



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 348 094**

51 Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)  
**C12N 15/11** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05816397 .3**  
96 Fecha de presentación : **15.11.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1819833**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.08.2007**

54 Título: **Variante genética del gen de anexina A5.**

30 Prioridad: **19.11.2004 EP 04027526**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**30.11.2010**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**30.11.2010**

73 Titular/es: **Universitätsklinikum Münster**  
**Domagkstrasse 5**  
**48149 Münster, DE**

72 Inventor/es: **Markoff, Nadja;**  
**Horst, Jurgen;**  
**Gerke, Volker y**  
**Markoff, Arseni**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

**ES 2 348 094 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).

**VARIANTE GENÉTICA DEL GEN DE ANEXINA A5****DESCRIPCIÓN**

La memoria descriptiva da a conocer una molécula de ácido  
5 nucleico que comprende un elemento de regulación del gen de  
anexina A5 (ANXA5) que comprende al menos una mutación puntual,  
mediante lo cual dicha al menos una mutación (sustitución)  
puntual se selecciona del grupo que consiste en (i) una mutación  
10 puntual de G por A en una posición que corresponde al nucleótido  
186 de la SEQ ID NO: 2; (ii) una mutación puntual de A por C en  
una posición que corresponde al nucleótido 203 de la SEQ ID NO:  
2; (iii) una mutación puntual de T por C en una posición que  
corresponde al nucleótido 229 de la SEQ ID NO: 2; y (iv) una  
15 mutación puntual de G por A en una posición que corresponde al  
nucleótido 276 de la SEQ ID NO: 2.

La presente invención se refiere a una molécula de ácido  
nucleico que comprende un promotor de anexina A5 (ANXA5) humana,  
promotor que comprende las siguientes mutaciones (sustituciones)  
20 puntuales: (i) una mutación puntual de G por A en una posición  
que corresponde al nucleótido 186 de la SEQ ID NO: 2; (ii) una  
mutación puntual de A por C en una posición que corresponde al  
nucleótido 203 de la SEQ ID NO: 2; (iii) una mutación puntual de  
T por C en una posición que corresponde al nucleótido 229 de la  
SEQ ID NO: 2; y (iv) una mutación puntual de G por A en una  
25 posición que corresponde al nucleótido 276 de la SEQ ID NO: 2.  
La presente invención se refiere además a una molécula de ácido  
nucleico que comprende un promotor de anexina A5 (ANXA5) humana,  
promotor que comprende las siguientes mutaciones (sustituciones)  
puntuales: (ii) una mutación puntual de A por C en una posición  
30 que corresponde al nucleótido 203 de la SEQ ID NO: 2; y (iii)  
una mutación puntual de T por C en una posición que corresponde  
al nucleótido 229 de la SEQ ID NO: 2.

Además, la presente invención proporciona un vector que  
comprende la molécula de ácido nucleico de la invención y un  
35 huésped transformado con el vector. La invención también se  
refiere a usos específicos, en particular usos de diagnóstico de  
las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente

documento. Además, la memoria descriptiva da a conocer un método para determinar el haplotipo de un elemento de regulación del gen ANXA5 en un individuo que comprende las etapas de: (a) aislar un ácido nucleico a partir de una muestra que se ha  
5 extraído del individuo; (b) determinar la presencia de los nucleótidos presentes en las posiciones 186, 203, 229 y 276 de la copia del individuo del elemento de regulación del gen ANXA5, en el que los números de posición se determinan mediante comparación con la SEQ ID NO: 2; (c) asignar a los individuos a  
10 un haplotipo particular mediante comparación de los nucleótidos presentes en dichas posiciones con los nucleótidos referidos en los haplotipos tal como se define en el presente documento.

El aborto es un fenómeno frecuente con origen heterogéneo. El estado genético más prevalente, especialmente para casos de  
15 pérdida en los primeros meses de embarazo, son las aberraciones cromosómicas. Los trastornos de hipercoagulabilidad que promueven trombosis, denominados colectivamente trombofilia son aún otro factor genético significativo. Los defectos más significativos (riesgo de 3 a 6 veces mayor de aborto) incluyen  
20 la mutación del factor V de Leiden, variantes genéticas de metilentetrahidrofolatorreductasa (MTHFR), y mutación 20210G→A del factor II (protrombina). Entre estos, se han demostrado las asociaciones del factor V de Leiden y la 20210G→A de protrombina (PTm) con el aborto recurrente mediante meta-análisis  
25 estadístico [Rey, 2003]. La asociación entre algunas de las variantes genéticas de MTHFR y la trombosis es controvertida [Rey, 2003, Key, 2002, Seligsohn, 2001]. Otro factor principal para las pérdidas repetidas del embarazo es la presencia de anticuerpos antifosfolípidos maternos circulantes (aPL). El  
30 aumento de los riesgos de aborto se ha documentado en embarazos de bajo riesgo y de alto riesgo (más de 3 muertes fetales), cuando están presentes aPL [Empson, 2002 y bibliografía en el mismo].

La anexina A5 (proteína anticoagulante placentaria) se  
35 encuentra en vellosidades placentarias normales y parece reducirse en presencia de aPL [Rand, 1994]. Otros estudios confirman la expresión de anexina A5 reducida en trofoblastos

placentarios de pacientes con preeclampsia mediante inmunohistoquímica.

La anexina A5 es un miembro típico de la familia de genes de anexina de cordados. Ésta proyecta la estructura de téttrada  
5 esencial y la unión a fosfolípidos dependiente de calcio, que se han convertido en un modelo clave para estudiar la función de la anexina [Gerke y Moss, 2002]. Es una proteína expresada de manera abundante y ubicua presente mayormente en el riñón, el hígado y la placenta [Morgan, 1998]. La anexina A5 puede  
10 funcionar de manera extracelular como un inhibidor de la coagulación sanguínea y se propone que esta proteína puede formar un escudo anticoagulante protector en la superficie de los trofoblastos placentarios [Rand y Wu, 1999; Rand, 2003].

Hayes trata el posible papel de la expresión de anexina 5  
15 en algunos estados patológicos, tales como el aborto. Sin embargo no se sugiere que estos estados puedan estar relacionados con un promotor de ANXA5 mutado.

El gen de anexina A5 se ha caracterizado hace una década [Cookson, 1994] y el gen y la proteína codificada se estudian y  
20 caracterizan de manera extensa. Sin embargo, hasta hace poco, se conocía poco sobre la regulación de la expresión de anexina A5. El gen de anexina A5 (ANXA5) humana produce varios transcritos y tiene un promotor complejo con regulación intrincada [Carcedo, 2001].

No se han asociado mutaciones de anexina A5 con un fenotipo  
25 de enfermedad, a excepción de la variante genética "-1 C→T", que se propone que protege frente al infarto de miocardio en pacientes jóvenes [Gonzalez-Conejero, 2002]. Sin embargo existen otros datos y consideraciones, que refutan la validez de este  
30 hallazgo [Kozak, 2003; van Heerde, 2003].

El problema técnico de la presente invención es la provisión de medios y métodos para determinar el riesgo de aborto. La solución a este problema técnico se proporciona en la presente invención tal como se caracteriza en las  
35 reivindicaciones y tal como se ilustra y ejemplifica en el presente documento.

La presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende un promotor de anexina A5 (ANXA5) humana, promotor que comprende las siguientes mutaciones (sustituciones) puntuales: (i) una mutación puntual de G por A en una posición que corresponde al nucleótido 186 de la SEQ ID NO: 2; (ii) una mutación puntual de A por C en una posición que corresponde al nucleótido 203 de la SEQ ID NO: 2; (iii) una mutación puntual de T por C en una posición que corresponde al nucleótido 229 de la SEQ ID NO: 2; y (iv) una mutación puntual de G por A en una posición que corresponde al nucleótido 276 de la SEQ ID NO: 2.

La presente invención se refiere además a una molécula de ácido nucleico que comprende un promotor de anexina A5 (ANXA5) humana, promotor que comprende las siguientes mutaciones (sustituciones) puntuales: (ii) una mutación puntual de A por C en una posición que corresponde al nucleótido 203 de la SEQ ID NO: 2; y (iii) una mutación puntual de T por C en una posición que corresponde al nucleótido 229 de la SEQ ID NO: 2.

La presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende un elemento de regulación del gen de anexina A5 (ANXA5) que comprende las siguientes mutaciones (sustituciones) puntuales

(i) una mutación puntual de G por A en una posición que corresponde al nucleótido 186 de la SEQ ID NO: 2;

(ii) una mutación puntual de A por C en una posición que corresponde al nucleótido 203 de la SEQ ID NO: 2;

(iii) una mutación puntual de T por C en una posición que corresponde al nucleótido 229 de la SEQ ID NO: 2; y

(iv) una mutación puntual de G por A en una posición que corresponde al nucleótido 276 de la SEQ ID NO: 2.

Tal como se documentó en los ejemplos adjuntos, se encontró de manera sorprendente una variante genética en la región promotora de ANXA5 (*BamHI*) en el gen de anexina A5 (ANXA5) entre mujeres que se examinaron para determinar diferentes defectos genéticos de trombosis hereditarios debido a aborto repetido. Esta variante consiste en sustituciones de cuatro nucleótidos, que se heredan como un haplotipo. Sin restringirse a la teoría, estos cuatro cambios son importantes para la actividad del

promotor de anexina A5 y dan como resultado una expresión génica reducida. Tal como se define a continuación en el presente documento, son de particular relevancia a este respecto cuatro mutaciones puntuales caracterizadas como "-19 G por A", "1 A por C", "27 T por C" y "76 G por A", mediante lo cual "G" indica guanina, "C" indica citosina, "A" indica adenina y "T" timina.

Las posiciones "-19", "1", "27" y "76" de las mutaciones/sustituciones descritas en el presente documento se refieren a la numeración de la secuencia tal como se da en la figura 2 adjunta, que describe la estructura del promotor del núcleo de ANXA5. La numeración, en particular, se refiere al primer punto de iniciación de la transcripción del gen (tsp 1, tal como se indica "+1"). Sin embargo, las sustituciones/mutaciones correspondientes también se definen en relación a secuencias específicas que representan el promotor de ANXA5, y se dan en particular en la SEQ ID NO: 2 (una estructura de promotor de ANXA5 tal como se da a conocer en Carcedo (2001), Biochem. J. 356, 571-579), la SEQ ID NO: 1 (una estructura de promotor de ANXA5 tal como está depositada con el número de registro de gen U01681; NCBI) y anotadas como "gen de anexina V humana, región no traducida en 5', exones 1 y 2); y dos regiones promotoras de anexina V/regiones no traducidas en 5' adicionales definidas en el presente documento como las SEQ ID NO: 3 y 4. La región no traducida en 5' de un gen de anexina V puede, en el contexto de esta invención, en particular caracterizarse como que comprende dos motivos específicos "A" y "B" que se documentan en la figura 2. Un promotor adicional de ANXA V, según esta invención, es una estructura promotora que comprende al menos una estructura de secuencia tal como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 17, 18, 19 y 20.

Por consiguiente, las cuatro sustituciones tal como se definen en el presente documento se refieren a las siguientes posiciones en las estructuras promotoras correspondientes tal como se da en las SEQ ID NO: de 1 a 4:

35

Sustitución	SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4
-------------	--------------	-------------	--------------	--------------

-19 G→A	186	1259	243	190
1 A→C	203	1276	262	209
27 T→C	229	1302	288	235
76 G→A	276	1349	337	284

Estos nucleótidos variantes se representan en casos de aborto repetido en una tasa de portador mucho mayor en comparación con controles de mujeres normales sin problemas de embarazo notificados (casi dos a tres veces mayor). Por tanto, el haplotipo *BamHI*<sup>-</sup> representa un factor de riesgo para la pérdida del embarazo recurrente. Además, estos nucleótidos variantes se representan en casos de aborto a aproximadamente una tasa de portador dos veces mayor en comparación con la población normal del noroeste de Alemania (1,916 veces). La presente invención proporciona un método/procedimiento analítico que diferencia el haplotipo de riesgo del alelo normal, de tipo natural. En resumen, la presente invención proporciona variantes genéticas del promotor del gen ANXA5, denominados alelos "M1" y "M2" (*BamHI*<sup>-</sup>). El "haplotipo M1" correspondiente comprende las mutaciones "1 A por C" y "27 T por C", mientras que el "haplotipo M2" correspondiente comprende las cuatro mutaciones definidas anteriormente en el presente documento, es decir, además la mutación "-19 G por A" y la mutación "76 G por A". Se estimó la frecuencia de estos alelos en grupos de pacientes y de control. Además, se documenta la relevancia funcional de los alelos M1 y M2 (*BamHI*<sup>-</sup>) de ANXA5 para la expresión génica de ANXA5. De la manera más importante, se demuestra una relación entre la cualidad de portador del alelo *BamHI*<sup>-</sup> de ANXA5 y el estado de aborto repetido y se establece un procedimiento analítico para distinguir el alelo *BamHI*<sup>-</sup> de ANXA5 de la secuencia de tipo natural.

En una realización de la invención, la molécula de ácido nucleico que comprende un elemento de regulación del gen ANXA5 de la invención es una molécula de ácido nucleico, mediante lo cual dicha al menos una mutación puntual de G por A en la posición 186 de la SEQ ID NO 2 corresponde a

- (i) una mutación puntual de G por A en una posición que corresponde al nucleótido 1259 de la SEQ ID NO: 1;
- (ii) una mutación puntual de G por A en una posición que corresponde al nucleótido 243 de la SEQ ID NO: 3; o
- 5 (iii) una mutación puntual de G por A en una posición que corresponde al nucleótido 190 de la SEQ ID NO: 4.

Además, se proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende un elemento de regulación del gen ANXA5 tal como se definió anteriormente, mediante lo cual dicha al menos una  
10 mutación puntual de A por C en la posición 203 de la SEQ ID NO: 2 corresponde a

- (i) una mutación puntual de A por C en una posición que corresponde al nucleótido 1276 de la SEQ ID NO: 1;
- (ii) una mutación puntual de A por C en una posición que  
15 corresponde al nucleótido 262 de la SEQ ID NO: 3; o
- (iii) una mutación puntual de A por C en una posición que corresponde al nucleótido 209 de la SEQ ID NO: 4; y/o

mediante lo cual dicha al menos una mutación puntual de T por C en la posición 229 de la SEQ ID NO: 2 corresponde a

- 20 (i) una mutación puntual de T por C en una posición que corresponde al nucleótido 1302 de la SEQ ID NO: 1;
- (ii) una mutación puntual de T por C en una posición que corresponde al nucleótido 288 de la SEQ ID NO: 3; o
- (iii) una mutación puntual de T por C en una posición que  
25 corresponde al nucleótido 235 de la SEQ ID NO: 4; y/o

mediante lo cual dicha al menos una mutación puntual de G por A en la posición 276 de la SEQ ID NO: 2 corresponde a

- (i) una mutación puntual de G por A en una posición que  
corresponde al nucleótido 1349 de la SEQ ID NO: 1;
- 30 (ii) una mutación puntual de G por A en una posición que corresponde al nucleótido 337 de la SEQ ID NO: 3; o
- (iii) una mutación puntual de G por A en una posición que  
corresponde al nucleótido 284 de la SEQ ID NO: 4.

En una realización preferida de la invención, la molécula  
35 de ácido nucleico que comprende un elemento de regulación del gen ANXA5 tal como se define en las reivindicaciones comprende al menos una de las siguientes secuencias

- (i) TGCGGTTGGGGC (SEQ ID NO: 17);
- (ii) TGGCGGGGGTGGGACGGGCCAAGCCGGGCAGGGCCGGGGTGGGGC (SEQ ID NO: 18),
- (iii) GCTGGCGTTTCCGTTGCTTGGATCAGTCTAGGTGCAGCTGC (SEQ ID NO: 19); o
- (iv) GGATCC (SEQ ID NO: 20),

5

10

mediante lo cual la G en la SEQ ID NO: 17 puede ser una A (correspondiente a -19 G por A), mediante lo cual dicha A en la SEQ ID NO: 18 puede ser una C (correspondiente a 1 A por C), mediante lo cual dicha T en la SEQ ID NO: 18 puede ser una C (correspondiente a 27 T por C) y mediante lo cual dicha G en la SEQ ID NO: 20 puede ser una A (correspondiente a 76 G por A).

15

20

Tal como se documentó anteriormente en el presente documento, la molécula de ácido nucleico definida en el presente documento como un elemento de regulación del gen ANXA5 es un promotor. Por consiguiente, la molécula de ácido nucleico puede conferir la actividad de la anexina A5 en forma de expresión de anexina A5/V. Dicha expresión puede someterse a prueba mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo ligando operativamente la molécula de ácido nucleico de la presente invención a o bien una molécula marcadora que va expresarse y/o bien a la secuencia codificante de anexina A5 y detectar si dicha anexina A5 o dicha molécula marcadora se expresa en, entre otros, un sistema de expresión génica heterólogo.

25

30

En la definición de un promotor/secuencia reguladora de ANXA5 tal como se define en las reivindicaciones también están comprendidas moléculas de ácido nucleico que son al menos el 60%, más preferiblemente el 70%, más preferiblemente al menos el 80%, más preferiblemente al menos el 90% y lo más preferiblemente al menos el 95% idénticas a las secuencias promotoras tal como se muestra en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 4.

35

El promotor de ANXA5 tal como se define en el presente documento es, por consiguiente, un promotor que es altamente homólogo a las secuencias promotoras tal como se define en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1 a 4 o en la figura 2 adjunta y que puede dirigir una expresión de ANXA5 en células, mediante lo

cual estas células se seleccionan del grupo que consiste en: HeLa, HEK293, HepG3, BeWo, trofoblastos placentarios, hepatocitos y células epiteliales de riñones.

Otro aspecto de la invención se refiere a las secuencias reguladoras definidas anteriormente o a usos de las secuencias reguladoras (que comprenden la sustitución definida en el presente documento) que hibridan con una de las secuencias reguladoras descritas anteriormente de la invención, preferiblemente con la cadena complementaria de la misma, y comprenden al menos una de las sustituciones proporcionadas en esta invención. Preferiblemente, dicha secuencia de hibridación comprende, en su cadena complementaria, al menos dos sustituciones tal como se proporcionan en el presente documento.

Estas secuencias de hibridación pueden ser promotores tal como se definió anteriormente o elementos reguladores que comprenden, en su cadena complementaria, (una) sustitución/sustituciones tal como se define en el presente documento.

El término "hibridar" tal como se usa hace referencia a condiciones de hibridación convencionales, preferiblemente a condiciones de hibridación en las que se usa 5x SSPE, SDS al 1% y disolución de Denhardtts 1x como disolución y/o en las que las temperaturas de hibridación están entre 35°C y 70°C, preferiblemente 65°C. Tras la hibridación, el lavado se lleva a cabo preferiblemente en primer lugar con 2xSSC, SDS al 1% y posteriormente con 0,2xSSC a temperaturas entre 35°C y 70°C, preferiblemente a 65°C (en lo que se refiere a la definición de SSPE, SSC y disolución de Denhardtts véase Sambrook, citado anteriormente). Particularmente se prefieren condiciones de hibridación rigurosas como por ejemplo las descritas en Sambrook, citado anteriormente. Las condiciones de hibridación rigurosas particularmente preferidas están por ejemplo presentes si la hibridación y el lavado se producen a 65°C tal como se indicó anteriormente. Se prefieren menos condiciones de hibridación no rigurosas, por ejemplo, con hibridación y lavado llevados a cabo a 45°C y aún menos a 35°C.

En una realización preferida particular, la molécula de ácido nucleico de la invención que se une operativamente a un gen codifica para una proteína marcadora, una proteína señal o un gen indicador.

5 La invención se refiere en una realización a dicho gen marcador o receptor que va a expresarse bajo el control de las secuencias reguladoras dadas a conocer en el presente documento que son, por ejemplo, proteínas fluorescentes (por ejemplo proteína fluorescente verde) o proteínas que pueden, directa o  
10 indirectamente, cuando se expresan, conducir a una señal visible o medible, (por ejemplo, cloranfenicol acetiltransferasa, beta-galactosidasa).

Ejemplos de genes marcadores o reporteros, que permiten la actividad de expresión de las secuencias reguladoras, preferiblemente promotores, que van a detectarse, preferiblemente en células eucariotas, se describen en la bibliografía. Ejemplos de genes indicadores que codifican para luciferasa, proteína fluorescente (verde/roja) y variantes de las mismas, como eGFP (proteína fluorescente verde potenciada),  
15 RFP (proteína fluorescente roja, como DsRed o DsRed2), CFP (proteína fluorescente cian), BFP (proteína fluorescente azul), YFP (proteína fluorescente amarilla),  $\beta$ -galactosidasa o cloranfenicol acetiltransferasa, y similares.

Por ejemplo, GFP puede ser de *Aequorea victoria* (patente estadounidense n.º 5.491.084). Un plásmido que codifica para la GFP de *Aequorea victoria* está disponible con el n.º de registro de ATCC 87451. Otras formas mutadas de esta GFP que incluyen, pero no se limitan a, pRSGFP, EGFP, RFP/DsRed, y EYFP, BFP, YFP, entre otras, están comercialmente disponibles de, entre otros,  
25 Clontech Laboratories, Inc. (Palo Alto, California). Por ejemplo, DsRed2 también está disponible de Clontech Laboratories, Inc. (Palo Alto, California); véanse los ejemplos adjuntos. También pueden expresarse proteínas luminiscentes adicionales bajo el control de la secuencia reguladora  
30 proporcionada en el presente documento. En este contexto, se

prevé una secuencia de nucleótidos que codifica, entre otras, para una proteína de la familia de la luciferasa.

La invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico recombinante que comprende la secuencia reguladora de la invención y un gen bajo su control, mediante lo cual dicho gen codifica para una etiqueta. Dicha etiqueta puede seleccionarse del grupo que consiste en una etiqueta His, glutatión, una etiqueta Strep, una etiqueta Flag, CBP (péptido de unión a calmodulina), TAG-100 (disponible de Quiagen), etiqueta E2 (de la proteína E2 transactivadora de tipo I de papilomavirus bovino) y etiqueta Z, pero sin limitarse a las mismas. Por ejemplo, según esta invención puede emplearse la etiqueta de unión a quitina autoescindible (por ejemplo, del sistema IMPACT-CN) o hemaglutinina de influenza (HA).

Por consiguiente, la invención también se refiere a una molécula de ácido nucleico aislada que comprende la molécula de ácido nucleico que representa un promotor de ANXA5 tal como se define en las reivindicaciones y que comprende al menos una sustitución tal como se define en el presente documento, mediante lo cual dicha molécula de ácido nucleico de la invención se une operativamente a una secuencia de molécula de ácido nucleico que puede conferir la actividad de un gen indicador. Por consiguiente, también se proporciona una molécula de ácido nucleico recombinante de la invención.

Por consiguiente, la invención también proporciona moléculas de ácido nucleico recombinantes específicas que comprenden la secuencia reguladora descrita en el presente documento. Dicha molécula de ácido nucleico recombinante comprende las secuencias reguladoras en una forma "aislada", preferiblemente en combinación con una secuencia de ácido nucleico heteróloga que va a expresarse. Tal como se usa en el presente documento, el término "aislado" cuando se usa junto con una molécula de ácido nucleico/secuencias reguladoras de la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que se ha separado de un organismo en una forma sustancialmente purificada (es decir sustancialmente libre de otras sustancias que se originan de ese organismo), o una molécula de ácido

nucleico que tiene la misma secuencia de nucleótidos pero no necesariamente separada del organismo (es decir, moléculas de ácido nucleico sintetizadas o producidas de manera recombinante).

5           Preferiblemente y de la manera más prevista, las secuencias reguladoras descritas en la presente invención se unen operativamente a secuencias de ácido nucleico heterólogas, adicionales en una molécula de ácido nucleico recombinante. Tal como se detalla a continuación en el presente documento, dicha  
10           secuencia de ácido nucleico adicional puede ser un gen codificante así como una secuencia de ácido nucleico que, con la expresión, conduce a la producción de otra moléculas de ácido nucleico, como un constructo antisentido, una ribozima o similares.

15           Tal como se emplea en el presente documento, la expresión "molécula de ácido nucleico heteróloga", significa una molécula de ácido nucleico que preferiblemente se une operativamente a la secuencia reguladora descrita anteriormente pero que no es una molécula de ácido nucleico que codifica para anexina 5 o un  
20           fragmento de la misma. Por tanto, dicha "molécula de ácido nucleico heteróloga" se origina a partir de un contexto genético diferente que la secuencia reguladora descrita anteriormente. Ejemplos no limitativos de tales "moléculas de ácido nucleico heterólogas" se facilitan a continuación en el presente  
25           documento y comprenden en particular moléculas marcadoras, como luciferasa, galactosidasa, proteínas fluorescentes, GFP, eGFP, DsRed, etc. o moléculas etiqueta, como etiquetas Flag, CBP y otras. Todavía, se prevén también otros genes receptores, proteínas de superficie. También se prevén moléculas de ácido  
30           nucleico que no codifican para proteínas como "moléculas de ácido nucleico heterólogas". Tales ácidos nucleicos comprenden, pero no se limitan a, moléculas antisentido, aptámeros, ribozimas, moléculas de ARN de inhibición y similares, siendo particularmente útiles en una práctica de investigación.

35           La expresión "molécula de ácido nucleico recombinante" se refiere a moléculas de ácido nucleico que se originan a partir de un contexto genético diferente y se combinan mediante métodos

de biología molecular. En este caso, la expresión "contexto genético diferente" se refiere a genomas de diferentes especies, variedades o individuos o diferentes posiciones dentro de un genoma. Las moléculas de ácido nucleico recombinantes pueden  
5 contener no sólo secuencias naturales sino también secuencias, que, en comparación con las naturales están mutadas o modificadas químicamente o si no, las secuencias son secuencias totalmente recién sintetizadas.

Las moléculas de ácido nucleico recombinantes de la  
10 invención muestran una o más de las secuencias reguladoras descritas anteriormente en combinación con las secuencias de otro contexto genético. Un ejemplo de una molécula de ácido nucleico recombinante contiene una o más secuencias reguladoras de la invención o un promotor mínimo derivado y que puede  
15 obtenerse de las secuencias dadas a conocer en el presente documento en combinación con un gen distinto del gen de anexina A5, preferiblemente distinto del gen de anexina A5 humana. La expresión "molécula de ácido nucleico recombinante", por tanto, no se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una  
20 secuencia que codifica para anexina A5 bajo el control de las secuencias reguladoras proporcionadas en el presente documento.

Además, las moléculas de ácido nucleico recombinantes pueden contener, aparte de un promotor que contiene una o más secuencias reguladoras de la invención, una secuencia de  
25 poliligador ubicada en el sentido de 3' de la misma y que comprende uno o más sitios de restricción en los que pueden clonarse secuencias de nucleótidos mediante métodos conocidos por un experto, que entran de ese modo bajo el control de expresión del promotor.

Además, la molécula de ácido nucleico recombinante descrita  
30 en el presente documento puede contener una señal de terminación de la transcripción en el sentido de 3' del poliligador. Ejemplos de señales de terminación adecuadas se describen en el estado de la técnica. La señal de terminación puede, por  
35 ejemplo, ser la señal de poliadenilación de timidina cinasa. Las moléculas de ácido nucleico recombinantes descritas en el presente documento que preferiblemente contienen una secuencia

de nucleótidos que va a expresarse, pueden emplearse directamente para usos dentro del significado de la invención, tales como transfecciones de ADN, la generación de células huésped genéticamente modificadas o animales transgénicos no humanos. Además, dichas moléculas recombinantes pueden emplearse en los métodos de selección descritos en el presente documento así como en la práctica médica y científica.

Tal como se definió anteriormente, la molécula de ácido nucleico de la invención puede ser ADN, ARN así como APN. Por tanto, según la presente invención, la expresión "molécula de ácido nucleico" comprende también cualquier derivado viable de un ácido nucleico al que puede hibridarse una sonda de ácido nucleico. Dicha sonda de ácido nucleico en sí puede ser un derivado de una molécula de ácido nucleico que puede hibridar con dicha molécula de ácido nucleico o dicho derivado de la misma. La expresión "molécula de ácido nucleico" comprende además ácidos peptidonucleicos (APN) que contienen análogos de ADN con enlaces en la estructura principal de amida (Nielsen, Science 254 (1991), 1497-1500).

En el contexto de esta invención también se proporciona un vector que comprende la molécula de ácido nucleico tal como se define en las reivindicaciones. Dicho vector puede ser, entre otros, un vector de expresión o un vector de transferencia génica.

El término "vector" se refiere a moléculas de ácido nucleico circulares o lineales que pueden replicarse de manera autónoma en las células huésped en las que se introducen. Los vectores pueden contener las moléculas de ácido nucleico recombinantes anteriormente caracterizadas en su longitud completa o pueden contener, aparte de las secuencias reguladoras de la invención, los componentes descritos para las moléculas de ácido nucleico recombinantes, tal como promotor mínimo (que comprende al menos uno de los sustitutos definidos en el presente documento), poliligador y/o señal de terminación.

Los vectores de la invención pueden ser adecuados para la replicación en células huésped procariotas y/o eucariotas. Contienen un origen de replicación correspondiente. Los vectores

son preferiblemente adecuados para la replicación en células de mamífero, de manera particularmente preferible en células humanas.

5 Los vectores de la invención contienen preferiblemente un marcador de selección. Ejemplos de genes de marcador de selección son conocidos para un experto. Los genes de marcador de selección que son adecuados para la selección en células huésped eucariotas son por ejemplo, genes para dihidrofolato reductasa, G418 o resistencia a neomicina.

10 Los vectores de la invención son preferiblemente vectores de expresión para la expresión en células eucariotas. Tales vectores pueden construirse partiendo de vectores de expresión conocidos mediante el reemplazo de su promotor o las secuencias que no pertenecen a un promotor mínimo por las secuencias  
15 reguladoras de la invención o mediante la complementación con secuencias reguladoras (elementos reguladores) de esta invención. Ejemplos de vectores de expresión que pueden modificarse de esta manera son pcDV1 (Pharmacia), pRC/CMV, pcDNA1 o pcDNA3 (Invitrogen).

20 También se proporciona un huésped transformado con el vector tal como se define en el presente documento, mediante lo cual dicho huésped se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en una célula de mamífero, una célula de anfibio, una célula de insecto, una célula fúngica, una célula vegetal y una  
25 célula bacteriana. Ejemplos no limitativos de células de mamífero son células HeLa, células HepG2, células CHO, células 293 y células COS tal como se menciona a continuación. Células bacterianas adecuadas son aquéllas que generalmente se usan para clonación, tal como *E. coli* o *Bacillus subtilis*. Ejemplos de  
30 células fúngicas son células de levadura, preferiblemente las de los géneros *Saccharomyces* o *Pichia*, de manera particularmente preferible de *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris*. Las células animales adecuadas incluyen por ejemplo células de insecto, células de vertebrado, preferiblemente células de  
35 mamífero, tales como células CHO, COS7, HeLa, NIH3T3, MOLT-4, Jurkat, K562, HepG2, 293 y similares. Aún, se prevén también células primarias cultivadas, como trofoblastos placentarios o

cultivos celulares/células primarias de riñón o hígado. En la técnica se describen líneas celulares adecuadas adicionales y pueden obtenerse por ejemplo de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (*Deutsche Sammlung für*  
5 *Mikroorganismen und Zellkulturen*) (DSMZ, Braunschweig). En este contexto, ha de observarse que las células huésped pueden transfectarse con una secuencia reguladora, una secuencia de ácido nucleico recombinante o un vector de la invención. Estas células transfectadas son particularmente útiles en métodos  
10 científicos para la elucidación de la función de un promotor de ANXA-5 y/o ANXA-5 expresado. Aún, estas células pueden emplearse en sistemas de selección, por ejemplo selecciones de alto rendimiento, en las que los compuestos se someten a prueba para determinar su capacidad de activar o silenciar la secuencia  
15 reguladora de la invención, comprendiendo al menos una mutación tal como define en el presente documento.

También se prevé en la presente invención un organismo transgénico no humano, que son huéspedes en el sentido de la presente invención y que comprenden una molécula de ácido  
20 nucleico tal como se define en las reivindicaciones, es decir, un promotor de anexina 5 que comprende al menos una mutación tal como se proporciona en esta invención. En una realización preferida adicional, la invención se refiere a una célula/célula huésped genéticamente modificada que comprende la secuencia  
25 reguladora de ANXA5 que comprende al menos una mutación tal como se define en el presente documento, la molécula de ácido nucleico recombinante o el vector tal como se describió anteriormente. También se proporciona(n) (un) método(s) para preparar células huésped genéticamente modificadas,  
30 caracterizadas porque se transfectan las células huésped con uno de los vectores descritos anteriormente y se cultiva la célula huésped transfectada en un medio de cultivo.

La expresión "genéticamente modificado" significa que la célula huésped o el huésped contiene, además del genoma natural,  
35 una molécula de ácido nucleico o un vector de la presente invención, que se ha introducido en la célula huésped o el huésped o en un precursor. La molécula de ácido nucleico o el

vector pueden estar presentes en el huésped/célula huésped genéticamente modificado o bien como una molécula independiente fuera del genoma, preferiblemente como una molécula replicable, o bien puede integrarse de manera estable en el genoma de la  
5 célula huésped o el huésped.

La introducción de un vector en células huésped puede llevarse a cabo según métodos convencionales conocidos como por ejemplo los descritos en Sambrook (Russell "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001);  
10 Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1989), o Higgins y Hames (Eds.)). Ejemplos de técnicas de transfección aplicables son transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE dextrano, electroporación, transducción,  
15 infección, lipofección o transferencia biolística.

La invención se refiere en una realización preferida a una molécula de ácido nucleico aislada seleccionada del grupo que consisten en el haplotipo M1 y M2, en la que el haplotipo M1 comprende una secuencia tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2 y  
20 mediante lo cual dicha secuencia tiene en la posición 203 una sustitución de A por C y en la posición 229 una sustitución de T por C y en la que el haplotipo M2 comprende una secuencia tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2 y mediante lo cual dicha secuencia tiene en la posición 186 una sustitución de G por A,  
25 en la posición 203 una sustitución de A por C, en la posición 229 una sustitución de T por C y en la posición 276 una sustitución de G por A. La definición del haplotipo "M1" así como del haplotipo "M2" se facilitan también en los ejemplos adjuntos. El haplotipo "M1" y "M2" también se refiere a las  
30 mutaciones puntuales específicas proporcionadas en el presente documento y caracterizadas en cualquiera de las estructuras promotoras de ANXA5 adicionales proporcionadas en cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 3 ó 4 o tal como se muestra en la figura 2 adjunta. Por consiguiente, la invención también proporciona una  
35 molécula de ácido nucleico aislada seleccionada del grupo que consiste en el haplotipo M1 y M2, en la que dicho haplotipo M1

comprende una mutación puntual que se define como 1 A →C y una mutación puntual que se define como 27 T→C, y en la que dicho haplotipo M2 comprende las cuatro mutaciones puntuales tal como se definen en el presente documento, es decir, las mutaciones de adición -19 G→A y 76 G→A.

También se da a conocer un método para determinar el haplotipo de un elemento de regulación del gen ANXA5 en un individuo que comprende las etapas de

- (a) aislar un ácido nucleico de una muestra que se ha extraído del individuo;
- (b) determinar la presencia de los nucleótidos presentes en las posiciones 186, 203, 229 y 276 de la copia del individuo del elemento de regulación del gen ANXA5, determinándose los números de posición comparando con la SEQ ID NO: 2;
- (c) asignar a los individuos un haplotipo particular comparando los nucleótidos presentes en dichas posiciones con los nucleótidos referidos en los haplotipos que se definen como "M1" o "M2" anteriormente en el presente documento.

En una práctica médica, son particularmente importantes métodos *in vitro* para el diagnóstico. La presente invención proporciona herramientas importantes, con las que pueden detectarse "variantes genéticas" específicas de la región promotora de ANXA5 y mediante lo cual la detección es indicativa de un mayor riesgo de aborto/pérdida del embarazo y/o un mayor riesgo del desarrollo de anticuerpos antifosfolípidos. La presencia de anticuerpos antifosfolípidos en la circulación de la madre está asociada con el aumento de riesgo de muerte fetal tanto de embarazos de bajo riesgo como de alto riesgo, tal como se documenta en, entre otros, Empson (2002).

Sin restringirse a la teoría, la presente invención razona que la expresión reducida documentada del gen ANXA5, debido a la variación alélica documentada en el presente documento en su secuencia promotora, puede ser una causa directa para un menor enriquecimiento en anexina A5 en la superficie placentaria y es

muy probable que provoque el desarrollo de anticuerpos antifosfolípidos.

Por tanto, la invención también proporciona un método *in vitro* para diagnosticar o detectar una predisposición para una  
5 tendencia a la pérdida del embarazo y/o el desarrollo de anticuerpos antifosfolípidos, comprendiendo dicho método las etapas de

(a) examinar un elemento de regulación del gen ANXA5 para detectar al menos una mutación/sustitución puntual tal  
10 como se define en las reivindicaciones; y

(b) determinar si está presente cualquiera de la al menos una de dichas mutaciones puntuales.

Dicho método *in vitro* puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos en la técnica, tal como se describe a  
15 continuación en el presente documento y tal como se documenta en los ejemplos adjuntos.

Tal como se muestra en los ejemplos, la memoria descriptiva da a conocer un método *in vitro* para diagnosticar o detectar una predisposición o una tendencia al aborto (pérdida del embarazo),  
20 comprendiendo dicho método las etapas de

(a) determinar el haplotipo de un individuo según los métodos proporcionados en el presente documento;

(b) determinar si dicho individuo tiene un haplotipo "M1" o "M2" tal como se define en el presente documento o  
25 un haplotipo "N" "normal"/"de tipo natural", mediante lo cual el haplotipo N no comprende una mutación/sustitución puntual tal como se define en la invención.

(c) determinar si dicho individuo tiene un genotipo N/N, M1/N, M2/N, M1/M1, M2/M2 o M1/M2.  
30

El método correspondiente también es útil en el diagnóstico o la detección de una predisposición a o una tendencia a desarrollar anticuerpos antifosfolípidos.

Tal como se muestra en los ejemplos, un individuo  
35 "heterogéneo" u "homogéneo", es decir, un individuo que porta un "genotipo" M2/N, M2/M2 o M1/M2 tiene un mayor riesgo particular de aborto y se le debe proporcionar cuidado y supervisión médica

más cercana durante el embarazo. El experto en la técnica también puede determinar los haplotipos adicionales, como M1/N o M1/M1 con el fin de tomar medidas específicas en el cuidado y la supervisión médica, incluso si el "haplotipo M1" se asocia con un riesgo menor o incluso normal de aborto en comparación con el "haplotipo M2". Tal como se señaló anteriormente, puede llevarse a cabo la detección de al menos una mutación puntual tal como se describe en el presente documento o de un haplotipo tal como se describe en el presente documento mediante métodos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, la detección de dicha al menos una mutación puntual en dicho elemento de regulación del gen ANXA5 o puede llevarse a cabo dicha determinación del haplotipo o determinarse mediante técnicas de ácidos nucleicos basadas en el tamaño o la secuencia.

Dicha técnica basada en el tamaño o la secuencia puede seleccionarse del grupo que consiste en técnicas de hibridación, secuenciación de ácidos nucleicos, PCR, determinación de fragmentos de restricción, determinación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), LCR (reacción en cadena de ligamiento) o determinación de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Pueden obtenerse ejemplos correspondientes y detalles adicionales a partir de bibliografía recomendada técnica convencional (como Sambrook, Russell "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (2001); Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1989), o Higgins y Hames (Eds.)). Tal como se documenta en los ejemplos adjuntos, un método preferido particular en el contexto de esta invención es la determinación de fragmentos de restricción o el método de RFLP, que comprende de manera particularmente preferible la determinación de un sitio de restricción *BamHI*. Tal como se muestra en el presente documento, se determina la ausencia (*BamHI*<sup>-</sup>) o la presencia (*BamHI*<sup>+</sup>) de un sitio de restricción *BamHI*, y es indicativo de la ausencia o presencia de una mutación puntual tal como se define en el presente documento. Los detalles de este método se

facilitan en los ejemplos adjuntos y a continuación en el presente documento. En una realización, un tramo de ADN relevante puede amplificarse a partir de ADN genómico mediante tecnología de PCR. Los cebadores potenciales que pueden emplearse comprenden, pero no se limitan a, los cebadores que se proporcionan en la SEQ ID NO: 22 (ANX5.P.F) y la SEQ ID NO: 23 (ANX5.exI.R). El experto en la técnica está puede fácilmente deducir pares de cebadores adicionales o cebadores que van a emplearse con el fin de amplificar tramos relevantes del elemento de regulación/promotor de anexina A5 (ANXA5) definido en el presente documento. Tras obtenerse el amplicón (véase también la parte experimental), puede digerirse (digestión por restricción) con la enzima de restricción *BamHI* (que puede obtenerse de diversos fabricantes, entre otros: Roche Applied Science, Mannheim, Alemania; MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania; New England Biolabs, Frankfurt am Main, Alemania. De nuevo, se facilitan detalles en la parte experimental. Tras esta digestión, que se lleva a cabo según métodos bien conocidos en la técnica (véase entre otros Sambrook/Russel, 2001, (citado anteriormente)), puede llevarse a cabo el análisis adicional del sitio de restricción *BamHI*<sup>-</sup>/*BamHI*<sup>+</sup> mediante técnicas conocidas, como análisis en gel, por ejemplo análisis en gel de agarosa (véase también la parte experimental y, de manera ilustrativa, la figura 4 adjunta).

En una realización preferida de los usos y métodos de la invención dicho sitio de restricción *BamHI* es el sitio de restricción correspondiente a del nucleótido 276 al nucleótido 281 de la SEQ ID NO: 2; del nucleótido 1349 al nucleótido 1354 de la SEQ ID NO: 1; del nucleótido 337 al nucleótido 342 de la SEQ ID NO: 3 o corresponde a del nucleótido 284 al 289 de la SEQ ID NO: 4.

La ausencia de dicho sitio de restricción *BamHI* (*BamHI*<sup>-</sup>) es indicativo de una predisposición para el aborto, tal como ya se muestra en los ejemplos adjuntos.

Los métodos *in vitro* de la invención pueden comprender también la detección de dicha al menos una mutación puntual descrita en el presente documento o dicha determinación del

haplotipo tal como se describe en el presente documento, mediante lo cual se usan cebadores de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) adecuados. Por ejemplo,

- 5 (a) una mutación puntual que corresponde a la sustitución definida como -19 G→A en el presente documento puede comprender el uso de un cebador directo tal como se define en la SEQ ID NO: 8 ó 9 y un cebador inverso tal como se define en la SEQ ID NO: 10 (o SEQ ID NO: 13);
- 10 (b) una mutación puntual que corresponde a la sustitución definida como 1 A→C en el presente documento puede comprender el uso de un cebador directo tal como se define en la SEQ ID NO: 11 ó 12 y un cebador inverso tal como se define en la SEQ ID NO: 13 (o SEQ ID NO: 10);
- 15 (c) una mutación puntual que corresponde a la sustitución definida como 27 T→C en el presente documento puede comprender el uso de un cebador directo tal como se define en la SEQ ID NO: 14 ó 15 y un cebador inverso tal como se define en la SEQ ID NO: 16 (o SEQ ID NO: 7); y
- 20 (d) una mutación puntual que corresponde a la sustitución definida como 76 G→A en el presente documento puede comprender el uso de un cebador directo tal como se define en la SEQ ID NO: 5 ó 6 y un cebador inverso tal como se define en la SEQ ID NO: 7 (o SEQ ID NO: 16).

También puede llevarse a cabo la determinación del haplotipo tal como se describió anteriormente empleando cebadores (por ejemplo, en reacciones PCR y similares. Preferiblemente, dicha determinación del haplotipo comprende el uso de cebadores tal como se muestra en las SEQ ID NO: 5 a 16.

30 En una realización más preferida de la invención, se determina la ausencia o presencia de una mutación/sustitución puntual que corresponde a la posición 276 de un elemento de regulación del gen ANXA5 tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2, siendo preferiblemente dicha mutación/sustitución puntual una

35 sustitución de G por A.

Tal como se muestra en los ejemplos adjuntos, los métodos *in vitro* proporcionados en el presente documento se llevan a cabo de la manera más preferible en ADN genómico y dicho ADN genómico se aísla de una muestra biológica.

5 La muestra biológica puede seleccionarse, sin limitarse a, del grupo que consiste en sangre, suero, orina, líquido amniótico, secreciones vaginales, aspirados de pezón, esputo y muestras epiteliales mucosas.

10 La presente invención es particularmente útil en la monitorización de mujeres embarazadas o la monitorización de mujeres que pretenden quedar embarazadas. Dado que los métodos de la presente invención pueden llevarse a cabo en el ADN genómico de dichas mujeres, las muestras correspondientes pueden obtenerse fácilmente, por ejemplo con muestras orales.

15 La invención también proporciona un kit que comprende al menos un par de cebadores tal como se definió anteriormente en el presente documento. Dicho kit es particularmente útil en la preparación de una composición de diagnóstico para diagnosticar o detectar una predisposición para o una tendencia al aborto y/o  
20 para diagnosticar o detectar una predisposición para una tendencia a desarrollar anticuerpos antifosfolípidos.

Por consiguiente, la invención también se refiere al uso de al menos un par de cebadores tal como se define en el presente documento, la preparación de una composición de diagnóstico para  
25 diagnosticar o detectar una predisposición para o una tendencia al aborto y/o para diagnosticar o detectar una predisposición para el desarrollo de anticuerpos antifosfolípidos.

Además se proporciona el uso de una molécula de ácido nucleico que comprende al menos una mutación puntual tal como se  
30 define en el presente documento, la preparación de una composición de diagnóstico para diagnosticar o detectar una predisposición para o una tendencia al aborto y/o para diagnosticar o detectar una predisposición o una tendencia para el desarrollo de anticuerpos antifosfolípidos. Dicha molécula de  
35 ácido nucleico es particularmente útil en métodos de diagnóstico como marcador y/o patrón comparativo que comprenden al menos una mutación definida tal como se describe en el presente documento.

En la presente invención se dan a conocer medios y métodos para seleccionar, en particular, ADN genómico para detectar la presencia o ausencia de mutaciones puntuales específicas en el elemento de regulación del gen ANXA5. Por tanto, también se proporciona un método de diagnóstico o detección de una predisposición para o una tendencia al aborto en un individuo y/o un método de diagnóstico o detección de una predisposición o una tendencia para el desarrollo de anticuerpos antifosfolípidos que comprenden la etapa de determinar si dicho individuo porta al menos una de las al menos una mutación/sustitución puntual tal como se define en el presente documento, concretamente, la sustitución -19 G→A, 1 A→C, 27 T→C y/o 76 G→A.

Dicho método de diagnóstico o detección puede comprender los métodos *in vitro* para detectar una mutación puntual tal como se dio a conocer anteriormente en el presente documento. El método de diagnóstico se emplea de la manera más preferible en la selección de mujeres que están embarazadas o que pretenden quedar embarazadas. Los métodos y análisis correspondientes de los resultados obtenidos se proporcionan en los ejemplos adjuntos, no limitativos.

En una realización adicional de la presente invención se proporciona un método de selección de moléculas que pueden interaccionar con un elemento de regulación del gen ANXA5 mutado tal como se definió anteriormente en el presente documento, que comprende las etapas de

- (a) poner en contacto una molécula de ácido nucleico que comprende al menos una mutación en el elemento regulador del gen ANXA5 tal como se proporciona en el presente documento o poner en contacto un vector o un huésped que comprende una molécula de ácido nucleico de este tipo con una molécula candidata;
- (b) medir y/o detectar una respuesta; y
- (c) comparar dicha respuesta con una respuesta patrón que se mide en ausencia de dicha molécula candidata; y

(d) comparar dicha respuesta con una respuesta obtenida con dicha molécula candidata y el promotor de ANXA5 no mutado (de tipo natural).

En el método de selección proporcionado para moléculas de interacción, son particularmente útiles las moléculas de ácido nucleico definidas anteriormente que comprenden un elemento regulador de gen tal como se define en el presente documento (y que comprenden al menos una mutación tal como se da a conocer en su invención), y que se unen operativamente a un gen indicador y/o marcador. Los compuestos que van a seleccionarse se examinan para determinar su interacción directa o indirecta de la secuencia reguladora proporcionada en el presente documento.

Dicha "puesta en contacto" puede llevarse a cabo *in vivo* así como *in vitro*. Por ejemplo, se prevé que dicho animal transgénico se pone en contacto *in vivo* con el/los compuesto/candidatos que van a someterse a prueba. Dicho(s) compuesto(s) puede(n) inyectarse, entre otros, a dicho animal, por ejemplo mediante inyección intracerebral/intracraneal. De manera similar, las células transfectadas con una molécula de ácido nucleico recombinante tal como se dan a conocer en el presente documento puede ponerse en contacto *in vitro* con los compuestos que va someterse a prueba, por ejemplo introduciendo los compuestos de prueba en el medio de cultivo. La detección, si dicho(s) compuesto(s) puede(n) interaccionar con la secuencia reguladora de la invención, puede implicar la detección, si la secuencia reguladora está activada. Un buen sistema celular que va usarse con el fin de evaluar si la secuencia reguladora del gen ANXA5 mutada está activa, puede seleccionarse del grupo que consiste en células HeLa, HEK293, HepG2, BeWo, células de riñón y similares. La respuesta obtenida cuando se selecciona un compuesto que interacciona con la secuencia reguladora del gen ANXA5 mutada puede compararse con una respuesta obtenida con el mismo compuesto que va a seleccionarse y que usa una secuencia reguladora del gen ANXA5 de "tipo natural", no mutada.

La expresión "poner en contacto una molécula de ácido nucleico recombinante de la invención con (un) compuesto(s) que se sospecha que interacciona(n) directa o indirectamente con

dicha secuencia reguladora" puede comprender pruebas de interacción. Tales pruebas pueden llevarse a cabo mediante ensayos bioquímicos, inmunológicos específicos y/o ensayos genéticos que se conocen en la técnica y comprenden ensayos 5 homogéneos y heterogéneos. Por ejemplo, en el método de la presente invención, los ensayos de interacción que van a emplearse según esta invención pueden usarse para detectar como respuesta la interacción directa o indirecta de la secuencia reguladora con la molécula candidata. Dichos ensayos de 10 interacción que emplean sistemas de lectura se conocen bien en la técnica y comprenden, entre otros, dos selecciones de hibridación, (tal como se describe, entre otros, en los documentos EP-0 963 376, WO 98/25947, WO 00/02911 y modificados para la detección de componentes de interacción para las 15 secuencias reguladoras de la invención), columnas de precipitación (pull-down) de GST, ensayos de coprecipitación de extractos celulares tal como se describe, entre otros, en Kasus-Jacobi, Oncogene 19 (2000), 2052-2059, sistemas de "interacción-trampa" (tal como se describe entre otros, en el documento US 20 6.004.746), ensayos de unión *in vitro* y similares. Métodos de ensayo de interacción adicionales y los sistemas de lectura correspondientes se describen, entre otros, en los documentos US 5.525.490, WO 99/51741, WO 00/17221, WO 00/14271, WO 00/05410. Según esta invención son de particular relevancia los ensayos de 25 interacción que comprenden métodos bioquímicos/genéticos como por ejemplo, ensayos de desplazamiento de banda que se emplean para deducir, entre otros, compuestos proteínicos que pueden interaccionar con secuencias reguladoras/promotores, en particular con promotores que comprenden al menos una mutación 30 tal como se proporciona en el presente documento.

Además, el método anteriormente referido para seleccionar compuestos que pueden regular el promotor de ANXA5 y en particular un promotor de ANXA5 que comprende al menos una mutación tal como se define en el presente documento puede 35 comprender la selección de sustancias que pueden inducir una diferenciación y/o un programa de expresión génica en una célula de prueba/huésped que comprende la secuencia reguladora de la

presente invención. Dichos métodos de selección también pueden comprender la selección de compuestos que activan, directa o indirectamente, la secuencia reguladora mutada de ANXA5 tal como se define en el presente documento. Por consiguiente, la presente invención también proporciona métodos de selección de fármacos, según los cuales estos fármacos pueden ser útiles en el tratamiento o la prevención de trastornos que se relacionan con el aborto/pérdida del embarazo y/o el desarrollo de anticuerpos antifosfolípidos.

10 Por consiguiente, un agente puede "interaccionar con la secuencia reguladora" de la presente invención, cuando una lectura correspondiente puntúe positiva o negativamente. Por ejemplo, un agente candidato puede provocar la expresión de un gen marcador o indicador, como eGFP, DsRed o GFP bajo el control de la secuencia reguladora de ANXA5 mutada descrita en el presente documento. En este caso, el compuesto candidato ha interaccionado, o bien directa o bien indirectamente, con dicha secuencia reguladora. Se prevé una interacción directa, entre otros, a partir de un factor de transcripción específico que puede unirse a la secuencia reguladora mutada de la invención y de provocar la transcripción. Un ejemplo de la interacción indirecta del compuesto candidato comprende, pero no se limita a, la participación de una ruta de transducción de señales.

20 La comparación anteriormente mencionada entre la respuesta tras poner en contacto la secuencia reguladora mutada de la invención con dicha molécula candidata y la respuesta patrón que se mide en ausencia de dicha molécula candidata en comparación con la secuencia reguladora del gen ANXA5 (de tipo natural) no mutada puede proporcionar la presencia, ausencia, disminución o el aumento de una señal específica en el sistema de lectura. Dicho sistema de lectura, tal como se describe en el presente documento puede ser, por ejemplo, un sistema de lectura bioquímico o uno fisiológico. También se prevén los sistemas de lectura genéticos. Una señal específica que se aumenta por encima de la señal/respuesta patrón puede clasificarse de este modo como que es un activador de la secuencia reguladora de ANXA5 mutada proporcionada en el presente documento, mientras

que una disminución de la señal puede clasificarse como que es de diagnóstico para un inhibidor de la función o la expresión de la secuencia reguladora de ANXA5.

De uso particular en la presente invención es también un  
5 fragmento de ácido nucleico de las moléculas de ácido nucleico tal como se definió anteriormente, concretamente de una secuencia reguladora de ANXA5 mutada, comprendiendo dicho fragmento al menos 15 nucleótidos y comprendiendo dicho fragmento al menos una mutación/sustitución puntual tal como se  
10 define en el presente documento.

Dicho fragmento de ácido nucleico puede ser particularmente útil en los métodos de selección proporcionados en el presente documento. Son útiles de manera similar oligómeros que consisten en al menos una secuencia y que tienen una longitud de al menos  
15 20 nucleótidos, que pueden hibridarse específicamente con una molécula de ácido nucleico tal como se define en las reivindicaciones, es decir, una secuencia reguladora mutada de ANXA5 que comprende al menos una mutación tal como se define en el presente documento. Dicho oligómero debe poder hibridarse con  
20 fragmentos de ácido nucleico que comprenden al menos 15 nucleótidos y que comprenden al menos una mutación puntual tal como se define en el presente documento.

Por tanto, la invención también proporciona un oligómero que consiste esencialmente en al menos una secuencia de bases y  
25 que tiene una longitud de al menos 10 nucleótidos que hibrida o que puede hibridar con los fragmentos de ácido nucleico tal como se definió anteriormente y que comprende al menos una mutación puntual tal como se proporciona en el presente documento. Como ejemplo específico de un oligómero de este tipo es o comprende  
30 la secuencia de ácido nucleico tal como se muestra en la SEQ ID NO: 21. Los oligómeros descritos en este caso pueden ser, entre otros, un oligonucleótido o un oligómero de ácido peptidonucleico (APN).

Esta invención comprende también un juego de oligómeros que  
35 comprende al menos dos oligómeros tal como se define en el presente documento. Dichos oligómeros y/o dicho juego de oligómeros son particularmente útiles en los métodos de

selección así como en los usos de diagnóstico proporcionados en el presente documento.

Por consiguiente, la invención también se refiere al uso de un oligonucleótido/oligómero tal como se definió anteriormente o de un juego de oligómeros proporcionados en el presente documento para detectar una mutación/sustitución puntual tal como se define en esta invención, o para detectar polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) dentro de las secuencias tomadas de las SEQ ID NO: 1, 2, 3 ó 4.

Los oligómeros proporcionados en el presente documento y que pueden interaccionar con moléculas de ácido nucleico que comprenden al menos una mutación puntual tal como se proporciona en el presente documento, también pueden ser útiles en selecciones de alto rendimiento (HTP). Por consiguiente, estos oligómeros también pueden emplearse en la producción de "análisis génicos" o "chips génicos". Por tanto, la invención también proporciona un método para fabricar una disposición de diferentes oligómeros (matriz) fijada a un material portador, comprendiendo dicho método el acoplamiento de al menos un oligómero o un juego de oligómeros tal como se define en el presente documento a una fase sólida. También se comprende una disposición de oligómeros (matriz) que puede obtenerse mediante el método de fabricación tal como se dio a conocer anteriormente.

En la técnica se conoce bien la preparación de matrices. Una visión general de la técnica anterior en la fabricación de matrices de oligómeros puede recogerse de una edición especial de Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volumen 21, enero de 1999), publicada en enero de 1999, y de la bibliografía citada en la misma.

A menudo se usan sondas marcadas con fluorescencia para la exploración de matrices de ADN inmovilizadas. La unión simple de los colorantes Cy3 y Cy5 al OH en 5' de la sonda específica es particularmente adecuada para marcadores fluorescentes. La detección de la fluorescencia de las sondas hibridadas puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante un microscopio confocal.

Los colorantes Cy3 y Cy5, además de muchos otros, están comercialmente disponibles.

Según la presente invención, se prefiere que esté presente una disposición de diferentes oligonucleótidos y/u oligómeros de APN (denominada "matriz"), puesta a disposición en la presente invención, de una manera que se una asimismo a una fase sólida. Esta matriz de diferentes secuencias de oligómeros de APN y/u oligonucleótidos puede caracterizarse porque se dispone en la fase sólida en forma de una estructura reticular rectangular o hexagonal. La superficie de fase sólida preferiblemente está compuesta de silicio, vidrio, poliestireno, aluminio, acero, hierro, cobre, níquel, plata u oro. Sin embargo, son alternativas adecuadas nitrocelulosa así como plásticos tales como nailon que pueden existir en forma de aglomerados o también como matrices de resina.

Por tanto, un objeto adicional de la presente invención es un método para fabricar una matriz fijada a un material portador para el tratamiento y monitorización mejorados de trastornos proliferativos de células de mama. En dicho método al menos un oligómero según la presente invención se acopla a una fase sólida. Se conocen métodos para fabricar tales matrices, por ejemplo de la patente estadounidense 5.744.305 mediante química de fase sólida y grupos protectores fotolábiles.

Un objeto adicional de la presente invención se refiere a un chip de ADN para el tratamiento y la monitorización mejorados de mujeres embarazadas o mujeres que van a monitorizarse para un posible embarazo. El chip de ADN contiene al menos un ácido nucleico según la presente invención. Se conocen chips de ADN, por ejemplo, en la patente estadounidense 5.837.832.

Además, un objeto de la presente invención es un kit que puede estar compuesto, por ejemplo, por un grupo de oligonucleótidos cebadores que contienen al menos dos oligonucleótidos cuyas secuencias, en cada caso, corresponden a o son complementarias a un segmento de al menos 10, preferiblemente al menos 18 bases de longitud de las secuencias de bases especificadas en las SEQ ID NO: 1 a 4 que comprenden al

menos una mutación tal como se proporciona en el presente documento.

Los métodos y los ensayos mencionados anteriormente se usan preferiblemente en el examen de ADN genómico. El ADN genómico se  
5 obtiene del ADN de la célula, tejido u otras muestras de pruebas usando métodos convencionales. Esta metodología convencional se encuentra en referencias tales como Fritsch y Maniatis eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989.

La presente invención proporciona métodos y ácidos  
10 nucleicos para el análisis de muestras biológicas para detectar características asociadas con el desarrollo de anticuerpos antifosfolípidos y/o el pronóstico de aborto/pérdida del embarazo. La invención se caracteriza porque el ácido nucleico sospechoso de comprender al menos una mutación tal como se  
15 proporciona en el presente documento se pone(n) en contacto con un reactivo o series de reactivos que pueden distinguir entre un ácido nucleico que comprende dicha(s) mutación/mutaciones y una secuencia promotora de ANXA5 de tipo natural dentro de las  
20 secuencia genómica (o dentro de una parte de dicha secuencia genómica) de interés. La presente invención pone a disposición un método para determinar parámetros genéticos de ADN genómico. El método es para su uso para la determinación del pronóstico de posible aborto/pérdida del embarazo. La invención presenta mejoras con respecto al estado de la técnica porque mediante los  
25 métodos y compuestos descritos en el presente documento un experto en la técnica puede llevar a cabo un ensayo de detección sensible y específico de materia celular que comprende las mutaciones específicas proporcionadas en el presente documento. Esto es particularmente útil dado que permite el análisis de  
30 muestras de, por ejemplo, líquidos corporales. La información generada es útil en la selección de un tratamiento o una monitorización del paciente. Si se determina una mutación tal como se proporciona en el presente, puede ser necesario un tratamiento adicional.

35 La mayoría de las técnicas proporcionadas en el presente documento se basan en métodos de biología molecular conocidos y comprenden el uso de sondas y/o cebadores específicos que pueden

detectar/amplificar moléculas de ácido nucleico que comprenden al menos una mutación tal como se define en el presente documento.

En una realización preferida dichos métodos se logran poniendo en contacto secuencias de ácido nucleico en una muestra biológica obtenida de un sujeto con al menos un reactivo o una serie de reactivos, en la que dicho reactivo o serie de reactivos distingue entre las secuencias reguladoras del gen ANXA5 de tipo natural y una secuencia reguladora del gen ANXA5 que comprende al menos una mutación tal como se define en la presente invención.

En una realización, el método comprende las siguientes etapas:

En la primera etapa del método, se aísla la muestra de ADN genómico de fuentes tales como células o componentes celulares que contienen ADN, fuentes de ADN que comprenden, por ejemplo, tejido de ovario, tejido de mama así como sangre, plasma, esputos, líquido linfático, tejido linfático, células de conductos, líquido de lavado de conductos, líquido de aspiración del pezón y combinaciones de los mismos. También se prevén sondas derivadas de hisopos orales. La extracción puede ser por medios que son convencionales para un experto en la técnica, incluyendo estos el uso de lisados de detergente, sonificación y agitación con vortex con perlas de vidrio. Una vez que se han extraído los ácidos nucleicos, se usa el ADN bicatenario genómico en el análisis.

En los ejemplos adjuntos se dan detalles de métodos correspondientes de la presente invención.

En una realización, el ADN puede escindirse antes de la siguiente etapa del método, esto puede ser mediante cualquier medio convencional en el estado de la técnica, en particular, pero sin limitarse a, con endonucleasas de restricción. Los ejemplos adjuntos proporcionan una técnica en la que se emplea *BamH1* para detectar al menos una mutación puntual tal como se define en el presente documento.

Además, se prevén métodos de PCR tal como se mencionó anteriormente. Se amplifican fragmentos (por ejemplo,

preferiblemente fragmentos que comprenden aproximadamente 100 pb o lo más preferiblemente al menos 50 pb) del ADN genómico, usando juegos de oligonucleótidos cebadores, y una polimerasa, preferiblemente termoestable. Debido a consideraciones estadísticas y prácticas, se amplifican preferiblemente más de seis fragmentos diferentes que tienen una longitud de 50-2000 pares de bases (pb). Sin embargo, pueden amplificarse fragmentos de al menos 50 pb. La amplificación de varios segmentos de ADN puede llevarse a cabo simultáneamente en un mismo recipiente de reacción. Habitualmente, la amplificación se lleva a cabo mediante dicha reacción en cadena de la polimerasa (PCR). De nuevo, en la parte experimental se facilitan ejemplos correspondientes.

Un experto en la técnica conoce el diseño de tales cebadores. Estos deben incluir al menos dos oligonucleótidos cuyas secuencias son, cada una, complementarias inversas o idénticas a al menos un segmento de 18 pares de bases de longitud de las siguientes secuencias de bases especificadas en el apéndice: SEQ ID NO 1 a 4 y que comprende al menos una mutación tal como se proporciona en el presente documento. Dichos oligonucleótidos cebadores se caracterizan preferiblemente porque pueden detectar al menos una mutación tal como se proporciona en el presente documento. En una realización particularmente preferida del método, la secuencia de dichos oligonucleótidos cebadores se diseña de modo que se aparee selectivamente y amplifique sólo el ADN específico de interés (que comprende dicha al menos una mutación), minimizando de ese modo la amplificación de ADN de fondo o no relevante. En el contexto de la presente invención, ADN de fondo quiere decir ADN genómico que no tiene una mutación relevante en la región promotora de ANXA5 o que no está relacionada con el promotor de ANXA5. Se facilitan cebadores preferidos en los ejemplos adjuntos y comprenden, entre otros, los cebadores tal como se muestran en las SEQ ID NO: 5 a 16.

Según la presente invención, también se prevé que al menos un oligonucleótido cebador se una a una fase sólida durante la amplificación. Las diferentes secuencias de oligonucleótidos y/u

oligómeros de APN pueden disponerse sobre una fase sólida plana en forma de una estructura reticular rectangular o hexagonal, estando compuesta preferiblemente la superficie de la fase sólida por silicio, vidrio, poliestireno, aluminio, acero, 5 hierro, cobre, níquel, plata u oro, siendo también posible que se usen otros materiales tales como nitrocelulosa o plásticos.

Los fragmentos obtenidos mediante la amplificación pueden llevar un marcador directa o indirectamente detectable. Se prefieren marcadores en forma de marcadores de fluorescencia, 10 radionúclidos o fragmentos de moléculas desprendibles que tienen una masa típica que puede detectarse en un espectrómetro de masas.

En la siguiente etapa, se analizan los amplificadores de ácido nucleico con el fin de determinar el estado de mutación del ADN genómico. 15

En una realización de los métodos dados a conocer en el presente documento, puede determinarse el estado de mutación del promotor de ANXA5 mediante análisis de hibridación. En esta realización, los amplificadores, entre otros, se hibridan con una 20 matriz o un juego de oligonucleótidos y/o sondas de APN. En este contexto, la hibridación puede tener lugar de la manera que se describe a continuación.

El juego de sondas usadas durante la hibridación está compuesto preferiblemente por al menos 4 oligonucleótidos u 25 oligómeros de APN. En el procedimiento, los amplificadores sirven como sondas que se hibridan con oligonucleótidos previamente unidos a una fase sólida. Posteriormente, se eliminan los fragmentos no hibridados. Dichos oligonucleótidos contienen al menos una secuencia de bases que tiene una longitud de 10 30 nucleótidos que es complementaria inversa o idéntica a un segmento de la molécula de ácido nucleico que comprende al menos una mutación tal como se define en el presente documento para un fragmento de dicha molécula de ácido nucleico, mediante lo cual dicho fragmento comprende al menos una mutación tal como se 35 define en el presente documento o mediante lo cual dicho fragmento se refiere a un fragmento del promotor de ANXA5.

Entonces, se eliminan los amplificadores no hibridados. En la etapa final del método, se detectan los amplificadores hibridados. En este contexto, se prefiere que los marcadores unidos a los amplificadores puedan identificarse en cada posición de la fase sólida en la que se ubica una secuencia de oligonucleótido.

En una realización preferida del método, puede determinarse el estado de mutación del promotor de ANXA5 mediante sondas de oligonucleótido que se hibridan con el ADN tratado simultáneamente con los cebadores de amplificación por PCR.

Una realización particularmente preferida de este método es el uso de PCR cuantitativa en tiempo real basada en fluorescencia (Heid *et al.*, *Genome Res.* 6:986-994, 1996) empleando una sonda de oligonucleótido fluorescente doblemente marcada (PCR TaqMan™, usando un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7700, Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, California). La reacción de PCR TaqMan™ emplea el uso de un oligonucleótido de búsqueda no extensible, denominado sonda TaqMan™, que se diseña para hibridar con una secuencia rica en GpC ubicada entre los cebadores de amplificación directo e inverso. La sonda TaqMan™ comprende además un "resto indicador" fluorescente y un "resto extintor" unido covalentemente a los restos conectores (por ejemplo, fosforamidas) unidos a los nucleótidos del oligonucleótido TaqMan™.

Las sondas de oligómero así como los cebadores según la presente invención constituyen herramientas importantes y eficaces que, por primera vez, hacen posible determinar parámetros específicos durante el análisis y la monitorización del embarazo humano. Dichos oligonucleótidos permiten el tratamiento y la monitorización mejorados de mujeres en peligro de aborto/pérdida del embarazo.

Las figuras muestran:

Figura 1: Cromatogramas de secuencias de variantes alélicas del promotor de ANXA5 *BamHI*. N/N = tipo natural, M/N = heterocigoto, M/M = homocigoto para el alelo de *BamHI*.

Figura 2: Estructura de la región promotora central de ANXA5. Los límites de la región están marcados con barras verticales y se enumeran según la posición del primer punto de iniciación de la transcripción (tsp1). El exón 1 no traducido está sombreado en gris. Las secuencias consenso de factores de transcripción están en letra minúscula y las abreviaturas de los factores de transcripción correspondientes están en cursiva sobre las filas de la secuencia. Los sitios de transcripción *NotI* y *BamHI* están subrayados y la secuencia del tramo de ADN de tipo Z en el promotor está en cursiva. Los nucleótidos que marcan los puntos de iniciación de la transcripción (tsp) están subrayados. Las regiones importantes para la función promotora (por consiguiente motivos A y B) ocupan las posiciones de nucleótido 295-311 y 328-337. Los nucleótidos cambiados en el haplotipo de *BamHI*<sup>-</sup> están en negrita y los nucleótidos sustituyentes se indican en letras mayúsculas en negrita sobre las posiciones respectivas de correspondencia.

Figura 3. Mediciones de las actividades de variantes del promotor de anexina A5 (ensayos con gen indicador de luciferasa). N denomina la secuencia promotora de tipo natural, que se normaliza como 100% de actividad. M1 contiene los cambios de nucleótidos 1A→C y 27T→C, y la variante M2 alberga las cuatro sustituciones (-19G→A, 1A→C, 27T→C y 76G→A), características de la variante del promotor de ANXA5 *BamHI*<sup>-</sup>.

Figura 4. Digestión por restricción con *BamHI* para la detección del alelo de promotor de ANXA5 *BamHI*<sup>-</sup>. Carril 1, producto de PCR de un genotipo de tipo natural (N/N); carril 2, (M/N), heterocigosidad para el alelo *BamHI*<sup>-</sup>; carril 3, (M/M), homocigosidad para la variante *BamHI*<sup>-</sup>; L es un patrón de tamaño (marcador de tamaño molecular de 100 pb, MBI Fermentas)

Los ejemplos ilustran la invención.

**Ejemplo I: Materiales y métodos usados en la presente invención**  
*Pacientes con pérdida recurrente del embarazo*

5 Se examinaron setenta pacientes originarias del norte de Europa con una pérdida repetida del embarazo (más de dos muertes fetales), que fueron remitidos para consejo genético al Instituto de Genética, University Clinics Muenster, para detectar mutaciones en el gen ANXA5. Estos pacientes se  
10 examinaron previamente para detectar las mutaciones de PTm y el factor V de Leiden y se encontró que no eran portadoras.

El estudio cumple las directrices éticas de las instituciones implicadas. Se obtuvo consentimiento informado de todos los sujetos examinados.

15

*Análisis de la secuencia del gen ANXA5*

Se realizó el análisis de toda la secuencia codificante de ANXA5, junto con 60-80 pb de los intrones flanqueantes y la región promotora del gen (el primer exón no traducido y  
20 aproximadamente 270 pb en el sentido de 5' en la UTR en 5'). Tras la amplificación por PCR de las regiones genómicas relevantes, se realizó una secuenciación directa de amplicones usando un secuenciador automático, el analizador de ADN ABI PRISM® 3700 (ABI/Perkin-Elmer, Weiterstadt, Alemania).

25

*Selección de los pacientes y el grupo control*

Se analizó la frecuencia en la población de los alelos de variantes de promotor M1 y M2 en la muestra de 533 personas control de sexo femenino anónimas por debajo de la edad  
30 reproductiva, originarias del noroeste de Alemania, así como en el grupo de pacientes descrito anteriormente de 70 grupos. Se determinaron alelos M2 (variantes *BamHI*<sup>-</sup>) mediante digestión con *BamHI* de amplicones compuestos por la secuencia de la región promotora de ANXA5 de 436 pb. Se confirmaron las cualidades de  
35 portadores de *BamHI*<sup>-</sup> heterocigotos y homocigotos mediante secuenciación de los amplicones respectivos en todos los pacientes *BamHI*<sup>-</sup> y sujetos control. Se examinaron adicionalmente

los portadores *BamHI*<sup>+</sup> para detectar la presencia de mutaciones 1A→C y 27T→C (haplotipo M1), usando amplificación por PCR específica de alelo con los cebadores 5' CCCTGGCGGGGGTGGGA 3' (SEQ ID NO: 11) y 5' CCCTGGCGGGGGTGGGC 3' (SEQ ID NO: 12) con el  
5 cebador inverso 5' GTTGTGGGTAAATCCAGCGCA 3' (SEQ ID NO: 13), que diferencian las variantes 1A y 1C y los cebadores 5' CCGGGCAGGGCCGGGGT 3' (SEQ ID NO: 14) y 5' CCGGGCAGGGCCGGGGC 3' (SEQ ID NO: 15) con el cebador inverso 5' GAACCGGGACACAGAAAC 3' (SEQ ID NO: 16), que diferencian las variantes 27T y 27C. Se  
10 secuenciaron adicionalmente amplicones de todos los portadores de M1 heterocigotos y homocigotos determinados mediante amplificación por PCR específica de alelo en los grupos de pacientes y de control para confirmar las mutaciones 1A→C y 27T→C. En el grupo control, se determinaron los genotipos M1 y  
15 M2 mediante secuenciación de la región promotora relevante.

*Determinación del haplotipo para los alelos M1 y M2 (BamHI<sup>-</sup>) de ANXA5*

Se clonaron amplicones de pacientes o sujetos control que  
20 contenían 436 pb del promotor de ANXA5 y caracterizados por dos (1A→C y 27T→C) o cuatro (-19G→A, 1A→C, 27T→C y 76G→A) mutaciones en el vector pGL3-Basic (Promega, Friburgo, Alemania). Se seleccionaron al azar diez clones que llevaban el inserto de amplicones que contenían las cuatro mutaciones y se  
25 hidrolizó el ADN de plásmido con *BamHI* y se secuenciaron los insertos de clones *BamHI*<sup>+</sup> y *BamHI*<sup>-</sup> en ambas direcciones. Se secuenciaron directamente los insertos clonados de amplicones que contenían las dos mutaciones (1A→C y 27T→C) en ambas direcciones a partir de los diez clones seleccionados al azar.

30

*Ensayos con genes indicadores*

Se realizaron análisis en paralelo para las variantes de promotor de ANXA5 M1 y M2 (*BamH*<sup>-</sup>), para evaluar su relevancia para la expresión del gen. Se seleccionó un gen de luciferasa,  
35 contenido en el vector pGL3-Basic como indicador. Un gen de beta-galactosidasa bajo el promotor de CMV fuerte sirvió como

patrón interno (BD Biosciences Clontech, Heidelberg). Se expresaron los constructos en células HeLa y se midieron las actividades del indicador. Se repitieron las mediciones cada 3 veces, para cinco expresiones de constructos independientes y se  
5 presentaron todos los valores como razones con respecto a la actividad de beta-galactosidasa estimada.

#### *Análisis estadístico*

Se compararon las distribuciones genotípicas y alélicas en  
10 casos y controles usando pruebas de  $\chi^2$  y análisis de regresión logística. Se usaron métodos de simulación informatizados para someter a prueba desviaciones en las frecuencias genotípicas con respecto a las esperadas según el equilibrio de Hardy-Weinberg, así como para construir intervalos de confianza del 95% para  
15 estimaciones de las frecuencias génicas y el cálculo de razones de probabilidades. Se llevaron a cabo los análisis con software de la biblioteca SAS v8 y la calculadora EpiMax basada en web; véase, entre otros, [www.healthstrategy.com/epiperl/epiperl.htm](http://www.healthstrategy.com/epiperl/epiperl.htm). Sin embargo, puede usarse otro software comúnmente usado tal  
20 como se proporciona, entre otros, por ISI (Instituto Internacional de Estadística, ("International Statistical Institute")).

#### **Ejemplo II: Identificación de mutaciones del promotor de ANXA5 específicas**

  
25

Mediante el examen sistemático de mutaciones de exones conjuntamente con los límites exón-intrón y 270 pb de la región no traducida en 5' del gen, se identificaron cuatro sustituciones de nucleótidos consecutivas en el promotor de  
30 ANXA5 en el grupo de pacientes. Éstas se enumeran partiendo del primer punto de iniciación de la transcripción, tsp1, (+1). Estas sustituciones son tal como siguen: -19G→A, 1A→C, 27T→C y 76G→A. En el presente documento se proporciona numeración alternativa y hace referencia a las secuencias proporcionadas en  
35 el presente documento. Se heredan los cuatro cambios juntos o sólo dos de ellos (1A→C y 27T→C) como haplotipos, es decir, o

bien los cuatros están en la misma cadena de ADN, haplotipo M2, o bien los dos cambios "del medio" (1A→C y 27T→C) se encuentran en la misma cadena de ADN, haplotipo M1 (resultados de la subclonación y secuenciación de alelos). La cuarta sustitución, 76G→A, cambia un sitio de restricción *BamHI* existente, el alelo del promotor mutante resultante que contiene los cuatro reemplazos de nucleótidos se denomina "alelo *BamHI*<sup>-</sup>". La figura 1 representa conjuntos de cromatogramas de la secuencia de un amplicón en portadores de tipo natural (-/-, es decir, *BamHI*<sup>+</sup>/*BamHI*<sup>+</sup>), heterocigotos (*BamHI*<sup>+</sup>/*BamHI*<sup>-</sup>) y homocigotos (*BamHI*<sup>-</sup>/*BamHI*<sup>-</sup>) del alelo *BamHI*<sup>-</sup>. La sustitución 76G→A es bien visible. Además, se estimó la distribución de los alelos M1 y M2 en pacientes y en un grupo control de 500 individuos (véase en Materiales y métodos, selección de los pacientes y el grupo control). Los resultados de las distribuciones de alelos M1 y M2 en pacientes y controles se resumen en la siguiente tabla 1. En la primera serie de análisis estadísticos con 500 sujetos control de sexo femenino sin historia registrada de pérdidas recurrentes del embarazo (supercontroles), se observó una desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg en cuanto a la presentación del alelo M2 en este grupo (D=0,026, IC del 95%: 0,016-0,038). Se confirma esta desviación usando tanto una prueba de  $\chi^2$  ( $\chi^2 = 105,2$ , d.f. = 2,  $p < 0,0001$ ) como usando una prueba de simulación (valor de  $p < 0,0001$ ). Los datos sugieren que en la muestra control, los heterocigotos están subrepresentados (31 observados frente a ~49 pronosticados según H-W), mientras que los homocigotos para *BamHI*<sup>-</sup> están sobrerrepresentados (10 observados, ~2 pronosticados).

**Tabla 1.** Distribuciones de genotipos de los alelos M1 y M2 del promotor de ANXA5 en pacientes y en controles.

Genotipo	Pacientes		Controles		RP	IC
	Observados	Esperados	Observados	Esperados		
N/N	45 (64,3%)	44,8	415 (77,8%)	413,3	1,000	n.a.

41

N/M1	6 (8,6%)	6,4	35 (6,6%)	47,8	1,581	0,563-4,208
M1/M1	1 (1,5%)	0,2	1 (0,2%)	1,5	9,222	0,249- 342,136
N/M2, M1/M2 <sup>a</sup>	16 (22,8%)	17,2	77 (14,4%)	69	1,916 <sup>b</sup>	0,983-3,703
M2/M2	2 (2,8%)	1,4	5 (1%)	1,4	3,689	0,481- 22,321
<i>Total</i>	70	70	533			

Esperado: frecuencia de genotipos esperada en el equilibrio de Hardy-Weinberg; RP: razón de probabilidades con respecto al genotipo N/N; IC: intervalo de confianza del 95% para la razón de probabilidades; a: el genotipo M1/M2 sólo se observó en cinco individuos control; b:  $\chi^2 = 3,619$ , 1 d.f. = p = 0,057.

### **Ejemplo III: Análisis de cambios de nucleótidos y ensayos con genes indicadores**

Todos los cambios de nucleótidos observados en el promotor de anexina A5 cambian los sitios consenso de factores de transcripción, o nucleótidos en su proximidad directa (+/- 1 nucleótidos). La figura 2 representa la estructura del promotor de *ANXA5* con los sitios de unión de factores de transcripción resaltados. La sustitución -19G→A está adyacente a la secuencia consenso gGCCc del factor de transcripción *MTF-1*. El punto de iniciación de la transcripción, *tsp1* está cambiado a 1A→C en el haplotipo del promotor, que también se encuentra en proximidad estrecha a la secuencia consenso de *HNF-3*. La sustitución 27T→C rompe una secuencia consenso de *Sp1* y la variante 76G→A que cambia el sitio de restricción *BamHI* está en proximidad directa a una secuencia consenso de *AP4/MED-1*, "motivo B", que se demostró que es indispensable para la actividad del promotor de *ANXA5* [Carcedo et al., 2001].

Para investigar si estos cambios de nucleótidos, asociados en haplotipos afectarían a la actividad de la región reguladora de la transcripción principal de *ANXA5*, se realizaron ensayos con genes indicadores en ambas variantes M1 y M2 (véase Materiales y métodos, ensayos con genes indicadores). La figura 3 resume los resultados de las mediciones de la actividad. Cada

medición se tomó por triplicado. Los datos obtenidos muestran una drástica reducción de la actividad del promotor de ANXA5 cuando están presentes las cuatro sustituciones de nucleótidos (alelo *BamHI*<sup>-</sup>). Por tanto, la actividad del promotor de M2 asciende al 37-42% de la actividad del promotor de ANXA5 normal, medida en el alelo normal. Por el contrario, el alelo M1 presenta una actividad promotora reducida del 57-62%. La variación observada de las actividades medidas es innata al procedimiento aplicado y es producto de condiciones fisiológicas variables de expresión de células cultivadas.

#### **Ejemplo IV: Análisis estadístico**

A partir de pacientes que comprenden un grupo de embarazo de alto riesgo, se seleccionaron 70 sujetos en los que no se identificaron mutaciones trombofílicas del factor V de Leiden o protrombina PTm. Se compararon los genotipos de alelos de promotor M1 y M2 en el grupo de pacientes y la población control (tabla 1). En los controles, se encontró que los genotipos estaban en razones de equilibrio de Hardy-Weinberg. En el grupo de alto riesgo, las frecuencias de genotipos parecían estar en sus valores de equilibrio de Hardy-Weinberg ( $D = 0,01$ , IC del 95%:  $-0,012 - 0,043$ ), que se confirmó con la prueba de  $\chi^2$  ( $\chi^2 = 0,58$ , d.f. = 2, N.S.) y con la prueba de simulación (valor de  $p < 0,131$ ).

Para el haplotipo M1, se encontró en un primer análisis que para portadores de M1, la asociación entre genotipo y estado de enfermedad es de significación limítrofe ( $\chi^2=3,905$ , 1 df,  $p=0,048$ ). La razón de probabilidades (RP) es de 0,423, con un amplio intervalo de confianza del 95% de 0,172 - 0,994. La cualidad de portador de M1 en estado o bien homocigoto o bien heterocigoto es o bien intrascendente o bien débilmente protectora frente al aborto recurrente.

Para la cualidad de portador de M2 (alelo *BamHI*<sup>-</sup>), la asociación entre el genotipo y el estado de enfermedad es altamente significativa ( $\chi^2=18,455$ , 1 df,  $p=1,7 \times 10^{-5}$ ). La razón de probabilidades equivale a 3,875 (casi cuatro veces), un

intervalo de confianza del 95% de 1,980 - 7,542. Por tanto, M2 es un factor de riesgo fuerte porque los portadores se enfrentan a un riesgo relativo cuatro veces mayor de aborto recurrente que los no portadores.

5 Las diferencias entre homocigosidad y heterocigosidad no son concluyentes. Se ha observado un posible efecto para M2, en el que la heterocigosidad N/M2 implica aparentemente un mayor riesgo (RP=4,083) que la homocigosidad (RP=1,582). Sin embargo, los intervalos de confianza para las razones de probabilidades  
10 se solapan ampliamente (1,961 - 8,457 para N/M2 frente a 0,231 - 8,057 para M2/M2).

La desviación observada con respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg en cuanto a la presentación del alelo M2 en el grupo control puede ser de hecho una indicación adicional del  
15 papel de esta variante del promotor de ANXA5 en la pérdida recurrente del embarazo, dado que los sujetos control seleccionados no tuvieron problemas de embarazo registrados. En comparación con la población general, el riesgo de portar el haplotipo M2 puede ser menor, considerando que aproximadamente  
20 del 10% al 15% de todas las mujeres padecen pérdidas de embarazo.

En un análisis adicional, se encuentran los siguientes resultados, que están completamente en línea con los resultados proporcionados anteriormente el presente documento:

25 Para el haplotipo M1, se encontró que para heterocigotos M1, la asociación entre el genotipo y el estado de enfermedad es de significación limítrofe ( $\chi^2=0,511$ , 1 df,  $p=0,475$ ). La razón de probabilidades (RP) es de 1,581, con un amplio intervalo de confianza del 95% de 0,563-4,208. Por tanto, se concluyó que la  
30 cualidad de portador de M1 en el estado heterocigoto es más bien intrascendente para el aborto recurrente y que el número de homocigotos en pacientes y controles es demasiado bajo para llegar a una conclusión justificada.

Para la cualidad de portador de M2 (alelos *BamHI*<sup>-</sup>), la  
35 asociación entre el genotipo y el estado de enfermedad es significativa ( $\chi^2=4,763$ , 1 df,  $p=0,029$ ). La razón de

probabilidades equivale a 2,024, con un intervalo de confianza del 95% de 1,068 - 3,810. Por tanto, M2 es un factor de riesgo porque los portadores se enfrentan a un riesgo relativo de aborto recurrente aproximadamente dos veces mayor que los no portadores.

Los números en el grupo de casos son demasiado pequeños para someterlos a prueba para detectar cualquier interacción entre haplotipos, o para detectar diferencias entre homocigosidad y heterocigosidad. Se observó un posible efecto para M2, en el que la homocigosidad N/M2 implicó aparentemente un mayor riesgo (RP=3,689) que la heterocigosidad (RP=1,916). Sin embargo, el intervalo de confianza para la razón de probabilidades de M2/M2 es más bien amplio (0,481 - 22,321), de modo que no estaría justificada una conclusión desde un punto de vista estadístico.

Dado que el grupo control es una muestra representativa de la población del noroeste de Alemania, el riesgo estimado de llevar el haplotipo M2 debe ser indicativo del riesgo de la población, considerando que aproximadamente el 10% de todas las mujeres padecen pérdidas del embarazo.

#### **Ejemplo V: Procedimientos analíticos**

El procedimiento analítico propuesto para la detección del alelo M2 (*BamHI*<sup>-</sup>) puede comprender etapas consecutivas:

1. Reacción de PCR;
2. Digestión por restricción con *BamHI* de una alícuota del producto de PCR; y
3. Electroforesis en gel de los productos de la digestión por restricción

El molde para 1. es ADN genómico humano de sangre periférica. Los productos de 2. se someten a separación electroforética en un gel de agarosa y se visualizan con tinción de bromuro de etidio.

1. Reacción de PCR:

En 25  $\mu$ l de volumen en 100 ng de ADN genómico. La composición de la mezcla de reacción y el tampón de reacción pueden ser diferentes y dependen del proveedor de Taq polimerasa Cebadores de amplificación, 20 pM cada uno:

5

ANX5.P.F

5' CCGAGCCCTGGACAGCTCCCCA 3' (SEQ ID NO: 22)

ANX5. ex1.R

5' CCAGACTGTGGGACCCAAGT 3' (SEQ ID NO: 23)

Tamaño del amplicón: 436 pb.

10

Condiciones de ciclado:

(94°C, 45 s); 30 x [(94°C, 30 s); (60°C, 30 s); 68°C, 1 min.); (68°C, 7 min.); (15°C,  $\infty$ );

2. Digestión por restricción:

15

En 10  $\mu$ l de volumen, con 1 U de enzima de restricción *BamHI* (diversos proveedores). Digestión por restricción en 5-7  $\mu$ l del producto de PCR (reacción 1), a 37°C, 18- 20 horas.

3. Electroforesis en gel de agarosa:

20

Se mezclan los productos de (2) con 2  $\mu$ l de tampón de carga de gel 6x y entonces se cargan en geles de agarosa al 1,5%. Se procesan los geles en tampón TAE 1x, voltaje constante (6V/cm) durante 30 minutos. Se visualizan los productos de reacción separados y teñidos con bromuro de etidio en un transiluminador (348 nm) y pueden documentarse. Si el sitio de restricción *BamHI* está intacto (ADN de tipo natural), pueden observarse dos bandas en el estado homocigoto (336 y 100 pb), y tres bandas en heterocigotos con un alelo *BamHI*<sup>-</sup> (una banda de 436 pb adicional, amplicón no digerido). Cuando el sitio de restricción no está intacto en los homocigotos, sólo se observará una banda de 436 pb. La figura 4 muestra una foto del gel de los productos de PCR digeridos con *BamHI* de los pacientes e individuos control.

35

Genotipos	Bandas de diagnóstico
-----------	-----------------------

	436 pb	336 pb	100 pb
Homocigoto <i>BamHI</i> <sup>+</sup> / <i>BamHI</i> <sup>+</sup>	-	+	+
Heterocigoto <i>BamHI</i> <sup>+</sup> / <i>BamHI</i> <sup>-</sup>	+	+	+
Homocigoto <i>BamHI</i> <sup>-</sup> / <i>BamHI</i> <sup>-</sup>	+	-	-

El procedimiento analítico desarrollado puede diferenciar portadores del alelo M2 (*BamHI*<sup>-</sup>) (heterocigotos y homocigotos), que tienen un riesgo de aborto recurrente relativo

5 aproximadamente cuatro veces mayor (3,875) en comparación con los no portadores, tal como se mide entre sujetos control de sexo femenino sanos sin problemas de embarazo anteriormente

10 notificados (véase en IV, Análisis estadístico). No se han establecido diferencias estadísticas en las tasas de riesgo relativo de individuos, heterocigotos y homocigotos para el alelo M2 (*BamHI*<sup>-</sup>).

**Bibliografía citada adicional:**

- Rey E, *et al.*, (2003), *Lancet* 361:901-908.
- Key NS, *et al.*, (2002), *Arch Pathol Lab Med.* 126:1367-1375
- Seligsohn U, *et al.*, (2001), *N Engl J Med.* 344:1222-1231
- 5 Empson M, *et al.*, (2002), *Obstet Gynecol.* 99:135-144
- Rand JH, *et al.*, (1994), *Am J Obstet Gynecol.* 171:1566-1572
- Rand JH, *et al.*, (1999), *Thromb Haemost.* 82:649-655
- Rand JH, *et al.*, (2003), *Am J Pathol.* 163:1193-1200
- Gerke V, *et al.*, (2002), *Physiol Rev.* 82:331-371
- 10 Creutz CE. (1992), *Science* 258:924-931
- Cookson BT, *et al.*, (1994), *Genomics* 20:463-467
- Morgan RO, *et al.*, (1998), *Genomics* 48:100-110
- Carcedo MT, *et al.*, (2001), *Biochem J.* 356:571-579
- Gonzalez-Conejero R, *et al.*, (2002), *Blood* 100:2081-2086
- 15 Kozak M. (2003), *Blood* 101:1202-1203
- van Heerde WL, *et al.*, (2003), *Blood* 101:4223-4224
- Hayes MJ, *et al.*, (2004), *Biochem. Biophys. Res. Comms* 322:1166-1170.

## LISTA DE SECUENCIAS

&lt;110&gt; Universitätsklinikum Münster

&lt;120&gt; Variante génica del gen de anexina A5

&lt;130&gt; K2475 PCT S3

&lt;160&gt; 23

&lt;170&gt; PatentIn versión 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1732

&lt;212&gt; ADN

<213> *Homo sapiens*

&lt;400&gt; 1

tctagaacac	tgcatctagt	gtcgcaaact	tgctctcttg	ccccctctgc	cctggcacct	60
tccctcccca	caccagtaag	tctgagaagg	tccctgtgtc	ttctactttt	ccttttccag	120
catatggaga	caaaagtgat	tatatcccg	atgctaatec	gccatgttga	cctttaataa	180
ccccagtecc	atgaatacct	cctgattcct	aggatttttt	ttttaaaactg	tccttagcat	240
aagaacatgt	caaccttgat	gctattgccc	acattgtagg	ctatgaagca	tacggcattc	300
tcacctgttc	cggaggctgc	ctttaattgt	cttgcacaga	gcagtatact	ctttccttac	360
ggtatataag	gccagggtct	ggggagtaac	agtgcagaaa	tttatctgct	tgccgccgcc	420
caaggccacg	cttctgtcta	ccacatcctc	caatagcacc	cctattacct	acagactgga	480
tttgtctgtc	tcgttctttg	gtttcttgac	tccttcgcgt	ttgggggctg	ctttgcatat	540
aaagcccttt	cacagaacac	agcaccatgc	tagtacaata	cgctgtagat	tctccctccc	600
tccccctctc	tctcatatac	tcatatatct	tatgttgaac	caatatgagg	cattgctcaa	660
atttaagtca	tattaaagtt	ctaggctagt	tttgaaaaca	gaaactgatt	ggaagcagag	720
gttttcaaat	agcccacata	cgctactaga	aggctgtaca	tttaagagag	ggccatctag	780
gaagcaataa	taggcattaa	aacaacaata	aaacaacaaa	acaaaacaga	aacaaaaaca	840
acttgggaaa	cggccctcct	ttcacgtttt	ttctatccca	tcgacaaaagg	cgcgctgtcc	900
ttagctgcga	tgattttgtc	tcgcctccaa	aaagacgccc	acgcactatg	ttgagcaccc	960
aagtgaggct	acggttctctg	cggtcacaga	gggcaggag	gctcaagcac	ctccaaaacc	1020
ccgagccctg	gacagctccc	caggcccttc	ccgcgccg	aggacaagag	gtctccgggg	1080
ccctcggggg	agcggcgcct	cctcctgggt	ccagcagctc	tcgcgccgctc	cccaccagg	1140
cccgcgagac	cagcgggaca	gtccgcgccg	ggagaccaac	tgggacgagc	cgcgaccac	1200
gcaggcgcgc	tgaggccggg	gcaggggccc	gcccggctgg	cgcgccggc	tcggttggg	1260

gctggcgggg gtgggacggg ccaagccggg cagggccggg gtggggcgct ggcgtttccg 1320  
 ttgcttgat cagtctaggt gcagctcggg atccttcagc gtctgcatct cggcgtcgcc 1380  
 ccgcgtaccg tcgcccggct ctcccggct ctcccggggg ttcggggcac ttgggtcca 1440  
 cagtctgggt gagtggtcgc agcccgggga gggggctcct tctggagagg agagcgtggt 1500  
 cgcgggggcac tggattcgcg cggacgctcg gccgagagct gtcccggtag ctgcgagagg 1560  
 gcgggtcggc ccgtggcggc gtccgggctg tctgagcgcg ccggtccccg cggacctgcg 1620  
 cttggggagg gcacgagttg caaatggcgc gctaagcccg aggtttcttc tcttttgag 1680  
 tcctgcttca ccttcccctg acctgagtag tcgccatggc acaggaagg cc 1732

<210> 2

<211> 281

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

tccggggccc tcgggggagc ggcgcctcct cctggttcca gcagctctgc gccgctcccc 60  
 acccaggccc gcgagaccag cgggacagtc cgcgccggga gaccaactgg gacgagccgc 120  
 gaccacgca ggcgcgctga ggccggggca gggcggggcc cggtggcgc gcccgctgc 180  
 ggttggggct ggcgggggtg ggacgggcca agccgggcag ggccggggtg gggcgctggc 240  
 gtttccgttg cttggatcag tctaggtgca gctgcggatc c 281

<210> 3

<211> 436

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

ccgagccctg gacagctccc caggcccttc ccgcggcgcg aggacaagag gtctccgggg 60  
 ccctcggggg agcgggcct cctcctggtt ccagcagctc tggggcggct ccccaccag 120  
 gcccgcgaga ccagcgggac agtccgcgcc gcgggagacc aactgggacg agcccgacc 180  
 cacgcaggcg cgctgaggcc ggggcagggg cgggcccggc tggcgcggcc ggcctgcggt 240  
 tggggcctg gcgggggtgg gacgggcaa gccgggcagg gccggggtgg ggccgctggc 300  
 gtttccgttg cttggatcag tctaggtgca gctgccggat ccttcagcgt ctgcatctcg 360  
 gcgtcgeccc gcgtaccgtc gcccggtct ctcccgtct cccgggggtt cggggcactt 420  
 gggccccaca gtctgg 436

<210> 4

<211> 289

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

tccggggccc tcgggggagc ggcgcctcct cctgggtcca gcagctctgc ggccgctccc	60
cacccaggcc cgcgagacca gcgggacagt ccgcgccgcg ggagaccaac tgggacgagc	120
cgcgaccac gcaggcgcgc tgaggccggg gcaggggcgg gcccggtgg cgcggccggc	180
ctgcggttg ggcctggcg ggggtgggac gggccaagcc gggcagggcc ggggtggggc	240
cgctggcggt tccggtgctt ggatcagtct aggtgcagct gccggatcc	289

<210> 5

<211> 18

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 5

gtctaggtgc agctgccg	18
---------------------	----

<210> 6

<211> 18

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 6

gtctaggtgc agctgcca	18
---------------------	----

<210> 7

<211> 18

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 7

gaaccgggac acagaaac

18

<210> 8

<211> 17

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 8

ggccggcctg cggttgg

17

<210> 9

<211> 17

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 9

ggccggcctg cggttga

17

<210> 10

<211> 21

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 10

gttgtgggta aatccagcgc a

21

<210> 11

<211> 17

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 11

ccctggcggg ggtggga

17

<210> 12

<211> 17

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 12

ccctggcggg ggtgggc

17

<210> 13

<211> 21

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 13

gttgtgggta aatccagcgc a

21

<210> 14

<211> 17

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 14

ccgggcaggg ccggggt

17

<210> 15

<211> 17

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 15

ccgggcaggg ccggggc

17

<210> 16

<211> 18

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 16  
gaaccgggac acagaaac 18

<210> 17  
<211> 12  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 17  
tgcggttggg gc 12

<210> 18  
<211> 45  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 18  
tggcgggggt gggacgggcc aagccgggca gggccggggt ggggc 45

<210> 19  
<211> 41  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 19  
gctggcgttt ccgttgcttg gatcagtcta ggtgcagctg c 41

<210> 20  
<211> 6  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 20  
ggatcc 6

<210> 21

<211> 28

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> oligómero

<400> 21

ggttggggct ggcgggggtg ggacgggc 28

<210> 22

<211> 22

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 22

ccgagcctg gacagctccc ca 22

<210> 23

<211> 20

<212> ADN

<213> secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 23

ccagactgtg ggaccaagt 20

**REIVINDICACIONES**

1. Molécula de ácido nucleico que comprende un promotor de anexina A5 (ANXA5) humana, promotor que comprende las siguientes mutaciones (sustituciones) puntuales
  - 5 (i) una mutación puntual de G por A en una posición que corresponde al nucleótido 186 de la SEQ ID NO: 2;
  - (ii) una mutación puntual de A por C en una posición que corresponde al nucleótido 203 de la SEQ ID NO: 2;
  - 10 (iii) una mutación puntual de T por C en una posición que corresponde al nucleótido 229 de la SEQ ID NO: 2; y
  - (iv) una mutación puntual de G por A en una posición que corresponde al nucleótido 276 de la SEQ ID NO: 2.
2. Molécula de ácido nucleico que comprende un promotor de anexina A5 (ANXA5) humana, promotor que comprende las siguientes mutaciones (sustituciones) puntuales
  - 15 (ii) una mutación puntual de A por C en una posición que corresponde al nucleótido 203 de la SEQ ID NO: 2; y
  - (iii) una mutación puntual de T por C en una posición que corresponde al nucleótido 229 de la SEQ ID NO: 2.
- 20 3. Fragmento de ácido nucleico de las moléculas de ácido nucleico definidas en una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende las sustituciones como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.
- 25 4. Oligómero que tiene una longitud de al menos 20 nucleótidos, que hibrida específicamente con las moléculas/fragmentos de ácido nucleico como se define en una cualquiera de la reivindicación 1 a 3.
5. Molécula de ácido nucleico según la reivindicación 1 ó 2
  - 30 que se une operativamente a un gen que codifica una proteína marcadora, una proteína señal, un gen reportero, o una etiqueta.
6. Molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 5 que es ADN, ARN o APN.
- 35 7. Vector que comprende la molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 ó 5.

8. Método *in vitro* para diagnosticar o detectar una predisposición para una tendencia al aborto (pérdida del embarazo) y/o un mayor riesgo para desarrollar anticuerpos antifosfolípidos, comprendiendo dicho método las etapas de
- 5 (a) examinar un promotor de ANXA5 para detectar al menos una sustitución según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2; y
- (b) determinar si está presente alguna de las al menos una de dichas sustituciones.
- 10 9. Método *in vitro* según la reivindicación 8, en el que la detección de dicha al menos una sustitución en dicho promotor de ANXA5 se lleva a cabo o se determina mediante técnicas de ácidos nucleicos basadas en el tamaño o la secuencia.
- 15 10. Método *in vitro* según la reivindicación 9, en el que dicha técnica basada en el tamaño o la secuencia se selecciona del grupo que consiste en técnicas de hibridación, secuenciación de ácidos nucleicos, PCR, determinación de fragmentos de restricción, determinación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), LCR (reacción en cadena de ligamiento) o determinación de polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).
- 20 11. Método *in vitro* según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende la etapa de amplificar un tramo de ADN del promotor de ANXA5 a partir del ADN genómico mediante PCR.
- 25 12. Método *in vitro* según la reivindicación 10, en el que dicha determinación de fragmentos de restricción o dicho RFLP comprende la determinación de un sitio de restricción
- 30 *BamHI*.
13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el que se determina la ausencia o la presencia de una sustitución correspondiente a la posición 276 de un promotor del gen ANXA5 tal como se muestra en la SEQ ID NO:
- 35 2.
14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13, que se lleva a cabo en ADN genómico.

15. 5      Uso de la molécula de ácido nucleico definida en la reivindicación 1 ó 2, el fragmento de ácido nucleico definido en la reivindicación 3, el oligómero de la reivindicación 4, o de un par de cebadores capaces de amplificar tramos relevantes de la molécula de ácido nucleico definida según la reivindicación 1 ó 2, para la preparación de una composición de diagnóstico para diagnosticar o detectar una predisposición para o una tendencia al aborto y/o para diagnosticar o detectar una predisposición o una tendencia para el desarrollo de anticuerpos antifosfolípidos.
- 10
16. 15      Método de selección de moléculas capaces de interaccionar con un promotor mutado de ANXA5 como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende las etapas de
- 20      (a) poner en contacto una molécula de ácido nucleico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, un vector según la reivindicación 7 ó un huésped que comprende dicha molécula de ácido nucleico con una molécula candidata;
- 25      (b) medir y/o detectar una respuesta;
- (c) comparar dicha respuesta con una respuesta patrón tal como se mide en ausencia de dicha molécula candidata, y
- (d) comparar dicha respuesta con una respuesta obtenida con dicha molécula candidata y el promotor no mutado (de tipo natural) de ANXA5.



Fig. 2

1 CCGAGCCCTG GACAGCTCCC CAGGCCCTTC CCGCGGCGCG AGGACAAGAG

-202

51 GTC|TCCGGGG CCCTCGGGGG AGCGGCCTT CCTCCTGGTT CCAGCAGCTC

101 TGCGGCCGCT CCCCACCCAG GCCCGCGAGA CCAGCGGGAC AGTCCGCGCC  
*NotI*

151 GCGGGAGACC AACTGGGACG AGCCGCGACC CACGCAGGCG CGCTGAGGCC

201 GGGGCAGGGG CgggcccGGC tggcgcgGCC GGCCTGCGGT TGgggcctg  
*MTF-1 MTF-1 A MTF-1*

251 gcgGGGGTGG GACgggccaA GCCgggcagG GCcggggtgg\_gGCCGCTGgc  
*tsp1 C HNF-3 Sp1 Sp1 C tsp2*

301 gtttCCGTTG CTGGATCAG TCTAGGTgca gctgccgGAT CC|TTCAGCGT  
*Myb tsp3 AP-4, MED-1 A BamHI +79*

351 CTGCATCTCG GCGTCGCCCC GCGTACCGTC GCCCGGCTCT CCGCCGCTCT

401 CCCGGGGGTT CGGGGCACTT GGGTCCCACA GTCTGGGTGA GTGGTCGCAG

451 CCCGGGGAGG GGGCTCCTTC TGGAGAGGAG AGCGTGGTCTG CCGGGC

Fig. 3

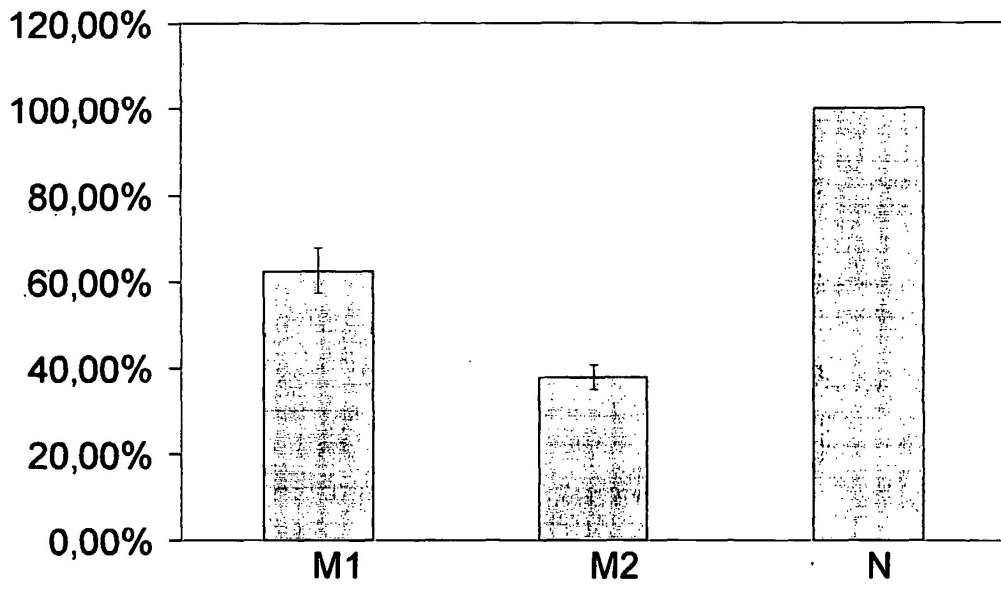


Fig. 4

