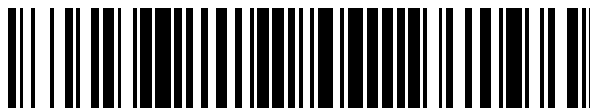


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 948 817**

21 Número de solicitud: 202330234

51 Int. Cl.:

C12N 15/85 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

21.03.2023

43 Fecha de publicación de la solicitud:

19.09.2023

Fecha de concesión:

14.02.2024

45 Fecha de publicación de la concesión:

21.02.2024

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
(75.0%)**

**Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid (Madrid) ES y
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (25.0%)**

72 Inventor/es:

**LIRAS MARTÍN, Antonio;
DE PABLO MORENO, Juan Andrés;
REVUELTA RUEDA, Luis;
MIGUEL BATUECAS, Andrea;
BERMEJO ALVAREZ, Pablo y
GONZÁLEZ BRUSI, Leopoldo**

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **MODELO ANIMAL DEFICIENTE EN FACTOR V**

57 Resumen:

Modelo animal deficiente en factor V.

La invención se refiere a un modelo animal no humano deficiente en factor V de la coagulación que incluye un cambio de aminoácido en la proteína FV que reproduce la mutación humana Thr1898Met. Especialmente, la invención se refiere a un modelo animal en ratón, con la mutación localizada en Thr1857Met de la proteína FV murina. La invención incluye mutantes heterocigotos y homocigotos para esta mutación, obteniéndose camadas viables e individuos con signos clínicos leves de la enfermedad que no implican sufrimiento en el animal.

La invención también se refiere por una parte a un método para obtener animales no humanos deficientes en factor V de la coagulación mediante edición génica y técnicas de reproducción asistida mediante microinyección de cigotos y, por otra, al uso del modelo animal en el estudio de fármacos para el tratamiento de la deficiencia en factor V de la coagulación.

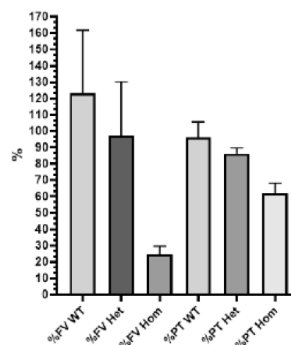


Fig. 4

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.

Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 948 817 B2

DESCRIPCIÓN

MODELO ANIMAL DEFICIENTE EN FACTOR V

5 SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se encuadra en el sector de las enfermedades relacionadas con la coagulación sanguínea, en concreto con el déficit de factor V, también denominado parahemofilia o enfermedad de Owren. La invención se relaciona con la edición génica y
10 la creación de modelos animales deficientes en factor V para el estudio de tratamientos para este déficit de la coagulación.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 En los seres humanos, el gen que codifica el factor V (FV) se denomina *F5* y está situado en la región 1q24.2 del brazo largo del cromosoma 1. Es un gen de gran tamaño, que comprende 25 exones y 24 intrones, siendo el exón 13 el más grande. El gen *F5* se compone de 9132 bp. El ARN mensajero maduro del gen, que codifica una proteína de 2224 aminoácidos, mide alrededor de 6,8 kb. En su forma inactiva, la proteína FV tiene
20 seis dominios: A1, A2, B, A3, C1 y C2. Los dominios A1 y A2 constituyen la cadena pesada; el dominio B, codificado en su totalidad por el exón 13, constituye la región postraduccional; y los dominios A3, C1 y C2 forman la cadena ligera de la proteína FV. El peso de la proteína FV inactiva es de unos 330 kDa.

25 El FV humano es homólogo en un 80% al FV murino, y la estructura menos conservada de la proteína es el dominio B, como ocurre también con otras especies animales y otros factores de coagulación. El gen que codifica la proteína FV en el ratón tiene una longitud de 7430 bp y codifica una proteína de 2183 aminoácidos. Los niveles de FV en los ratones son excepcionalmente altos en comparación al humano y se han propuesto diferentes
30 niveles de referencia de FV.

La deficiencia de factor V da lugar a hemorragias que pueden producirse de forma espontánea o como resultado de un traumatismo o de procedimientos médicos invasivos. El tratamiento de elección se basa actualmente en transfusiones de plasma fresco
35 congelado (PFC), o de concentrados de factores de la coagulación. Se trata de una terapia

paliativa poco eficaz y sin especificidad para la enfermedad. Dependiendo de los niveles en plasma de la proteína, se distinguen varios grados de severidad según la tendencia o el riesgo de sangrados, así como la gravedad de los síntomas, lo que da lugar a una clasificación de severa (<1%), moderada (<10%) y leve (>10%).

5

El interés por el estudio de la deficiencia de factor V y la búsqueda de tratamientos alternativos ha dado lugar al desarrollo de varias estrategias. El artículo de Serrano LJ. (*Development and Characterization of a Factor V-Deficient CRISPR Cell Model for the Correction of Mutations. International Journal of Molecular Sciences. 2022; 10: 5802*)

10

describe un modelo celular deficiente en factor V, obtenido mediante tecnología CRISPR. Mediante pasos adicionales de tecnología CRISPR/Cas9 para la corrección de mutaciones, se consigue transformar un fenotipo grave en uno leve o asintomático al obtener la corrección del 41% de las células mutadas en el gen *F5*, dando lugar a una proteína funcional que puede resultar suficiente para convertir un fenotipo grave en uno leve o

15

asintomático. En el mismo sentido, el documento WO2021229131A1 se refiere a un método *in vitro* para recuperar la expresión del gen *F5* mediante tecnología CRISPR/Cas9, utilizando parejas de guías situadas a una distancia de 150 pares de bases hacia el extremo 5' y 150 pares

20

de bases hacia el extremo 3' con respecto a una mutación localizada en el nucleótido 3279 del gen *F5*. Con esta invención se proporciona una herramienta para curar el déficit de factor V.

25

El documento US2004014057A1, describe oligonucleótidos que tienen residuos resistentes a nucleasas para su uso en la modificación dirigida de material genético, incluida la mutación génica, la reparación génica dirigida y la inactivación génica. La invención comprende un oligonucleótido monocatenario que tiene un dominio de ADN con al menos un desapareamiento respecto a la secuencia genética que se quiere alterar, además de otras modificaciones químicas. Entre los ejemplos que incluye, en el ejemplo 12, tabla 19,

30

aparecen oligonucleótidos para realizar modificaciones dirigidas en el gen *F5*.

35

Hasta el momento, se han creado algunos modelos animales con deficiencia del factor V. En ratones (Cui J, *et al. Fatal haemorrhage and incomplete block to embryogenesis in mice lacking coagulation factor V. Nature, 1996; 384(6604):66-8*) los individuos nacidos a término murieron pocos días después debido a hemorragias por ruptura de vasos

sanguíneos o porque fueron sometidos a diferentes procedimientos. En pez cebra (Weyand AC, et al. *Analysis of factor V in zebrafish demonstrates minimal levels needed for early hemostasis. Blood Advances*, 2019; 3(11):1670-80), los embriones y las larvas toleraron mutaciones letales para los mamíferos, pero en la edad adulta sucumbieron debido a hemorragias espontáneas.

Los modelos animales deficientes en factor V de la coagulación que se han desarrollado hasta la fecha, no dan individuos viables, por lo que sería de gran interés para estudiar la enfermedad y su posible tratamiento, obtener un modelo animal deficiente en esta proteína y que fuera viable.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

Modelo animal deficiente en factor V.

Se ha obtenido un modelo animal en el que probar compuestos para el tratamiento de las alteraciones de la coagulación producidas por mutaciones en el gen *F5* que codifica el factor V de la coagulación.

El modelo animal se ha construido introduciendo en su genoma un transgén humano del gen *F5* con una mutación concreta, y se ha conseguido obtener animales homocigotos. Estos animales homocigotos apenas tienen signos clínicos de alteraciones en la coagulación, pero sí se aprecia alargamiento en los tiempos de coagulación como en el tiempo de protrombina (TP) y en el de tromboplastina parcial activada (TTPa), así como una disminución en los niveles de factor V.

La mutación que se ha introducido está localizada en el ser humano en el aminoácido 1898 (o 1870 si no se tiene en cuenta el péptido señal de la proteína). Se trata de la sustitución de una treonina por una metionina, debida a la mutación C>T localizada en el nucleótido 5895 del gen *F5* humano (5609 sin contar el péptido señal), por lo que la mutación se ha denominado Thr1898Met. La secuencia del gen *F5* humano está disponible en GenBank, con número de acceso: NM_000130.5 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_000130.5) y la de la proteína FV humana en UniProt, con la referencia P12259 (<https://www.uniprot.org/uniprot/P12259>).

Para insertar la mutación que da lugar a Thr1898Met, procedente de un caso humano, en el gen del animal se ha utilizado la tecnología CRISPR/Cas9 y, para obtener los animales modificados, se ha utilizado la microinyección.

- 5 Un aspecto de esta invención, por lo tanto, se refiere a un modelo animal deficiente en el factor V de la coagulación que incluye una mutación puntual en un nucleótido del gen *F5* en el animal, que da lugar a la sustitución de una treonina por una metionina en el aminoácido correspondiente al aminoácido 1898 de la proteína humana. Preferentemente, el animal utilizado es el ratón y la mutación se produce en la posición 1857 de la proteína
- 10 FV, que denominamos 1857FTM (Factor Treonina Metionina). La invención también se refiere a un modelo animal en ratón cuyo gen *F5* incluye la mutación C>T 5695.

El animal con la mutación correspondiente a la mutación Thr1898Met humana puede ser heterocigoto u homocigoto para esta mutación. Hasta ahora, en el estado de la técnica, los

15 animales homocigotos para deficiencias en el factor V de la coagulación habían resultado inviábiles, con camadas que no llegaban a término o animales que morían poco después del nacimiento. Sin embargo, como se describe en esta memoria, con esta invención se ha conseguido obtener animales homocigotos cuyas camadas llegan a término y presentan signos clínicos leves de alteración en la coagulación. Sin embargo, en estos animales

20 homocigotos se producen cambios significativos en los indicadores de la coagulometría. Esto implica que la mutación introducida no produce sufrimiento en el animal, puesto que los signos clínicos son leves, pero los mutantes se pueden utilizar como modelo animal en el estudio de fármacos específicos para el tratamiento de la deficiencia en factor V de la coagulación.

25

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para producir un modelo animal deficiente en el factor V de la coagulación que incluye modificar el genoma del animal en el gen *F5* mediante una mutación que se traduce en un cambio de aminoácido en la proteína FV que reproduce la mutación humana Thr1898Met, incluyendo en la numeración

30 de los aminoácidos el péptido señal de la proteína FV. Para introducir la mutación el método incluye la técnica de la edición génica y los animales mutados se obtienen por técnicas de reproducción asistida con microinyección de cigotos.

35

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción un juego de dibujos en donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

Figura 1. Alineamiento múltiple de proteínas FV de diferentes especies de animales vertebrados.

10

Figura 2. Localización de las mutaciones del alelo T1857M.

Figura 3. Resultados de coagulometría expresados en segundos.

15

Figura 4. Resultados de TP y niveles de FV expresados en %.

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

La presente invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitativos de su alcance.

Ejemplo 1. Generación de ratones *knock in* con una mutación humana en *F5*

Se construyó un ratón *knock in* utilizando una secuencia génica humana con la que se sustituyó la secuencia del gen *F5* del ratón.

25

Ejemplo 1.1. Selección de la secuencia

Para la construcción del ratón *knock in*, se eligió una mutación descrita por Delev D. y colaboradores (*Factor 5 mutation profile in German patients with homozygous and heterozygous factor V deficiency. Haemophilia*, 2009; 15(5):1143-53), localizada en el exón 18, dominio A3, del gen *F5* humano. En la correspondiente proteína FV humana, esta mutación está localizada en el aminoácido 1898 (también identificado como aminoácido 1870 cuando no se tiene en cuenta el péptido señal) y da lugar al cambio de una treonina por metionina (Thr1898Met, debido a la mutación de ACG a ATG en el gen) localizada en el nucleótido 5895 del gen *F5* humano (5609 sin contar el péptido señal), por lo que se denominó Thr1898Met.

35

Además, se realizó un alineamiento múltiple de secuencias de proteínas de diferentes especies de animales vertebrados utilizando la herramienta de alineamiento M-Coffee (Di Tommaso P, *et al.* *T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. Nucleic Acids Research*, 2011; 39(suppl):W13-7), que combina diferentes métodos de alineamiento de secuencias para averiguar si las mutaciones descritas son estructural y funcionalmente importantes y si están localizadas en regiones conservadas. En el alineamiento se incluyeron el FV humano (referencia P12259 en Uniprot; SEQ ID NO: 1), el de perro (referencia A0A8P0SJS2 en Uniprot; SEQ ID NO: 2), de conejo (referencia G1U6T0 en Uniprot; SEQ ID NO: 3), de ratón (referencia O88783 en Uniprot; SEQ ID NO: 4), de cerdo (referencia F1RPW2 en Uniprot; SEQ ID NO: 5), de pez cebra (referencia Q90X47 en Uniprot; SEQ ID NO: 6), de cobaya (referencia H0V8V3 en Uniprot; SEQ ID NO: 7), de gato (referencia M3W922 en Uniprot; SEQ ID NO: 8) y de oveja (referencia W5PKA9 en Uniprot; SEQ ID NO: 9). Se comprobó que la zona correspondiente a la mutación seleccionada se encontraba muy conservada en todas las especies, incluido el ratón. En la Figura 1 se señala con una flecha la treonina 1898, conservada en todas las especies analizadas; se indican los diferentes grados de conservación con la siguiente simbología: Asterisco (*), indica que en dicha posición los residuos son 100% idénticos; dos puntos (:), indican posiciones en las que se han realizado sustituciones conservadas; punto (.), indica sustituciones semiconservadas. En el caso de los dos puntos, las secuencias pueden tener aminoácidos diferentes en esa posición, pero sus propiedades químicas son muy similares. La sustitución no conservada presenta sustituciones de aminoácidos con propiedades químicas diferentes en otra proteína. En el caso de los cambios semiconservativos significa que los aminoácidos diferentes en la misma posición presentan propiedades químicas similares, pero en menor medida. Matemáticamente, en los alineamientos, estas clasificaciones vienen dadas por una puntuación en la llamada matriz de Gonnet PAM 250 donde una puntuación mayor a 0,5 indica que la conservación tiene propiedades fuertemente similares (:) y una puntuación menor a 0,5 (.) indica que la conservación entre aminoácidos presenta propiedades menos similares. Puntuaciones negativas indican la no conservación de los aminoácidos.

Ejemplo 1.2. Elaboración de la mutación 1857FTM en ratón

La treonina en posición 1898 en la proteína humana está situada en la posición 1857 en la

proteína de ratón. Se elaboró la mutación 1857FTM para reproducir la mutación Thr1898Met en el ratón.

5 Para ello, se diseñó una guía CRISPR de 20 pb (secuencia SEQ ID NO: 10) y un DNA molde de 100 pb (SEQ ID NO: 11), para emular en el ratón la mutación 1898FTM. Se utilizaron ratones híbridos C57CBA F1. El C57CBA F1 es el cruce de la primera generación -F1- con macho CBA/CaOlaHsd y hembra C57BL/6JOlaHsd-.

		SECUENCIA FORWARD 5'-3'
GUÍA CRISPR (sgRNA)	SEQ ID NO:10	GGTAGCTGGCATGCAAACGC
DNA MOLDE (ssDNA)	SEQ ID NO:11	GCATCCAAGCCTGGCTGGTGGCTCCTAGACACAGAGGTTGGAGAAAATCAGG TAGCTGGCATGCAAATGCCATTTCTCATCATAGACAAAGGTATCACTT
Fragmento WT	SEQ ID NO:12	AGAGAGCTCCGTCACAACATTAATGTGTTAACCAT CGAGTTTGTAAATTTGTCCTCACTCTCTATTTTAGG TTCATTTAAAACCTTTGAAATGAAGGCATCCAAGC CTGGCTGGTGGCTCCTAGACACAGAGGTTGGAGA AAACCAGGTAGCTGGCATGCAAACGCCATTTCTCAT CATAGACAAAGGTATCACTTGCATGTTGTTTACGGG TGAGGGAGTGCCTAGTACTAGACTATTTCCAACCTTC CAGATTGAAAGTAATCTGCAAGTGTGAAAATGTGAAGACGGGC

10 La mezcla se microinyectó en cigotos y posteriormente se reimplantaron en una hembra receptora (100 ng/μl de mRNA para Cas9, 50 ng/μl de sgRNA y 10 ng/μl de ssDNA). El objetivo era conseguir un individuo mosaico que tuviera el alelo de interés, para después segregarlo y conseguir individuos heterocigotos con ese alelo. Finalmente, se observaron dos mutaciones (Figura 2), una de ellas la original que se había planificado a la que se denominó 1857FTM (C>T 5695); la otra mutación C>T 5675 que no daba lugar a ningún

15 cambio en la proteína puesto que el triplete AAC se transformaba en AAT y ambos codifican asparagina (mutación silenciosa) (Secuencia SEQ ID NO: 13). En la Figura 2, se compara la secuencia SEQ ID NO: 13, que contiene las dos mutaciones puntuales indicadas en ratón, con el fragmento que va del aminoácido 137 al 187 de la secuencia del animal silvestre SEQ ID NO: 12. La metodología utilizada para la generación de la guía CRISPR,

20 el cultivo y recolección de cigotos, la microinyección de estos y su implantación en hembras receptoras se realizó según el protocolo descrito por Lamas-Toranzo y colaboradores

(*TMEM95 is a sperm membrane protein essential for mammalian fertilization. eLife*, 2020;9:e53913.) y según Bermejo Álvarez y colaboradores (*Utero-tubal embryo transfer and vasectomy in the mouse model. J Vis Exp*, 2014:e51214). Se consiguieron parejas de animales heterocigotos que se cruzaron para obtener una población homocigota estable.

5

Se indujo la superovulación en 18 ratonas donantes, de 7-8 semanas de edad, híbridas C57BL/6JOlaHsd- mediante inyecciones intraperitoneales de 5 UI de gonadotropina sérica de yegua preñada (PMSG, Folligon, MSD Animal Health) y una dosis equivalente de gonadotropina coriónica humana (hCG, Sigma), con un intervalo de 48 horas. Las hembras
10 inducidas se aparearon con machos CBA/CaOlaHsd- y se recuperaron los cigotos de los oviductos.

Las microinyecciones de los cigotos de ratón se realizaron con un sistema de micromanipulación (Eppendorf Transferman) equipado con un microscopio invertido Leica
15 DMi8. En el citoplasma de cada cigoto se inyectaron 3-5 pl de una mezcla de 100 ng/μl de ARNm poliadenilado codificante para Cas9, 50 ng/μl de ARN guía (sgARN) y 10 ng/μl de ADN molde en forma de oligonucleótido de cadena simple, utilizando una aguja de microinyección de filamento de aproximadamente 1 μm de diámetro, empleando presión
20 positiva para el desplazamiento de la solución desde la aguja hacia el citoplasma (sistema Eppendorf Femtojet). Tras la microinyección, los embriones se cultivaron en EmbryoMax KSOM Mouse Embryo Media (Millipore) a 37°C con 5% de CO₂ y 5% O₂ durante 4 días, hasta que alcanzaron el estadio de blastocisto. Se transfirieron 14 blastocistos a una hembra receptora Swiss mediante la técnica utero-tubal descrita en Bermejo-Álvarez et al. JoVE 2014.

25

Los estudios realizados con animales fueron revisados y aprobados según el Real Decreto 53/2013 y la Directiva 2010/63/UE. Todos los procedimientos utilizados fueron aprobados por la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad Complutense de Madrid, el Comité de Ética
30 del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y la Comunidad de Madrid (PROEX 040/17, PROEX 358.4/21).

Ejemplo 1.3. Genotipado de los mutantes 1857 FTM

Para limitar los procedimientos traumáticos sobre los individuos homocigotos, debido al
35 riesgo de posibles trastornos hemorrágicos, la toma de tejido para genotipar estos ratones

se realizó aprovechando el marcado de los animales en la oreja para obtener las muestras, administrando previamente de forma local crema anestésica EMLA (25 mg/g lidocaína + 25mg/g prilocaína). De esta forma, se utilizaba el tejido que se desprendía de la perforación para genotipar sin sufrimiento adicional para los animales. Dicho marcado de oreja se realizaba a los 21 días de edad en el momento del destete de la camada.

Los individuos de cada camada se separaron por sexo y se dividieron los individuos por caja según las dimensiones de esta. El marcado de la oreja se realizó perforando un único agujero. Se establecieron 6 posiciones distintas (tres en cada oreja) de manera que todos los animales se pudieran distinguir por la perforación, la caja donde estaban alojados y el sexo.

Cuando se procedió a la realización del genotipado, a partir de las muestras tomadas durante el marcaje, se extrajo el ADN mediante un protocolo de lisis y extracción utilizando Viagen DirectPCR® Lysis Reagent (Viagen Biotech) añadiendo, a 1 ml de reactivo de lisis, 10 µl de una solución de proteinasa K con una concentración de 20mg/ml, y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se realizó una PCR con el ADN obtenido y los cebadores F: 5'-AGAGAGCT CCGTCACAACAT-3' (SEQ ID NO: 14) y R: 5'-ACACTTTTACACTTCTGCCCG-3' (SEQ ID NO: 15). Los ciclos fueron los siguientes: 94°C 2 minutos 35 x (94°C 20 segundos, 60°C 30 segundos, 72°C 30 segundos) y una elongación final a 72°C 5 minutos. El producto de la PCR se purificó mediante GEL/PCR Purification Mini Kit (Favorgen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El fragmento amplificado fue el de la secuencia WT detallada en la tabla anterior e identificado con SEQ ID NO: 12.

Para obtener la secuencia de los diferentes individuos y poder clasificarlos en individuos WT (no portadores de la mutación), individuos heterocigotos (portadores de la mutación 1857FTM en un solo alelo) e individuos homocigotos, se utilizó el procedimiento de secuenciación Sanger que se realizó en la Unidad de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid. Se obtuvieron los animales necesarios para el consecuente estudio coagulométrico mediante cruzamientos entre individuos heterocigotos. Dichos cruzamientos cumplían las leyes mendelianas (50% heterocigotos, 25% WT y un 25% homocigotos).

35

Ejemplo 2. Estudios de coagulometría

Se seleccionaron 6 animales WT, 6 heterocigotos y 6 homocigotos obtenidos como se describe en el ejemplo 1.3.

5 Para establecer rectas patrón, se extrajo sangre a los animales WT para la obtención de “pooles” de plasma. Se sujetó el animal sin anestesia de forma manual, desinfectando la zona de punción con clorhexidina, y con una aguja de 23G se realizó una punción en el seno submandibular y se obtuvo la sangre en tubos de 0,5 ml en citrato sódico (3,2%). Tras la extracción se aplicó presión en el lugar de punción hasta comprobar que el animal había
10 dejado de sangrar, volviendo a desinfectar la zona con clorhexidina, y tras la administración de suero fisiológico subcutáneo se devolvió el animal a la caja. Se dejó descansar una semana a los animales hasta la siguiente extracción, para evitar un daño continuo al animal y para que se recuperara la volemia.

15 La extracción de sangre individual de los animales para estudios de coagulometría se realizó de la misma manera que los “pooles”. La sujeción del animal se realizó sin anestesia, de forma manual, desinfectando la zona de punción con clorhexidina. La punción en el seno submandibular se realizó con una aguja de 23G obteniendo 0,25 ml de sangre en tubos de 0,25 ml en citrato sódico al 3,2%. Tras la extracción se aplicó presión en el
20 lugar de incisión hasta comprobar que el animal había dejado de sangrar, se desinfectó la zona con clorhexidina, se administró tres veces (0,75 ml) suero salino fisiológico atemperado vía intraperitoneal y se devolvieron los animales a la caja.

Como ya se ha indicado, se emplearon 6 animales por grupo (WT, heterocigotos y
25 homocigotos), se extrajeron los plasmas, se realizaron las curvas de calibración con “pooles” de individuos WT y se midió el tiempo de protrombina (TP), el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) y los niveles de FV.

Las determinaciones de FV, TP y TTPa se realizaron en un coagulómetro de viscosidad
30 STart Max II R (Diagnostica Stago S.A.S. Barcelona, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se siguieron estrictamente los programas correspondientes a cada parámetro como se indica en los ejemplos 2.1-2.3. Para realizar las mediciones, se colocaron en el coagulómetro una serie de cubetas (Start 4 Cuve, Diagnostica Stago S.A.S. Barcelona, España) a las que posteriormente se añadieron esferas metálicas (Diagnostica
35 Stago S.A.S. Barcelona, España). Todos los reactivos se reconstituyeron siguiendo las

instrucciones del fabricante. Una vez vertidos todos los reactivos y la muestra en las cubetas, se inició la reacción. La determinación finalizó automáticamente en cuanto se formó el coágulo. Al mismo tiempo que se realizaban las determinaciones, se efectuaron controles positivos y negativos de los reactivos System control N/P (Diagnostica Stago S.A.S. Barcelona, España). Se observó un alargamiento en los tiempos de coagulación tanto en el caso del factor V como de los tiempos de protrombina y tromboplastina parcial activada, siendo estadísticamente significativa la diferencia en los individuos homocigotos respecto de los individuos WT.

10 **Ejemplo 2.1. Determinación de factor V**

Para la determinación de FV se utilizó plasma deficiente en FV (StaDeficient V Diagnostica Stago S.A.S. Barcelona, España), junto con neoplastina CI+5 (Diagnostica Stago S.A.S. Barcelona, España), con un índice de sensibilidad internacional (ISI) de 1,27. Se colocaron esferas metálicas en las cubetas del calibrador que se precalentaron a 37°C durante 3 minutos. Una vez reconstituida, la neoplastina CI+5 se homogeneizó y se precalentó a 37°C durante 3 minutos antes de su uso. El tampón Owren Koller (Diagnostica Stago S.A.S. Barcelona, España) se dejó reposar durante 30 minutos para llevarlo a temperatura ambiente y luego realizar las diluciones correspondientes. Se introdujo en la cubeta una mezcla de 50 µl de plasma deficiente en FV y 50 µl de la muestra a analizar (diluida en tampón Owren Koller). Tras un periodo de incubación de 60 segundos, se añadieron 100 µl de Neoplastina CI+5. Las curvas de calibración se calcularon utilizando "pooles" de plasma de ratón de los individuos WT (sanos) siguiendo el mismo procedimiento que para la curva de calibración. La curva de calibración realizada con el "pool" de plasma se realizó utilizando diluciones 1:100, 1:200, 1:400 y 1:800. Las muestras individuales se diluyeron 1:100. Los datos obtenidos se expresaron en segundos (Figura 3) y porcentajes (Figura 4).

Ejemplo 2.2. Determinación del tiempo de protrombina

Para calcular el TP se utilizó neoplastina CI+5 con un ISI de 1,27. Se colocaron esferas metálicas en cada cubeta del calibrador y se precalentaron a 37°C durante 3 minutos. Una vez reconstituida, la Neoplastina CI+5 se homogeneizó y se precalentó a 37°C durante 3 minutos antes de su uso. Se introdujeron un total de 50 µl de la muestra en el pocillo y, tras 60 segundos de incubación, se añadieron 100 µl de Neoplastine CI+5. Se dejó reposar el tampón Owren Koller durante 30 minutos antes de realizar las diluciones pertinentes. La curva de calibración con el "pool" de plasma de ratón se creó siguiendo el mismo procedimiento que con el calibrador comercial. Se emplearon diluciones 1:3, 1:6, 1:9 y 1:12;

las muestras individuales se diluyeron a 1:3. Los datos de TP obtenidos de las mediciones individuales se expresaron en segundos (Figura 3) y porcentajes (Figura 4); la relación normalizada internacional (INR) se calculó como la relación entre el TP de la muestra y el TP de referencia derivado de mezclar todas las alícuotas individuales, elevada a la potencia
5 ISI.

Ejemplo 2.3. Determinación del tiempo de tromboplastina parcial activada

El TTPa se midió colocando esferas metálicas en todas las cubetas del calibrador comercial y precalentándolas a 37°C durante 3 minutos. Se añadió a la cubeta un total de 50 µl de
10 una dilución 1:1 de plasma y 50 µl de PPT Automate (Diagnostica Stago S.A.S. Barcelona, España); tras incubar la mezcla durante 180 segundos, se añadieron 50 µl de CaCl₂ 0,025M (Diagnostica Stago S.A.S. Barcelona, España). Los datos obtenidos se expresaron en segundos (Figura 3).

15 Ejemplo 3. Signos clínicos

En los individuos homocigotos con la mutación 1857FTM se observó sangrado tras la realización de la punción para el marcado de oreja. Estas hemorragias se corrigieron a los
10 segundos tras aplicación de presión con gasa estéril, y no representaron ningún sufrimiento para el animal. Las hemorragias en la oreja tras la punción para el marcado no
20 se dieron en los individuos WT ni en los heterocigotos. En ningún caso se observaron hemorragias espontáneas internas o externas.

REIVINDICACIONES

1. Modelo animal no humano deficiente en factor V de la coagulación cuyo genoma comprende un gen *F5* con una mutación que se traduce en un cambio de aminoácido en la proteína FV que reproduce la mutación humana Thr1898Met, incluyendo en la numeración de los aminoácidos el péptido señal de la proteína FV humana.
5
2. Modelo animal según la reivindicación 1 en el que el animal es un ratón (*Mus musculus*) y la mutación en la proteína FV está localizada en Thr1857Met.
10
3. Modelo animal según la reivindicación 2 en el que el ratón incluye en la secuencia del gen *F5* la mutación C>T 5695.
4. Modelo animal según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el animal es heterocigoto para la mutación.
15
5. Modelo animal según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en el que el animal es homocigoto para la mutación.
6. Modelo animal según la reivindicación 5 en que el animal es viable con signos clínicos leves de enfermedad y sin sufrimiento para el animal.
20
7. Método para producir un modelo animal según se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores que incluye modificar el genoma del animal en el gen *F5* mediante una mutación que se traduce en un cambio de aminoácido en la proteína FV que reproduce la mutación humana Thr1898Met, incluyendo en la numeración de los aminoácidos el péptido señal de la proteína FV, donde la mutación se produce mediante edición génica y los animales mutados se obtienen por técnicas de reproducción asistida con microinyección de cigotos.
25
8. Método para producir un modelo animal según la reivindicación 7 en el que el animal utilizado es un ratón y la mutación en la secuencia del gen *F5* se produce en C>T 5695.
30
9. Uso del modelo animal definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para probar fármacos específicos para el tratamiento de la deficiencia en factor V de la coagulación.
35

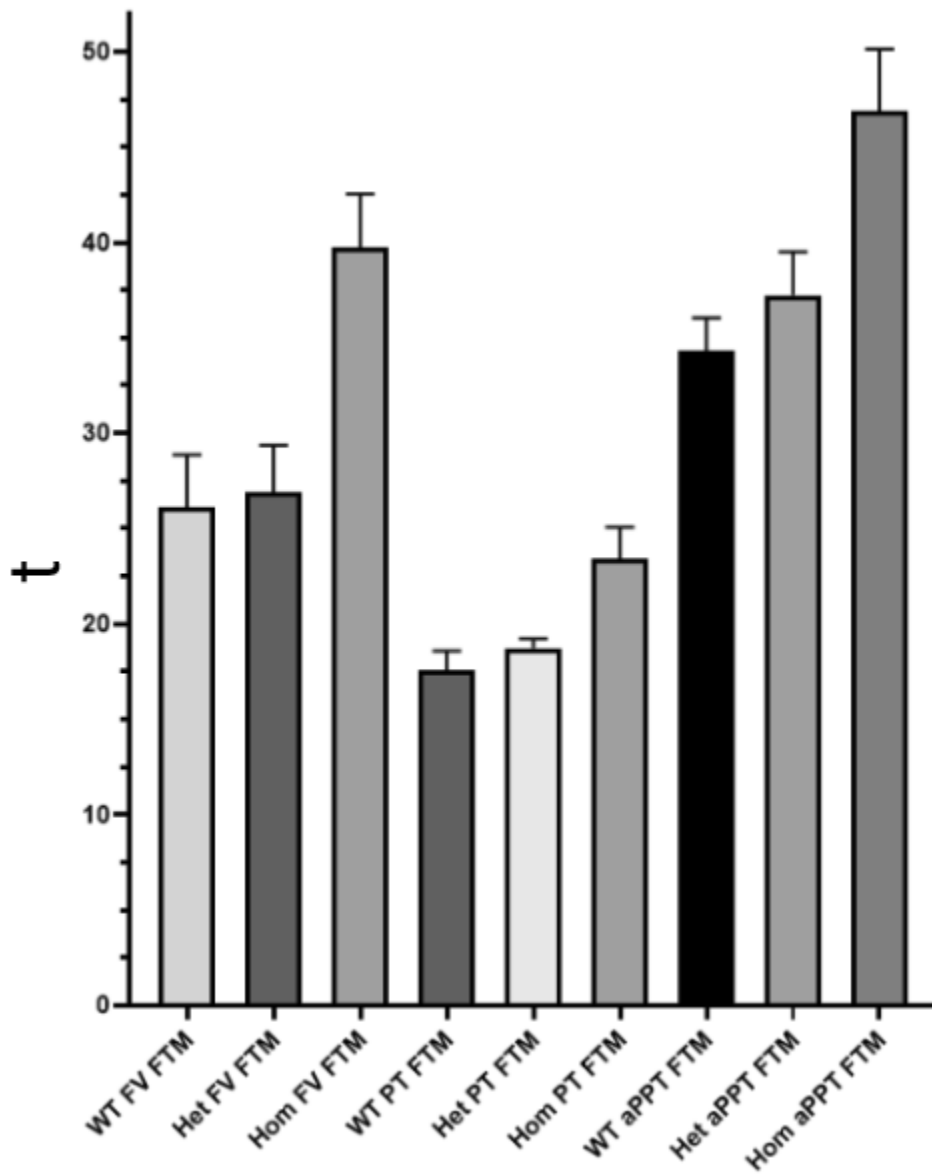


Fig. 3

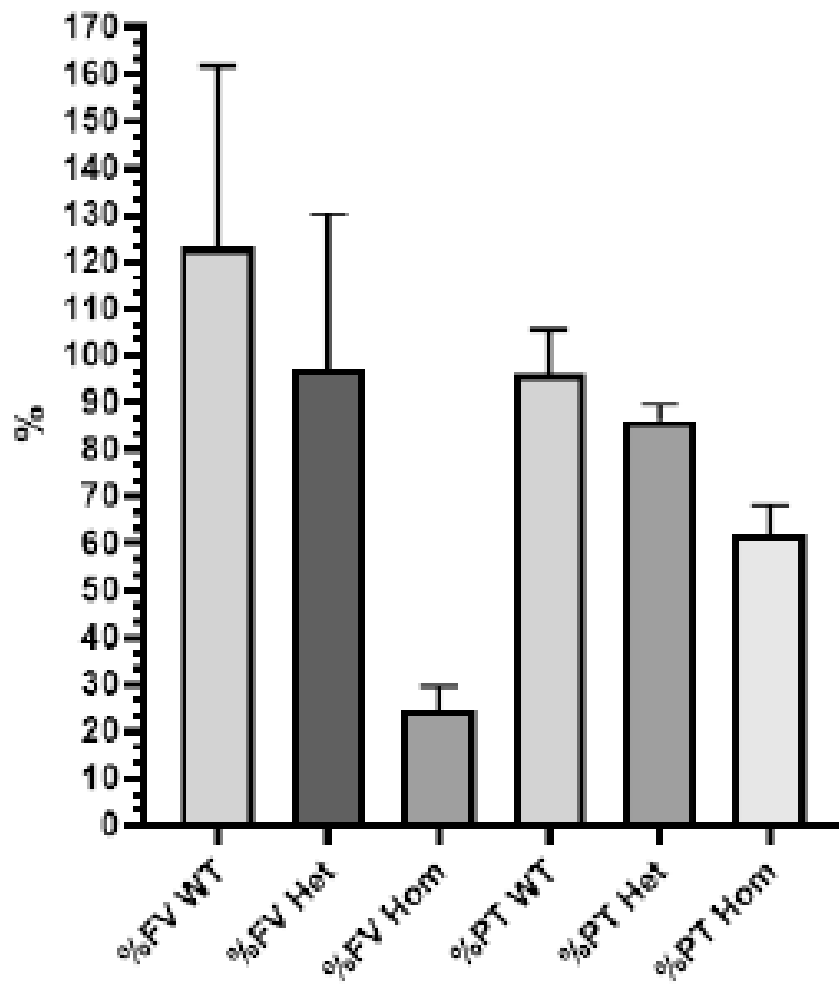


Fig. 4