº de acceso de GenBank AF538691.1"

<400> 3

ES 2 570 505 T3

acatgctctg tgcttagtaa ccccagtgc acttttttgc tttcccaaaa gttctggcaa 60
 aagtccaag cttagcacttt aattggccta aattgtgtat atgettatct ctgaaccaat 120
 cactgtggat tagagatgtc atgctctgat tgaccagacc taggccacat ctctagccct 180
 agctctgagg gtagagtgg cagcactaga gcccatggaa gaagtaagag aggagtctt 240
 gctaaaggaa aatcaaaagt gtcattaccg aaccaggaca gatgctgggc agcacatgtg 300
 caccccgctc tcttctcatg ttccagetgc acatcttagt gcccttggg ttagcacttt 360
 tctcattaaa tcatttgctt tcttgctca ctctctgtgg ttggtagaat gctaagatgg 420
 cccaagatc tctaccctg gtgtttgcac acctcccagt tattctgtca aacatgaatg 480
 tagatgcttc tgtgaaagaa ttttgcacat gtaatttaag toccaaattg tttgacctta 540
 aaataaggag aatggcaggg ccaggcatgg tggctcatic ctgtaatccc agcactttgg 600
 gaggccaagg cgggcagatc acgaggctcag gagatcgaga ccatcctggc taacacagtg 660
 aaaccccatc tctactaaaa atacaaaaaa ttagctgggc gtgggtggcgg gtgcctgtat 720
 tcccagctac ccaggaggct gaggcaggag aatggcgtga acccgggagg cgtagtctgc 780
 agtgagccaa gatcgtgcca ctgcactcca gcctgggtga cagagccaga ctctgtctca 840
 aaaaaaaaaa aaaaaaggag aatggctttg gtgggcctga cctagtccagg tgagttctta 900
 aaaggcgaca catggcccgg tgcagtggct caggcctgta atcccagcac tttgggaggc 960
 cgaggcgggt ggatcacgag gtcaggagat cgagaccatc ctggctaaaca tgggtaaac 1020
 ccgtctctac taaaaagaca aaaaattagc tgggcgtggg ggtgggetcc tgtagtccca 1080
 gctactcggg aggctgagge aggagaatgg cgtgaaccog ggaggcggag cttgcagtga 1140
 ggggagattg cgcactgca ctccagcctg gggacagag cgagactccg tctcaaaaaa 1200
 aaaaaaaaaa aaaaaagaaa ttaaaagtgg gtattgttgt aagatgctga gtttatggta 1260
 gtttgttaca tgacaataga aatgaacac acttcacagt ggactccaag atccccatga 1320
 tctttgatct ccttaacctc ctgatctcca caggaccag agcataagaa tgtcccttct 1380
 tctgctcca gtcccactat ctagaaaaga gaggaggagc ccagctctc atttcacccc 1440
 caccacaaa ctccaactt tccggcctc aaggggtgac caaggaagt gctccacttg 1500
 gctttccaca aacagcctgt gcccaccag gctcaggagg gcagcttgac caatctctat 1560
 ttccaagacc tttggccagt cctattgatc tggactcctg gataggcagc tggaccaacg 1620
 gacggacgcc atgagggctc tgetgctcct ggggttcctg ctggtgagct tggagtcaac 1680
 actttcggtg agtctgtgg gaaccaggat tgtcccagga ttgttctggg ggtctgctat 1740
 cacagccatg agccatggcc tctgctcatg acctgtgggt ccaggtgact aggaggccta 1800
 tgtgaaagg tgaggccagc ccggaaggcc caggcagagg agacagaaa ccagactggg 1860
 tggatacaag ggcacagcct gcatttctg gggagatggg ccttaagaag acaacggggg 1920

ES 2 570 505 T3

gaggtagaaa gggtttgggt cttgggaaga aatctctgca tttctgggct gtgagaggaa 1980
gctgcagact agcaacagat cggtggcagg ctatgactta tagtcagttc cctgccttct 2040
tctctccctt gtagattcca ccttgggaag cccccaagga gcataagtac aaagctgaag 2100
agcacacagt cggtaagtgg cctggctcct cctcccggga acccttgggt ggggatgtgt 2160
atggtgcagt gtgtgcagtc tcagggcagt ctagtctagt gcctacctgg tgctaggtct 2220
tatgcccatg ggcaactagag tgatcgtgag ctgtgtgac cttgagggca gggatgaggc 2280
tgtgtctaag tgcccacgag cctggctcgg agcaggtgct tgagatatgt gctgctggcg 2340
ccatcacacc tgggtcctc cagccttcc tcagtttccc cagcttctcc ccttcttttc 2400
ctttcccag tacgtctcat gggcatcatt catgccacac agaggccagg gccttcaatg 2460
ggcaaggaag gatcaagagc ttgtctctgg catctgaatg cctctgaagc ccagctttat 2520
cacttatgag ctgggtgact ctgggagagg gatttgagtt ctccaagctt caatttcccc 2580
ttctgtgaaa ccaggttgat aacagtaaac ctcttagggt tgttgagaag ggaaacccat 2640
gtgaggtatt cagcccatca cctgggtgcat ggaaatgctt taaaaatatt agcttttatt 2700
atgaaactac cttttagatg aagggtacct gccatttccc ccttctcaa gctctgccat 2760
agctcccat tgccttcatt cttccagaca ctaaattacc tacatgccag gcatggtggc 2820
tcatgcctgt aatcccagca ctttgggagg ccaaggtcgg tggatcatga ggtcaggagt 2880
tcgagaccag cctggccaac atggtgaaat gctgtctcta ctaaaagtac aaaaattagc 2940
caggcatggt ggcattgccc agtagtccca gctactcggg aggctgaggc agaagaattg 3000
cttgaacctg ggaggtgaag gttgcagtga acgaagatca caccattgca ctccagcttg 3060
ggcaacacag caagactccg tctcaaaaaa aaaaaaaaaa tttacctaga gtgtggcaca 3120
tagcagggcc tgtgaaccag atggacctta ccttgggtggg cctgacttgg tggggttgag 3180
tctctaagca tggcgttgag gccagcaca ttccaaccct ggactccctc agcctcctct 3240
cttcaccca caccaaaag tttctcctct ctcttgctt acccaaactt ggtgccctat 3300
ccttgctaa tcccctgct aaggtecccc tectctctgt ccgtccatcc catctgcac 3360
ttttttttt tttgagatgg agtctcgtc tgtcccctag gctagagtgc aatggcgga 3420
tcttggctca ttgcaacctc cgctcctgg gttcaagcga ttctctgct cagcctccc 3480
agttgctggg attacaggca cacaacttca tgctcagcta atttttgtat tttttagtag 3540
agacagggtt tcaccatggt ggccaggctg gtctcgaact cctgccctca ggtggtccgc 3600
ccaccttagc ctccaaagt gctgggatta caggcgtgag ccaccgccc tggccccat 3660
ttgcatctta aaggtecatc tcagatccat ttccatttac tgtcctagtt ctggtttgg 3720
ccttggcaag tgcactttgc cttgaacaaa atagtggcaa aagcttattg agcaggtact 3780
ttgtgccaga cactgctcag catttcatgg cattatctca tgaagcccca cgacaattcc 3840

ES 2 570 505 T3

tctgaagaag acacaggcaa ttctcattat tcgcgatggt tatgttctat aaaatcacag 3900
tgaacattga actagcaaac agtattaggt tcctgtgagc ctctggtcac aacatthttca 3960
tcaaccaaca gcatataatc tggthttatg tatgattctg tthaaagaca thttatttag 4020
tatatgtgtt gctgattcat caatgctaag ctgatggcac tatagcacac acctgaatca 4080
agtgtctaac acacgctthc tccctaaggt agccttcttg tgcttaggaa ctacacagct 4140
cttcagcagg aggetcagag gccatttcca aaagccaaat cccagcaaa agcacaagt 4200
gtgaaaaacg ttgcactaag tagactgaga aggacactca thcaatagga gagctgaaac 4260
aagcagcagc agcgtgagc cttgtttgaa cthaaactggg aatgtgcaaa thtttactg 4320
ctctgtgcat gccacaaaat ggccatgaaa acatttcaag tattgacttg ggagttacaa 4380
ataaaattca gcaagtaggc acattctcaa tgtagaacca gagaagaatg aggatcaact 4440
gtactattat tactgocgtt ttacagataa ggaaaccaag gctcagatca gagtggthaa 4500
cagtgacttc aacattcaac aagtattatt aagtgcctac thtgtggcaa gtgctcttc 4560
tggccttggg actgaagact tacccaaggt cacacagcta gcaggttgtg gagtcaggag 4620
tctactccag ctatctgact cctgaacca agthththth ththththta agatggagt 4680
tcactctgtc acccaggctg gagtgagtg gcgcatctc ggctcactgc aagctccgc 4740
tcccgggttc acaccattct cctgcctcgg cctcccgagt agctgggact acaggcacct 4800
gccaccacc ccagctaatt thththtatt thtagtagag aggggtthc actgtattag 4860
ccaggatggt cttgatctcc tgacctgtg atctgccgc cttggcctcc caaagtgtg 4920
ggattacagg cttgagccac cgcgccggc cctgaacca actthtagag cagaaagtgt 4980
ththcaatga cagcgactt thtgagggtc tgtcctthc ctgaccagac cctgagggac 5040
agtgcctgag cagttgagta caggggaagt cctcagagag tgtgttctc ctgcagttct 5100
cactgtcacc ggggagcct gccacttccc cttccagtac caccggcagc tgtaccacaa 5160
atgtaccac aagggccgc cagccctca gccctggtaa gactacgcag aggagttgga 5220
gcaggggctt gggagacatg taccctgcct gtcctctgt ccaaggaact ctgcttgag 5280
agaggggact gtgataggc aggggtggcc aggccctgg gtagagcagg gaagcctgt 5340
ctctthctac aggtgtgcta ccaccccaa cthtgatcag gaccagcag ggggatactg 5400
thtgagccc aagaaagtga aaggtgtac acacagctc tgggtggcc tgggtctc 5460
tcctccgcct tcattactct cctggtatca ccagaccca cacactggg attctggacc 5520
cagcccttc tctccctcca caatacctt tggaaagcca gaggagagt tctgggaagg 5580
agtgttccca ththgcaggt gggtaacca agcttggaaa cthggagtag caaggtcaca 5640
aggcaagtag gthcaagaag ggccttggc cccagctgtg tgactcagct ccctgctct 5700
ccttccacca tgtccatctc tcagaccact gcagcaaca cagccctgc cagaaaggag 5760

ES 2 570 505 T3

ggacctgtgt gaacatgcca agcggccccc actgtctctg tccacaacac ctcaactggaa 5820
 accactgcca gaaaggtgag gagatgtgga ggacctgggc ggggtgctgg gggacagggg 5880
 caaccctggg cctacagaat aggttgctgg atactcggag acttggcatg gtcctagact 5940
 ctctgagac cactatccct ctttgtcccc agagaagtgc tttgagcctc agcttctccg 6000
 gtttttccac aagaatgaga tatggtatag aactgagcaa gcagctgtgg ccagatgcca 6060
 gtgcaagggg cctgatgccc actgccagcg gctggccagc cagggtgagc agatggttgg 6120
 gaacgggcca gggaggagcg tcagggaagc aggcctggcag gaggccgggt ggtgtgccgg 6180
 gaaggagagc tctctggggg ggtctttagg cccaggggtg gctcaactgc ttccctcccc 6240
 aagcctgccg caccaaccog tgcctccatg ggggtcgcct cctagagggt gagggccacc 6300
 gcctgtgcca ctgcccggg ggctacaccg gacccttctg cgacgtgggt gagtgagggt 6360
 ctggggcaag cagaaggcca gccccaggt gggacgggct tgccaggaag gaggaggag 6420
 agtgcggaaa gcagatgaga gggaggcagg agagcccagc cttggctgcc caggagagcc 6480
 cctttctcct cagacaccaa ggcaagctgc tatgatggcc gcgggctcag ctaccgaggc 6540
 ctggccagga ccacgctctc ggggtgcgcc tgtcagccgt gggcctcgga ggccacctac 6600
 cggaacgtga ctgcccagca agcgcggaac tggggactgg gcggccacgc cttctgccgg 6660
 tgcgccgctg ggggctgggt gaccctccg ccccagggct ccgggctccc ggcgctctaa 6720
 cggcggcccc tcgtgtggct acaggaaccg ggacaacgac atccgcccgt ggtgcttcgt 6780
 gctgaaccgc gaccggctga gctgggagta ctgcgacctg gcacagtgcc agaccccaac 6840
 ccaggcggcg cctccgacc cgggtgtccc taggcttcat gtcccactca tgcccgcgca 6900
 gccggcaccg ccgaagcctc agcccacgac ccggaaccog cctcagtccc agaccgccgg 6960
 aggttaggaa gtgggggggg gaaggaggag ccgagagggc gccggggcag ctagattccg 7020
 gccagccggc cgcgggctcc ccgtcctcag cccctgctcc tccacagcct tgccggcgaa 7080
 gccgggagcag cgcctctccc tgaccaggaa cggccactg agctgcgggc agcggctccg 7140
 caagagtctg tcttcgatga cccgcgtcgt tggcgggctg gtggcgctac gcggggcgca 7200
 cccctacatc gccgcgctgt actggggcca cagtttctgc gccggcagcc tcatcgcccc 7260
 ctgctgggtg ctgacggcgg ctcaactgct gcaggaccgg cgagtaccgg cccgcccaga 7320
 gccgccccag gggccgcggc tcctcgtct cccagcgcag cttccacgct gcaccogaac 7380
 ccgtgcccta ccttctccc ccccaccctt ctttccacgc ccctccggag ctcccgggga 7440
 ggaagctgga acacgggatt ggggttcggg agcagggggc tccccagaa cgcttgtggc 7500
 caggtctgag agcgtgcct ctcccctacc ctccccgcag gcccgcaccg gaggatctga 7560
 cggtggtgct cggccaggaa cgcgtaacc acagctgtga gccgtgccag acgttggccg 7620
 tgcgctccta ccgcttgca caggccttct cgcctcag ctaccagca cacctgggtg 7680

ES 2 570 505 T3

cgtgggggcg ccccgggggg acgggaagag agcttggggc cccggcgctc ccgcctcagc 7740
 ctctctccg cccgggtag ctctgttgcg ccttcaggag gatgcggacg gcagctgcgc 7800
 gctctgtcg ccttacgttc agccgggtgtg cctgccaaagc ggcgcgcgcg gaccctccga 7860
 gaccacgctc tgccaggtag ccggctgggg ccaccagttc gagggtaggc acaactgcta 7920
 ggggcagggg taggggagga gacctttgat cactgggtta ggcggaagaa gcccgcgact 7980
 ttggtatcgt tccgggtgcc tacagaatgg gtggcgctga cctgatgggt tgtgagaatg 8040
 tgtaggtgaa tcccaggtag aatcccaggg cctgggattc actgctggga tccccaaatc 8100
 tcttgggat acagggagaa tcgaacttgc tcttgggtcc ctctgggcgc cgggctgcaa 8160
 aggccaaacta ggacgctggc cccgcgctcc gggctagtgt gggagccagg ttctgcgact 8220
 ctggatgggt ggtgggggag gggtttctgt ttccgctccg cccattcaaa tectggcttt 8280
 tctctggacc tcagcctcct tgccatgaa attgaattaa tggcacctcc tccccttcgg 8340
 gcttgctcg agagaggaag ggcattgagt ggtttacaag cgctggagc agctttgtcc 8400
 atcgtccggg cggcaagcgt tgtcagatgg ggtgtgaaga aggcgctctg tgttcgagc 8460
 ggcggaggaa tatgccagct tctgcagga ggcgcaggta ccgttctct ccctggagcg 8520
 ctgctcagcc ccggacgtgc acggatcctc catcctcccc ggcattgctct gcgcagggtt 8580
 cctcgagggc ggcaccgatg cgtgccaggt gagctcttag cccggttggc gcccttcccc 8640
 gaggcgctca ggcacaaatc tcaggtccac agcgtgagc tgcgtgtttc cgaccaggg 8700
 tgattccgga ggcgcgctgg tgtgtgagga ccaagctgca gagcgccggc tcaccctgca 8760
 aggcattcct agctggggat cgggctgtgg tgaccgcaac aagccaggcg tctacaccga 8820
 tgtggctac tacctggcct ggatccggga gcacaccgtt tctgattgc tcagggactc 8880
 atctttccct ccttggtag tccgcagtga gagagtggct ggggcatgga aggcaagatt 8940
 gtgtccatt ccccagtc gccagctcc gcgccaggat ggcgcaggaa ctcaataaag 9000
 tgctttgaaa atgctgagaa ggaaagctct tttctctatg ggtcccgcg ggaaatgcca 9060
 agacagaaaa gcgattcaca gcttctccac agctctcaga gaacaaggtc tatgagatct 9120
 taacgtgcaa aatctagatg ccagcccagc taatgtttac tgagcctagg atactgtata 9180
 ccaagccctg tgcaaggaga agctgcatgt tattccttat gagaaactaa cttttgttt 9240
 acagagcagt agttctcaga ccatacatta agatcacttg gggagcgttt tgagccaatc 9300
 tatgcccaag ttccacctca gaccaattaa atcagtatgt ctagggatgg ggcattggta 9360
 gtggtatatt tgtaaaactc ccagataat tccatgtaca gccagggtg agaatcgtgg 9420
 ttagaaatac ttagcattgg cggggcggg tggtcacgc ctgtaatcct agcactttaa 9480
 gaggcgaagg caggtggatt gctcaggagt tcgaaaccag cctgggcaac acgatgaaac 9540
 cccgtctcta ctaaaataca agaaattagc cgggcacggc ggcgtgcgcc tgtagtccca 9600

ES 2 570 505 T3

```

gctactcagg aggetgagggc aggagaatca cttgaaccgg caggaaggaa ggaaggaagg 9660
aacagagggga gggaaagaga gagacagaaa gaaaagaaaa aagaaaatag aaaaaaagag 9720
cattgactgt ggcgtggacc ctaagggctg ggtgacatat cgttgtcccc accccaacac 9780
gcactagtgt agtgggtctg agagtccctt ggctagcagt accatcacca gggaacttgt 9840
tacacataac aaattctcgg gctacacttt atactgctga acagaaagtc tgggggtgggg 9900
cccagcaatc tgtttaacag ccttgccggg gattctgatg ttctctcatg cttagaacc 9960
acaatctggg ggttgaatgg ttggttccct tacaagttaa ggtctggctg tccagacaca 10020
acatcctttt ttcacaaaac cagcttttta aaattaataa tagattggcc agatgcggtg 10080
gttcacgcct gtaatctcgt cactttgaga ggctgaggcg ggaggattgt ttgagctcaa 10140
gacttctga cccgcctggg caacatagtg agacctcatc tcaaaaaaat ttttttaat 10200
taaaatttgt ttttctttt ttagagacgg ggcctcgtc tgtggctcag gctggcgtgc 10260
agcgacacga tectataata gtttactata atctcgctac tgagttcaag cgatccgccc 10320
gcctcggcct cccaaagcgc tgggattaca ggagtgagcc gctgcgctct gccaaacca 10380
tctacagga taacctaga actgcgacag cactaaacgc ccacgcccc cgtgccccag 10440
cctgggtggt cgtccggga cgggccttg tgtgacgtca cagccccgc cagcctgcct 10500
cacagcgccg caggccttc ccgctggcg cctctatatt tccccgagag gtgcgaggcg 10560
gctgggcgca ctgggagcgc gatgggcgac tgggaagtct acatcagtgc agtgc 10616

```

<210> 4

<211> 2420

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

10 <223> /nota="secuencia genómica cadena arriba extendida (se extiende desde la secuencia de cadena arriba proporcionada en AF538691.1), correspondiente a (obtenida de) UCSC Genome Browser/julio de 2003 secuencia de referencia humana/ >cr5:176819111-176821530 (complemento inverso)"

<400> 4

15

```

agccgggtgt ggtggtcac gcctgtaatt ccagcacttc gggaggccga ggtgggcaga 60
tcatgaggtc aggagttcga gaccaacctg gccaacatgg tgaagccctg gtcttacta 120
aggagacaaa aaattagccg ggcatggtgg cgtgggcctg taatggcagc tacttgggag 180
gctgaggcag gagaatcact tgaacctggg aggtggaggt tgtagtgagc cgagatcgca 240

```


ES 2 570 505 T3

ccatggcagt ccagtttggg cgacagcgcg agactccatc tcaaataaat aactaaataa 300
aaataataat aaagtaccct ttcaccacca cagctgggga ggggtgatca caaaatgaaa 360
ctgggagagg aagaggaagg gagatggatg ttgaacatcc aaatgaccat taatgtccac 420
ctgacacctc atctcacact cctacaagg caccttatgc tcaccacatt cccatttga 480
cacgctgcat tcaggcttct gtgcagttgt attactcact ctgcctgcaa acccctactt 540
gtggcgaaaga cctgttcaaa aggcccttc catgtagagg aacagctgcc ttctcccaa 600
gaggaaggag ccaatgtggg agtggcctta gggccagggt ctatactcag gagcaatcaa 660
gaactgacag agccaggcat ggtggcatgc acctgtaac ccagctattc aggaggatga 720
agcgagagga tcacttgccg ccagaagttc caggctagcc tgggcaactt aataagaccg 780
agtctctttg aaacaacaaa aaaggtgaca aaggtagttt cgctttaatg actcgtcaat 840
atatctaata gtttcacttt catcatggag ttaacagctg tcacgtcaat gactttgaaa 900
ccagttacct ttgaaaccag tggttgaaa ggtgccctc ctctcctgcc ctctctttc 960
tgtgtttctg ttccaagaag tctccacag cctgcctctc ttccagcaga attaataaat 1020
tgctacactc agtcttcaat tccataaat tactttgtat aacttaggac tttgtataac 1080
tgaaagtgac agaagtcac tcaaatgggt tttattggct catataactg agaagtctat 1140
ttttttttt tttggagata cagtctcagt ctgcttccca gactggagtg cagtggcaca 1200
atcacggctc acagcatlnt ggacctctgg gctcaagcaa tctctctgcc tcagactcac 1260
aagtagccgg aactacaggc acgcgccacc atgcctgget aatgttaaat ttttttgag 1320
agatgggatc tcactatggt gctacatca gtctggaact cctgggctca agtgatctc 1380
aagtgatccc cagcctccca gagtgttggg attacaggcg tgagccactg tgcctagcca 1440
taactgacca agtcttaagg atacttctag ttttaggatg taggctctca aagtcatgag 1500
aatcaatcc atcagtacta gttctcaaat gtogtgtaac aatcaccct aacttgtggc 1560
ttaagcaac aacatttaat gatgatttat cacagttct gatggtcagt tttgccttga 1620
ggtctttcat aagattgcaa gcaaagtgc agcgagggt gcagtatcca cttccaaggc 1680
agcttatca tgtggctgtc caattggcac tggctgtcag cagggtgctt tctttctcc 1740
ctacatgggc ttctctgcag gctgcatgt gtgtcctcac aacacagtgg ctggcttct 1800
ccagagtgag caacctaa gaacgggca gaaactgcaa tgtctttat gacctgggct 1860
tggaagtcca acacctcac ttctgccata ttttttttt tttgagacag tccctgtcgc 1920
ccaggctgga gtgcaatggc acaatctctg ctactacaa cctccacttc ctgggttcaa 1980
gcgattctcc tgcctcagcc tcacgggtag ctgggattac aggcacacgc cactacgcc 2040
ggctaatttt tgtatttttc atagagatgg ggtttggcca acacgttggc caggccggtc 2100
ttgaactcct gacctagagt gatctgcctg ccttggcatc ccaaagtgt gggattacag 2160
gtgtgagcca ccacaccag ccacttctgt catattctga tggacacaca gaacagccct 2220
aactcaatgt gggaaagacac catacaaggg catgaatcct aggtgctgag gatcaatggg 2280
ggctgtcttt gaggetgtct accacagcat ctttccatcc ttctgccct gtttgcctt 2340
cttttctat gtgtaggctt cattctcaaa caggccctcc ctagagagtg acaaagggtga 2400
tcatcaatgt gttcagacce 2420

ES 2 570 505 T3

<211> 1402
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5 <220>
 <221> misc_feature
 <223> /nota="Secuencia genómica cadena abajo extendida (que extiende la secuencia cadena abajo proporcionada en AF538691.1), correspondiente a (obtenida de) UCSC Genome Browser/julio de 2003 secuencia de referencia humana/ >cr5:176807094-176808495 (complemento inverso)"

10 <400> 5

```

gcgggaccag cgcacgcagc acgtggccat cgtgggcat ggggacaaca gctgctgtg      60
ggcttcgcgg cccggggggc tgctggcggc catctcgcgc caggaggtgg gcgtgctcac      120
ggggccggac aggcacacct tcctgcaggc gggcctgagc gtggggggcc gccgctgctg      180
cgtcatccgc gaccacctgc tggccgaggg tgacggcgtg ctggacgcac gcaccaaggg      240
gctggacgcg cgcgccgtgt gcgtgggccg tgcgccgcgc gcgctcctgg tgctaatggg      300
ccgacgcggc gtacatgggg gcatcctcaa caagacggtg cacgaactca tacgcgggct      360
gcgcatgcag gggcctagc cggccagcca ggccgcccac tggtagcgcg ggccaaataa      420
actgtgacct gggcgcggct ggctcctcct ccacttgcgc ggtgggggga gttgtaaata      480
aggaaactgg tctttgcaag acggttacct ggtggagccg ggattttgag tctagaggct      540
gccaggcccc tgtgccctac accctgctct cccatggacg ccttgcagag gctcctggcc      600
tgactgctgc tccttggcgc gttcccaggg tcctagggac tccgcagctg aggaagagtc      660
caagggtggg ggcttctcaa agtctgtttc agccttagcg tcctttctca gagatattcc      720
cacacattag gcaggacaag taaagggagc cccctcccca tcccgggaac acctctcccc      780
atcagggtgt caggctggag gccaatgtgc tcctcccccc tccactcata cctcaagcac      840
tagcaagtgt tgagtgggtg acaggatggg ctggtggct tgtaaagcag ttctggggct      900

cacaggcctc tgcatctctg cccacattcc tccaagggga gcctactgag agggctcatg      960
tccaagacca tcgcaattgg gtttgagacc ttacatcctg ccttcccag gccttcgaaa     1020
aggccccgca ggagtccctg gactagaggg aggaactctg gcatecctac ccgggagtct     1080
cactctgcag gcctcagttt cagggtgacc tatggaggag ggggaattga aaagcttggg     1140
taagtttgag gcctggttta ttgcccgaag atagtggaca aaagtgggag ggaggggtgc     1200
tggctcctgc cctccatgtg ctggggccca gggcatggcc tctettgccc acccccacce     1260
ttcccgctcc ctccccagc ggcctgatg gcagaccoca cctgtcactt attctggagc     1320
cctgatctta tcccagcagg aaggagtgat gtgtggctga ggtgggtgaa tttagagggc     1380
agagggagac cagaggaagt tc                                             1402
    
```

15

REIVINDICACIONES

1. Método de diagnóstico de angioedema hereditario de tipo III (AEH tipo III) o de una predisposición al mismo en un sujeto que se sospecha que ha desarrollado o que presenta una predisposición a desarrollar un angioedema hereditario de tipo III o en un sujeto que se sospecha que es portador de angioedema hereditario de tipo III, comprendiendo el método la determinación *in vitro* a partir de una muestra biológica de dicho sujeto de la presencia o ausencia de una mutación asociada a enfermedad en una molécula de ácidos nucleicos codificante del factor de coagulación XII, siendo la mutación una mutación (i) 6927C→A o una mutación 6927C→G de la secuencia natural de SEC ID nº 3, o (ii) afectando al residuo aminoácido 309 que corresponde al residuo aminoácido 328 de la secuencia ilustrada en SEC ID nº 2, en la que la presencia de dicha mutación es indicativa de un angioedema hereditario de tipo III o de una predisposición al mismo.
2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha determinación comprende hibridar bajo condiciones restrictivas con dicha molécula de ácidos nucleicos por lo menos una pareja de sondas de ácidos nucleicos, siendo la primera sonda de dicha pareja complementaria a la secuencia natural de dicha molécula de ácidos nucleicos y siendo la segunda sonda de dicha pareja complementaria a la secuencia mutante de dicha molécula de ácidos nucleicos, en la que una correspondencia perfecta, la presencia de hibridación estable, entre (i) la primera sonda de hibridación y la molécula de ácidos nucleicos diana, indica la presencia de una secuencia natural, e (ii) la segunda sonda de hibridación y la molécula de ácidos nucleicos diana, indica la presencia de una secuencia mutante, en el que la primera sonda de hibridación y la segunda sonda de hibridación permiten una detección diferencial.
3. Método según la reivindicación 1, comprendiendo dicho método la hibridación bajo condiciones restrictivas con dicha molécula de ácidos nucleicos de una sonda de hibridación específica para la secuencia mutante.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende una etapa de amplificación de ácidos nucleicos y/o de secuenciación de ácidos nucleicos.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el método es o comprende un método de discriminación alélica seleccionado de entre el grupo que consiste en hibridación específica de alelo, extensión de cebador específica de alelo que incluye la PCR específica de alelo, la ligadura de oligonucleótidos específica de alelo, la división específica de alelo de una sonda flap y/o la división específica de alelo que utiliza una endonucleasa de restricción.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende un método de detección seleccionado de entre el grupo que consiste en detección de fluorescencia, fluorescencia con resolución temporal, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), polarización de fluorescencia, métodos colorimétricos, espectrometría de masas, (quimio)luminiscencia, detección electroforética y métodos de detección eléctrica.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la sonda o la molécula de ácidos nucleicos del sujeto se une a un soporte sólido.
8. Método de diagnóstico del angioedema hereditario de tipo III (AEH III) o de una predisposición al mismo en un sujeto que se sospecha que ha desarrollado o que presenta una predisposición a desarrollar un angioedema hereditario de tipo III o en un sujeto que se sospecha que es portador de un angioedema hereditario de tipo III, comprendiendo el método la evaluación de la presencia y/o la cantidad de un factor de coagulación XII mutante asociado a enfermedad en dicho sujeto, e incluyendo las etapas de:
- (a) determinar a partir de una muestra biológica de dicho sujeto *in vitro*, la presencia y/o la cantidad de un (poli) péptido codificado por un gen de factor de coagulación XII mutante, afectando la mutación al residuo aminoácido 309, que corresponde al residuo aminoácido 328 de la secuencia representada en SEC ID nº 2;
 - (b) comparar dicha presencia y/o cantidad con la determinada a partir de una muestra de referencia; y
 - (c) diagnosticar, sobre la base de la diferencia entre las muestras comparadas en la etapa (b), el proceso patológico de un angioedema hereditario de tipo III o una predisposición al mismo
- en el que el mutante comprende una mutación que afecta al residuo aminoácido 309.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la muestra biológica consiste en, o se obtiene a partir de, pelo, piel, superficies mucosas, líquidos corporales, incluyendo sangre, plasma, suero, orina, saliva, esputo, lágrimas, líquido cerebroespinal, semen, líquido sinovial, líquido amniótico, leche, linfa, esputo pulmonar, secreción bronquial o heces.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho residuo aminoácido en la posición 309 se sustituye por un residuo aminoácido básico o cargado positivamente.

11. Método según la reivindicación 10, en el que dicho residuo aminoácido básico o cargado positivamente es una lisina o arginina.
- 5 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende el análisis *in vitro* de una muestra de un donante de sangre para determinar si la sangre de dicho donante o los componentes de la misma pueden utilizarse para la transfusión a un paciente que la requiera, en el que un análisis positivo indica una predisposición al angioedema hereditario de tipo III, que excluye la transfusión de sangre o los componentes de la misma procedentes de dicho donante.
- 10 13. Molécula de ácidos nucleicos que comprende la secuencia de nucleótidos del factor de coagulación XII humano o un fragmento de la misma que presenta por lo menos 30 nucleótidos, que presenta una mutación en una posición correspondiente a la posición 6.927 de SEC ID nº 3, en la que C natural se sustituye por una A o por una G.
- 15 14. Oligonucleótido que contiene por lo menos 17 nucleótidos de:
- (a) la secuencia de nucleótidos mutante según la reivindicación 13 que comprende la posición 6.927, en el que el oligonucleótido contiene un nucleótido correspondiente a la posición mutante 6.927; o
- (b) la secuencia complementaria de (a).
- 20 15. (Poli)péptido, codificado por la molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 13.
- 25 16. Utilización de un kit para el diagnóstico del angioedema hereditario de tipo III o de una susceptibilidad o predisposición al mismo, comprendiendo dicho kit:
- (a) por lo menos una molécula de ácidos nucleicos que puede hibridar bajo condiciones restrictivas con una molécula de ácidos nucleicos que codifica un factor de coagulación XII mutante;
- 30 (b) un enzima de restricción que puede discriminar entre un ácido nucleico que codifica el factor de coagulación XII natural y un factor de coagulación XII mutante asociado a enfermedad;
- (c) un par de cebadores complementarios al ácido nucleico que codifica un factor de coagulación XII mutante asociado a enfermedad;
- 35 (d) la molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 13;
- (e) el oligonucleótido según la reivindicación 14; y/o
- 40 (f) el (poli)péptido según la reivindicación 15;
- y opcionalmente unas instrucciones para su utilización, en la que el mutante comprende una mutación que afecta al residuo aminoácido 309 que corresponde al residuo aminoácido 328 de la secuencia representada en SEC ID nº 2.
- 45 17. Utilización según la reivindicación 16, en la que dicho mutante asociado a enfermedad es un mutante tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 o un mutante tal como se define en la reivindicación 13.
- 50 18. Utilización según la reivindicación 16, en la que (a) es un par de cebadores que puede amplificar el exón 9 del gen del factor de coagulación XII humano o una parte del mismo que comprende la posición mutante tal como se define en la reivindicación 13, o una sonda o par de sondas.
- 55 19. Kit para la utilización en el diagnóstico del angioedema hereditario de tipo III o de una susceptibilidad o predisposición al mismo, comprendiendo dicho kit:
- (a) la molécula de ácidos nucleicos según la reivindicación 13;
- (b) el oligonucleótido según la reivindicación 14; y/o
- 60 (c) el (poli)péptido según la reivindicación 15;
- y opcionalmente unas instrucciones para su utilización, en el que el mutante comprende una mutación que afecta al residuo aminoácido 309 que corresponde al residuo aminoácido 328 de la secuencia representada en SEC ID nº 2.

1 ctattgatct ggactcctgg ataggcagct ggaccaacgg acggacgcca tgagggtct
 61 gctgctcctg gggttcctgc tggtagctt ggagtcaaca ctttcgattc caccttggga
 121 agccccaag gagcataagt acaaagctga agagcacaca gtcgttctca ctgtcaccgg
 181 ggagccctgc cacttcccct tccagtacca ccggcagctg taccacaaat gtaccacaa
 241 gggccggcca ggccctcagc cctggtgtgc taccaccccc aactttgatc aggaccagcg
 301 atggggatc tgtttggagc ccaagaaagt gaaagaccac tgcagcaaac acagcccctg
 361 ccagaaagga gggacctgtg tgaacatgcc aagcggcccc cactgtctct gtccacaaca
 421 cctcactgga aacctgttc agaaagagaa gtgctttgag cctcagcttc tccggttttt
 481 ccacaagaat gagatatggt atagaactga gcaagcagct gtggccagat gccagtgcaa
 541 gggctcctgat gccactgcc agcggctggc cagccaggcc tgccgacca acccgtgctt
 601 ccatgggggt cgctgcctag aggtggaggg ccaccgctg tgccactgcc cgggtgggta
 661 caccggacc ttctgcgacg tggacaccaa ggcaagctgc tatgatggcc ggggctcag
 721 ctaccgcggc ctggccagga ccaagctctc ggggtgcgcc tgtcagccgt gggcctcgga
 781 ggccacctac cggaactgta ctgccagca agcgcggaac tggggactgg gggccaccgc
 841 cttctgccgg aaccggaca acgacatccg cccgtggtgc ttcgtgctga accgcgaccg
 901 gctgagctgg gagtactgag acctggcaca gtgccagacc ccaaccagg cggcgctcc
 961 gacccgggtg tcccctaggc tccatgtccc actcatgcc gcgcagccgg caccgcccga

g
a

1021 gcctcagccc **agg**accggga ccccgctca gtcccagacc ccgggagcct tgcccgggaa
Thr
Lys
Arg

1081 gggggagcag ccgccttccc tgaccaggaa cggcccactg agctgcgggc agcggctccg
 1141 caagagtctg tcttcgatga cccgcgctgt tggcgggctg gtggcgctac ggggggcgca
 1201 cccctacatc gccgcgctgt actggggcca cagtttctgc gccggcagcc tcatcgcccc
 1261 ctgctgggtg ctgacggccg ctactgcct gcaggaccgg ccgcacccc aggatctgac
 1321 ggtggtgctc ggccaggaac gcogtaacca cagctgtgag ccgtgccaga cgttggccgt
 1381 gcgctcctac cgcttgacag aggccttctc gcccgtcagc taccagcaag acctggctct
 1441 gttgcgcctt caggaggatg cggacggcag ctgcgcgctc ctgtcgcctt acgttcagcc
 1501 ggtgtgcctg ccaagcggcg ccgcgagacc ctccgagacc acgctctgcc aggtggccgg
 1561 ctggggccac cagttcgagg gggcggagga atatgccagc ttcctgcagg aggcgcaggt
 1621 accgttcctc tccctggagc gctgctcagc cccggacgtg cacggatcct ccatcctccc
 1681 cggcatgctc tgcgcagggt tccctgaggg cggcaccgat gcgtgccagg gtgattccgg
 1741 agcccgcctg gtgtgtgagg accaagctgc agagcgcggg ctaccctgc aaggcatcat
 1801 cagctgggga tcgggctgtg gtgacgcgca caagccaggc gtctacaccg atgtggccta
 1861 ctacctggcc tggatccggg agcacaccgt ttcctgattg ctcagggact catctttccc
 1921 tccttgggtg tcccgagtg agagagtggc tggggcatgg aaggcaagat tgtgtcccat
 1981 tccccagtg cggccagctc ccgcgacagga tggcgaggaa ctcaataaag tgctttgaaa
 2041 atgctgag

Figura 1

```

1 acatgctctg tgcttagtaa cccagtgca acttttttgc tttccaaaa gttctggcaa
61 aagtcccaag ctgacctttt aattggccta aattgtgtat atgcttatct ctgaaccaat
121 cactgtggat tagagatgtc atgctctgat tgaccagacc taggccacat ctctagccct
181 agctctgagg gtagagttgg cagcactaga gcccattgaa gaagtaagag aggagtcgtt
241 gctaaaggaa aatcaaaagt gtcattaccg aaccaggaca gatgctgggc agcacatgtg
301 cccccgtct tcttctcatg ttocagctgc acatcttagt gcccttggg ttagcacttt
361 tctcattaaa tcatttgctt tcttgctca ctctctgtgg ttggtagaat gctaagatgg
421 cccaagatc tctaccctgt gtgtttgcac acctcccagt tattctgtca aacatgaatg
481 tagatgcttc tgtgaagaa ttttgacat gtaatttaag tcccaattg tttgacctt
541 aaataaggag aatggcaggg ccaggcatgg tggctcatic ctgtaatccc agcactttgg

601 gaggccaagg cgggcagatc acgaggtcag gagatcgaga ccatectggc taagacagtg

661 aaaccccctc tctactaaaa atacaaaaaa ttagctgggc gtggtggcgg gtgctctgat

721 tcccagctac ccaggaggct gaggcaggag aatggcgtga acccgggagg cgtagcttgc
781 agtgagccaa gatcgtgcca ctgcaactca gcctgggtga cagagccaga ctctgtctca
841 aaaaaaaaaa aaaaaggag aatggctttg gtgggcctga cctagtccag tgagttctta
901 aaaggcgaca catggccggg tgcagtggct caggcctgta atcccagcac tttggggagg
961 cgaggcgggt ggatcacgag gtcaggagat cgagaccatc ctggctaaca tggtgaacc
1021 ccgtctctac taaaaagaca aaaaattagc tgggcgtggg ggtgggctcc tgtagtcca
1081 gctactcggg aggcctgagg aggagaatgg cgtgaacccg ggaggcggag cttgcagtga
1141 gcggagattg cgccactgca ctccagcctg ggcgacagag cgagactccg tctcaaaaaa
1201 aaaaaaaaaa aaaaagaaaa taaaagtgg gtattgtgtt asgatgctga gtttatggta
1261 gtttgttaca tgacaataga aaatgaacac acttcacagt ggactccaag atccccatga
1321 tctttgatct ccttaacctc ctgatctcca caggaccag agcataagaa tgtccctct
1381 tctgcttcca gtcccactat ctgaaaaaga gaggaggagc ccagctcttc atttcaccce
1441 caccacaaa ctcccactt tccggccctc aaggggtgac caaggaagt gctccactt
1501 gctttccaca aacagcctgt gcccccagg gctcaggagg gcagcttgac caatctctat
1561 tccaagacc tttggccagt cctATTGATC TGGACTCTG GATAGGCAGC TGGACCAACG

1621 GACGGAGGCC ATGAGGGCTC TGCTGCTCCT GGGGTTCCTG CTGGTGAGCT TGGAGTCAAC

1681 ACTTTCGgtg agtgctgtgg gaaccaggat tgtcccagga ttgttctggg ggtctgctat
1741 cacagccatg agccatggcc tctgctcatg acctgtgggt ccaggtgact aggaggccta
1801 tgtggaaagg tgaggccagc ccggaaggcc caggcagagg agacagacaa ccagactggg
1861 tggatacaag ggcacagcct gcatctctgg gggagatggg ccttaagaag acaacggggg
1921 gaggtagaaa ggggttgggt cttgggaaga aatctctgca tttctgggct gtgagaggaa
1981 gctgcagact agcaacagat cgttggcagg ctatgactta tagtcagttc cctgcctctc
2041 tctctccctt gtatattcca ccttgggaag ccttgggaa gcataagtac aaagctgaag
2101 agcacacagt cggtaagtgg cctggctcct cctcccggga acccttgggt ggggatgtgt
2161 atggtgcagt gtgtgcagtc tcagggcagt ctagtctagt gcctacctgg tgcaggtctc
2221 tatgcccatg ggcactagag tgatcgtgag ctgtgtgatc cttgagggca ggtatggggc
2281 tgtgtctaa gtcaccagag cctggctcgg agcaggtgct tgagatatgt gctgctgggc
2341 ccatacacac tgggctcctg ccagccttcc tcagtttccc cagcttctcc ccttctttc
2401 ctttcccag tacgtctcat gggcatcatt catgccacac agaggccagg agcttcaatg
2461 ggcaaggaa gatcaagagc ttgtctctgg catctgaatg cctctgaagc ccagctttat
2521 cacttatgag ctgggtgact ctgggcgagg gatttgagtt ctccaagctt caatttccc
2581 ttctgtgaaa ccaggtgat aacagtaaac ctcttagggt tgttgagaag ggaaccat
2641 gtgaggtatt cagcccatca cctggtgat ggaatgctt tacaatat agcttttatt
2701 atgaaactac cttttagatg aagggtacct gccatttccc cctctctca gctctgccat
2761 agctcccatt tgctttcatt ctccagaca ctaaaattacc tacatgccag gcatgggtggc
2821 cctgctctgt aatcccagca ctttgggagg ccaaggtcgg tggatcatga ggtcaggagt
2881 tcgagaccag cctggccaac atggtgaaat gctgtctcta ctaaaagtac aaaaattagc
2941 caggcatggt ggcctgcgcc agtagtccca gctactcggg aggtgaggc agaagaattg
3001 cttgaacctg ggaggtgaag gttgcagtga acgaagatca caccattgca ctccagcttg
3061 ggcaacacag caagactccg tctcaaaaaa aaaaaaaaaa tttacctaga gtgtggcaca
3121 tagcagggcc tgtgaaccag atggacctta cctggtggg cctgacttgg tggggttag
3181 tctctaagca tggcgttag gccagocaca ttccaacct ggactcccct agcctcctc
3241 cttcacccca cacccaaaag tttctcctct ctcttgcctt acccaactt ggtgccctat
3301 ccttgcctaa tcccctgct aaggteccc tctctctgt ccgtccatcc catctgcatc
3361 ttttttttt tttgagatgg agtctcgtc tgtcccctag gctagagtgc aatggcgcga
3421 tcttggctca ttgcaacctc gcctcctgg gttcaagcga ttctctgctt cagcctccc
3481 agttgctggg attacaggca cacaacttca tgcctagcta atttttgtag ttttagtag
3541 agacagggtt tcaccatggt ggccaggctg gtctcgaact cctgcctca ggtggtccgc
3601 ccaccttagc ctccc aaagt gctgggatta caggcgtgag ccaccgcgct tggccccat
3661 ttgcatctta aaggctcact tcagatccat ttocatttac tgtcctagtt cttggttggg
3721 ccttggcaag tgcactttgc cttgaacaaa atagtggaac aagcttattg agcaggtact
3781 ttgtgccaaga cactgctcag catttcatgg catctatca tgaagccca gacaattcc
3841 tctgaagaag acacagggcaa ttctcattat tcgcatgggt tatgtcttat aaaaacacag
3901 tgaacattga actagcaaac agtattaggt tctgtgtgag ctctggtcac aacattttca
3961 tcaaccaaca gcatataact ggttttatg tatgattctg ttaaagaca ttttatttag
4021 tatatgtgtt gctgattcat caatgctaag ctgatggcac tatagcacac acctgaatca
4081 agtgcttaac acacgctttc tccctaaggt agccttcttg tgcttaggaa ctacacagct
4141 cctcagcagg aggtcagag gccatttcca aaagccaaat ccccagcaaa agcacaaagt
4201 gtgaaaaacg ttgcactaag tagactgaga aggacactca ttcaatagga gagctgaaac

```

Figura 2

4261 aagcagcagc agcgtgacgc ettggtgaac cttactggg aatgtgcaa tttttcactg
4321 ctctgtgcat gccacaaaat ggccatgaaa acatttcaag tattgacttg ggagttacaa
4381 ataaaattca gcaagtaggc acatttctcaa tgtagaacca gagaagaatg aggatcaact
4441 gtactattat tactgccgtt ttacagataa ggaaccaag gctcagatca gagtggtaa
4501 cagtgcactc aacattcaac aagtattatt aagtgcctac tttgtggcaa gtgctcttec
4561 tggccttggg actgaagact taccgaaggt cacacagcta gcaggttgtg gagtccaggg
4621 tctactccag ctatctgact cctgaaccoca agtttttttt ttttcttta agtggagtc
4681 tcaactctgtc acccaggctg gagtgcagtg gcgcgatctc ggctcactgc aagctccgcc
4741 tcccgggttc acaccattct cctgcctcgg cctcccagat agctgggact acaggcacct
4801 gccaccacc ccagctaatt ttttgtatt tttagtagag agggggtttc actgtattag
4861 ccaggatggt cttgatctcc tgacctcgtg atctgcccgc cttggcctcc caaagtgctg
4921 ggattacagg cttgagccac cgcgcctggc cctgaaccoca acttttagag cagaaagtgt
4981 tttcaatgca cagcgacctt tttgagggtc tgtccttttc ctgaccagac cctgagggac
5041 agtgcctgag cagttgagta caggggaagt cctcagagag tgggtgtcc ctgcagttct
5101 cactgtcacc ggggagccct gccacttccc cttccagtag caccggcagc tgtaccacaa
5161 atgtaccac aagggccggc cagggcctca gccctggtaa gactacgcga aggagtggaa
5221 gcaggggctt gggagacatg taccctgcct gtcctctctg ccaaggaact ctgcttggag
5281 agaggggact gtgatagggc aggggtgggc agggccctgg gtagagcagg gaagccttgg
5341 ctcttctac aggtgtgcta ccaccccaa ctttgcagag gaccagcagt gaccgatactg
5401 tttggggccc aagaaagtga aaggtgctac acacagcctc tgggggtggc tgggctctc
5461 tctctccgc tctactctc cctggtatca ccagaccoca cacacctggg atctggacc
5521 cagccccttc tctccctcca caataccctt tggagtgcca gaggagagt tctgggagg
5581 agtgggtcca ttttgcaggt gggtaaacca agcttggaaa ctgggtag caaggtcaca
5641 agccaagtag gtccaagaag ggccttggcc cccagctgtg tgactcagct cctgctctt
5701 cctccacca tgtccatctc tcagaccact gcagcaaaaca cagcccctgc cagaaaggag
5761 ggacctgtgt gaacatgcca agcggccccc actgtctctg tcacacaac ctcactggaa
5821 accactgcca gaaagtgag gagatgtgga ggacctgggc ggggtgctgg gggacagggg
5881 caaccctggg cctacagaat aggttgcctg atactcggag acttggcag gctctagact
5941 ctctgagac cactatccct cttgtcccc agagaagtgc ttgagcctc agctctccg
6001 gttttccac aagaatgaga tatggtatag aactgagcaa gcagctgtgg ccagatgcca
6061 gtccaagggc cctgatgccc actgcacagc gctggccagc caggggtgagc agatggttgg
6121 gaacgggcca gggaggagcg tcaggaaagc aggcctggcag gaggccgggt ggtgtccgg
6181 gaaggagagc tctctggggg ggtctttagg cccaggggtg gctcactgcg tccctccc
6241 aagcctgccc caccaaccgg tgccctccatg ggggtcctg cctagaggtg gaggccacc
6301 gctgtgcca ctgcccggtg ggctacaccg gaccctctg cgactgggtg gagtgaggt
6361 ctggggcaag cagaaggcca gcccccaggt gggacgggct tgccaggaag gaggagggg
6421 agtgggaaa gcagatgaga gggagggcag agagcccagc ctgggtgccc caggagccc
6481 cctttctct cagacaccaa ggcaagctgc tatgatggcc gcgggctcac ctaccgggc

6541 ctggccagga ccacgctctc ggggtgcgccc tgtcagccgt gggcctcggg ggccacctac

6601 cggaaactga ctgcccagca agcgcgggaa tggggactgg gcggccaogc cttctgcccg
6661 tgcgcgcgct ggggctgggt gacccctccg ccccagggtc cgggctctaa ggcgctctaa
6721 cggcgcccgc tgcgttggct acaggaaacc ggacaacgac atccgcccgt ggtgctctgt
6781 ctggaaccgc gaccggctga gctgggagta ctgcgacctg gcacagtgc agaccacaac
6841 ccagggcgcg cctccgacct cgggtctccc taggctctat gtcccactca tgcggcgca
6901 gccggcaccg ccgaagcctc agcccacgac cgggaccccg cctcagctcc agacccccgg

6961 aggttaggaa gtgggggggg gaaggaggag ccgagagggc gccggggcag ctagattccg

7021 gccagccggc cggggctcgc ccgtcctcag cccctgctcc tcacacgctc tggcggcgaa

7081 gcgggagcag ccgccttccc tgaccaggaa cggcccactg agctgcccgc agcggctccg
7141 caagagtctg tcttcgatga cccgcgctgt tggcgggctg gtggcgtac gcggggcgca
7201 cccctacatc gccgcgctgt actggggcca cagtttctgc gccggcagcc tcatcgcccc
7261 ctgctgggtg ctgacggccc ctcactgcct gcaggaccgg cgagtaccgg cccgccacga
7321 gccgcccag gggcgcgggc tctctcgtct cccagcgcag ctccaogct gcacccgaac

7381 ccgtgccccta ctttctccc ccccaccctt ctttccaogc cctccggag cctcccggga

7441 ggaagctgga acacgggatt ggggttcggg agcagggggc tccccagaa cgctgtggc
7501 caggtctgag agcgtgcct ctcccctacc ctcccgcag gcccgaccc gaggatctga
7561 cgttgggtct cggccaggaa cgccgtaacc acagctgtga gccgtgccc agcttggccg
7621 tgcgctccta ccgcttgcaac gaggcctctc cgccgctcag ctaccagcac gacctgggtg
7681 cgtgggggag ccccgccggg acgggaagag agcttggggc cccggcgtcc ccgctcacg
7741 ctctctctcc ccggggttag ctctgttgcg ccttcaggag gatgcccagc gcagctgcg
7801 gctcctgtgc ecttacgttc agccgggtgt cctcccaagc ggcgcgcgc gaccctccg
7861 gaccacgctc tgccaggtgg ccggctgggg ccaccagttc gagggtaggc acaactgcta
7921 ggggagggg taggggagga gacctttgat cactgggtta gggggaaga gcccgcgact
7981 ttggtatcgt tcgggtgccc tacagaatgg gtggcgctga cctgatgggt tgtgagaatg
8041 tgtaggtgaa tcccagtag aatcccaggg cctgggattc actgctggga tccccaaact
8101 tccctgggat acaggagaa tcgaacttgc tcttgggtcc ctctggggc cgggctgcaa
8161 agccaacta ggaagctggc cccgcctccc gggctagtgt gggagccag tctctgact
8221 ctggatgggt ggtgggggag ggggttctgt ttccgctccg cccattcaaa tctctggctt
8281 tctctggacc tcagcctcct tgcctatgaa attgaattaa tggcacctcc cccctctgg
8341 gcttctgctg agagaggag ggcagtagtg ggtttacaag cgcctggagc agcttctgct

Figura 2 (ff)

```

8401 atcgtccggg cggcaagcgt tgtcagatgg ggtgtgaaga aggcgctctg tgttcgcagg
8461 ggcggaggaa tatgccagct tcctgcagga ggcgcaggta ccgttcctct ccctggagcg
8521 ctgctcagcc cgggacgtgc acggatcctc catcctcccc ggcattgctct gcgcagggtt
8581 cctcgagggc ggcaccgatg cgtgccaggt gagctcttag cccggttggc gccctcccc
8641 gaggccgtca ggcacaaatc tcaggtccac agcgtgagc tgcgtgttbc cgaccaggg
8701 tgattccgga ggcgccctgg tgtgtgagga ccaagctgca gagcgccggc tcaccctgca
8761 aggcattcgc agctggggat cgggctgtgg tgaccgcaac aagccaggcg tctacaccga
8821 tgtggcctac tacctggcct ggatccggga gcacaccgtt tcctgattgc tcagggactc
8881 atctttccct ccttggatgat tccgcagtga gagagtggct ggggcatgga aggcaagatt
8941 gtgtcccatt cccccagtgc ggccagctcc gcgccaggat ggcgcaggaa ctcaataaag
9001 tgctttgaaa atgctgagaa ggaaagctct ttcttcatg ggtcccgcgc ggaaatgcca
9061 agacagaaaa gcgattcaca gcttctccac agctctcaga gaacaaggtc tatgagatct
9121 taacgtgcaa aatctagatg ccagcccagc taatgtttac tgagcctagg atactgtata
9181 ccaagccctg tgcaaggaga agctgcatgt tattccttat gagaaactaa cattttgttt
9241 acagagcagt agttctcaga ccatacatta agatcacttg gggagcgttt tgagccaatc
9301 tatgcccagg ttccacctca gaccaattaa atcagtatgt ctagggatgg ggcattgggt
9361 gtggtatatt tgtaaaactc ccagataat tccatgtaca gccaaaggttg agaatcgtgg
9421 ttagaaatac ttagcattgg cggggcgcgg tggctcagc ctgtaatcct agcactttaa
9481 gaggccaagg caggtggatt gctcaggagt tcgaaaccag cctgggcaac acgatgaaac
9541 cccgtctcta ctaaaataca agaaattagc cgggcacggc ggcgtgcgcc thtagtcca
9601 gctactcagg aggctgaggc aggagaaatca cttgaaccgg caggaaaggaa ggaaggaagg
9661 aacagagggg gggaaagaga gagacagaaa gaaaagaaaa aagaaaatag aaaaaagag
9721 cattgactgt ggcgtggacc ctaagggctg ggtgacatat cgttgtcccc accccaacac
9781 gcaactagtgt agtgggtctg agagtccttt ggctagcagt accatacca ggaacttgt
9841 tacacataac aaattctcgg gctacacttt atactgctga acagaaagtc tggggtgggg
9901 ccagcaatc tgtttaacag ccttgcgggg gattctgatg ttctctcatg chtaagaacc
9961 acaatctggg ggttgaatgg ttggttccct tacaagtga ggtctggctg tccagacaca
10021 acatcctttt ttcacaaaac cagcttttta aaattaaaaa tagattggcc agatgcgggtg
10081 gtteacgcct gtaatctcgt cactttgaga ggctgaggcg ggaggattgt ttgagctcaa
10141 gacttctcga cccgcctggg caacatagtg agacctcatc tcaaaaaaat ttttttaat
10201 taaaatttgt ttttctttt ttagagacgg ggcctcgtc tgggtctcag gctggcgtgc
10261 agcgacacga tcctataata gtttactata atctcgctac tgagttcaag cgatccgcc
10321 gcctcggcct cccaaagcgc tgggattaca ggagtgagcc gctgcgctct gccaaacca
10381 tcctacagga taacctaga actgcgacag cactaaacgc ccacgcccca cgtgcccag
10441 cctgggtggt cgctccggga cggcgccttg tgtgacgtca cagccccgc cagcctgcct
10501 cacagcgcg caggccttc cgcgtggcg cctctatatt tccccagag gtgagggcg
10561 gctgggcgca ctcgagcgc gatgggcgac tggaaaggct acatcagtc agtgc

```

Figura 2 (ff)

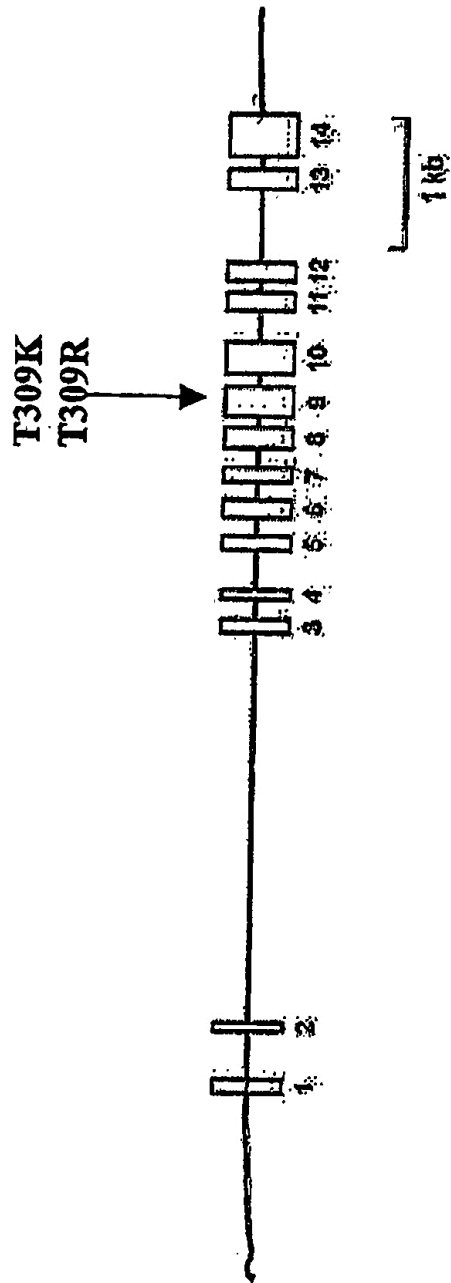


Figura 3

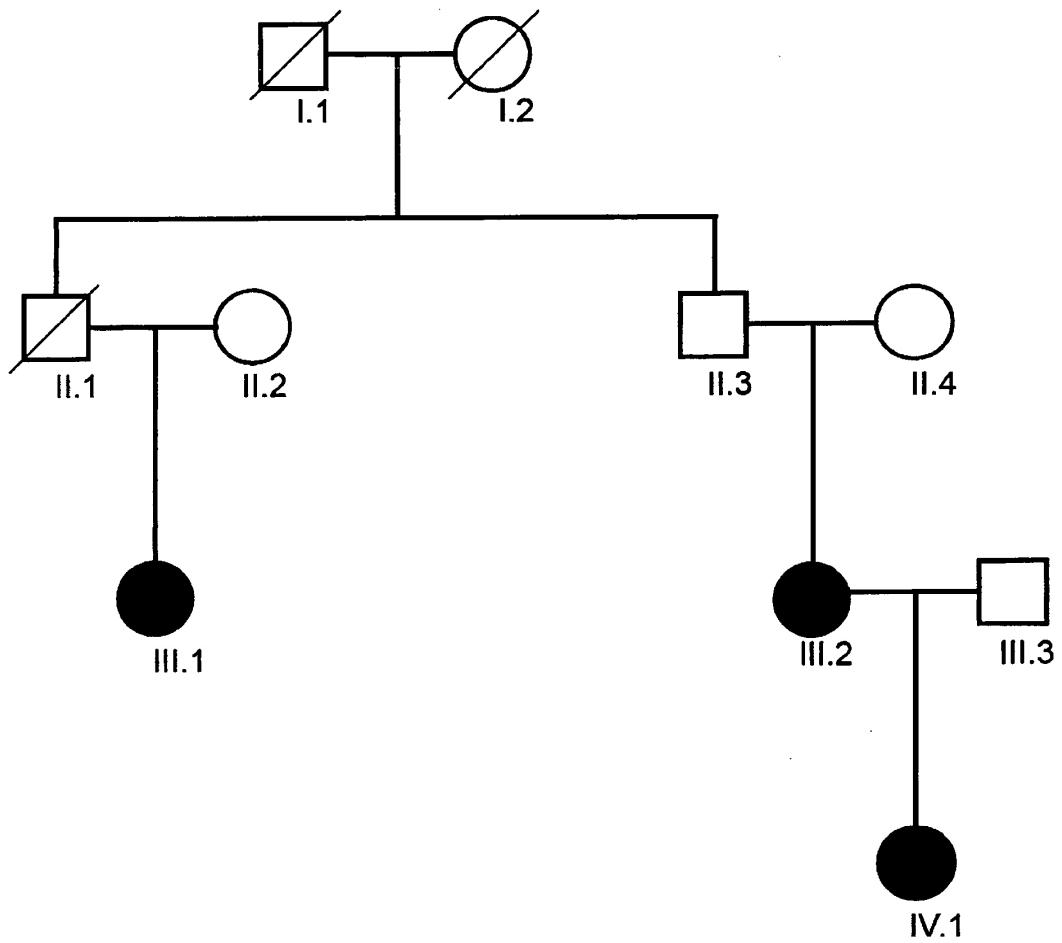


Figura 4