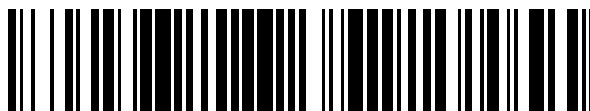


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 788**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07836260 .5**
96 Fecha de presentación: **26.07.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2044223**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.04.2009**

54 Título: **Diagnóstico y tratamiento de degeneración macular relacionada con la edad**

30 Prioridad:
26.07.2006 US 833497 P
22.03.2007 US 919409 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.11.2012

73 Titular/es:
YALE UNIVERSITY, INC. (100.0%)
2 WHITNEY AVENUE
NEW HAVEN CT 06511, US

72 Inventor/es:
HOH, JOSEPHINE y
DEWAN, ANDREW

74 Agente/Representante:
LEHMANN NOVO, María Isabel

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).

ES 2 391 788 T3

DESCRIPCIÓN

Diagnóstico y tratamiento de degeneración macular relacionada con la edad

Financiación del gobierno

Esta invención se obtuvo con apoyo del Gobierno desde el National Institutes of Health con la Concesión nº R01EY15771.

Antecedentes de la invención

La degeneración macular relacionada con la edad (AMD) es la causa principal de pérdida de visión y ceguera entre individuos ancianos en los Estados Unidos de América y a lo largo del mundo desarrollado. Tiene una etiología compleja que implica factores genéticos y medioambientales. AMD está ampliamente clasificada como seca (no neovascular) o húmeda (neovascular). La forma seca es más habitual, dando cuenta de aproximadamente 85%-90% de pacientes con AMD, y no da como resultado típicamente ceguera. El signo clínico principal de AMD seca es la presencia de drusen blando con márgenes borrosos (depósitos de proteína extracelulares) entre el epitelio del pigmento retiniano (RPE) y la membrana de Bruch. La acumulación de estos drusen está asociada con atrofia geográfica central (CGA), y da como resultado visión central borrosa. Alrededor de 10% de pacientes con AMD tienen la forma húmeda, en la que se forman nuevos vasos sanguíneos y se rompen más allá de la retina (neovascularización coroidal [CNV]). Esta fuga causa daño permanente al tejido retiniano circundante, distorsionando y destruyendo la visión central. El por qué algunos individuos desarrollan la forma húmeda más agresiva de AMD mientras otros tienen el tipo seco que progresa lentamente, no está bien comprendido.

Jakobsdottir et al., 2005 (American Journal of Human Genetics 77(3):389-407) describe un método para identificar un individuo con riesgo de desarrollar degeneración macular relacionada con la edad (AMD), que comprende ensayar el SNP definido por rs10490924 en el gen teórico LOC387715, adyacente a la región reguladora de HTRA1 (véase Materiales y la Tabla 6). El genotipado se realiza usando sondas específicas de alelos en matrices de SNP de alta densidad (página 392, col. 2). Este documento también estudia varios SNP en el gen de PRSS11, un nombre alternativo para HTRA1, en busca de la asociación con AMS (véase la Figura 1 y la Tabla 6).

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a la identificación de una variación en un gen humano correlacionado con la aparición de degeneración macular relacionada con la edad, que es útil para identificar o ayudar a identificar individuos con riesgo de desarrollar degeneración macular relacionada con la edad, así como para diagnosticar o ayudar en el diagnóstico de degeneración macular relacionada con la edad (identificar o ayudar a identificar individuos que sufren degeneración macular relacionada con la edad). Los métodos y composiciones también son útiles para monitorizar el estatus (por ejemplo, progresión o inversión) de la degeneración macular relacionada con la edad. Los métodos y composiciones de la presente invención son útiles para identificar o ayudar a identificar individuos de una variedad de razas y etnias, y, en realizaciones particulares, se llevan a cabo a fin de identificar o ayudar a identificar individuos caucásicos o asiáticos que sufren o tienen riesgo de desarrollar degeneración macular relacionada con la edad. La invención también se refiere a métodos para identificar o ayudar a identificar individuos que sufren o tienen riesgo de desarrollar degeneración macular relacionada con la edad, y a métodos para diagnosticar o ayudar en el diagnóstico de degeneración macular relacionada con la edad (identificar individuos que sufren / individuos que tienen degeneraciones maculares relacionadas con la edad).

La presente invención proporciona métodos, kits de diagnóstico y composiciones como se definen en las reivindicaciones.

Los métodos de esta invención pueden comprender, además de determinar si está presente una variante de HTRA1, determinar si una o más variantes adicionales que están correlacionadas con la aparición de degeneración macular relacionada con la edad están presentes en un individuo que se evalúa. Variantes adicionales, distintas de una variante de HTRA1, que se pueden detectar incluyen, pero no se limitan a, una variación en ácidos nucleicos (ADN, ARN) que codifican la proteína de CFH (por ejemplo, una variación que codifica histidina en la posición 402 de la proteína de CFH); una variación que codifica un resto de aminoácido distinto de alanina en la posición 69 de la proteína LOC387715 (por ejemplo, una serina en esa posición); y una variación que corresponde al polimorfismo de un solo nucleótido identificado como rs10490924. Algunas o todas estas variantes, así como otras correlacionadas con la aparición de degeneración macular relacionada con la edad, se pueden determinar y/o cuantificar en una muestra procedente de un individuo que está siendo evaluado.

La invención se refiere a un método para monitorizar el estado de la degeneración macular relacionada con la edad en un individuo (ser humano). El método es útil para evaluar, por ejemplo, si la degeneración macular relacionada con la edad ha progresado (ha alcanzado una etapa más avanzada o tardía) en el individuo. Esto es útil, por ejemplo, al evaluar los efectos/eficacia de los tratamientos que ha recibido un individuo. Los métodos de esta invención pueden ayudar a mostrar, por ejemplo, que un tratamiento ha sido eficaz, puesto que pueden mostrar si se ha producido la regresión (mejoría, parcial o completa) de AMD. El método también se puede usar para evaluar si ha progresado (empeorado) AMD en un individuo. Esta realización se puede llevar a cabo, por ejemplo, evaluando el

grado en el que está presente un gen de HTRA1 variante que comprende una variación en una región no codificante como se describe, en una muestra obtenida del individuo. Si el HTRA1 variante está presente en la muestra en menor grado después del tratamiento (que antes del tratamiento), esto es una indicación de regresión de AMD, y que el tratamiento fue eficaz.

5 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un esquema que representa los genes en la región de 4 gametos en el cromosoma 10q26, así como la localización de SNPs genotipados mediante micromatrices (+) e identificados mediante secuenciación (|). SNP rs10490924 está marcado como "8", y rs11200638 está marcado con un asterisco.

10 Las Figuras 2A-B son gráficas que representan resultados obtenidos mediante PCR cuantitativa (qPCR) de ChIP DNA preparado a partir de células HeLaS3: Figura 2A AP-2 α (línea continua), Figura 2B SRF (línea continua), y (Figura 2A y 2B) inmonoglobulina G de conejo normal (línea discontinua) representan las inmunoprecipitaciones analizadas. También se ensayaron promotores de control positivo y negativo. El log (ΔR_n) (eje y) se representa gráficamente frente al número de ciclos de PCR (eje x). Entre paréntesis se muestra el incremento en número de veces de los valores $\Delta\Delta C_t$ de la transcripción calculado con relación a las reacciones de PCR de referencia).

La Figura 3 es una representación de un análisis computacional de la secuencia del promotor de HTRA1. Secuencias ortólogas humanas y de ratón en el promotor de HTRA1; los nucleótidos conservados están marcados con símbolo de asterisco.

20 La Figura 4A es una gráfica que representa los valores de log P (eje y) de análisis de asociación para los 15 SNPs en la región de AMD 10q usando 442 casos de AMD y 309 controles (véase también la tabla 2). Para los rs10490924 (cuadrado) y rs11200638 (triángulo), las asociaciones se derivaron de un tamaño de muestras más grande (581 casos de AMD).

25 La Figura 4B es una gráfica de barras que representa los resultados obtenidos mediante análisis semicuantitativo mediante RT-PCR en tiempo real de niveles de ARN de HTRA1 en linfocitos de la sangre procedente de tres pacientes con AMD con el genotipo AA y tres controles normales con el genotipo GG. La significancia estadística de las diferencias en el nivel de expresión se examinó usando una prueba de la t de muestras independientes (SPSS versión 13.0): AA:GG (P=0,02). Las barras de error indican el intervalo de confianza de 95,0% de la media.

Descripción detallada de la invención

30 El descubrimiento de que una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 está asociada con AMD es útil para el diagnóstico y tratamiento de individuos, tales como aquellos que sufren o tienen riesgo de desarrollar degeneración macular relacionada con la edad. La determinación de la constitución genética del gen de HTRA1 en un individuo es útil como base para diagnosticar o tratar AMD en etapas más tempranas, o incluso antes de que un individuo presente síntomas de AMD. Además, los ensayos de diagnóstico para genotipar HTRA1 pueden permitir que los individuos alteren su comportamiento para minimizar los riesgos medioambientales para AMD (por ejemplo, tabaquismo, obesidad). La presente invención se refiere a la identificación de un gen de HTRA1 variante correlacionado con la aparición de AMD, que es útil para identificar o ayudar a identificar individuos con riesgo de desarrollar AMD, así como para diagnosticar o ayudar a diagnosticar AMD. También se refiere a métodos para identificar o ayudar a identificar individuos con riesgo de desarrollar AMD, a métodos para diagnosticar o ayudar a diagnosticar AMD, a métodos para monitorizar el estado (por ejemplo, progresión, inversión) de AMD, a polinucleótidos (por ejemplo, sondas, cebadores) útiles en los métodos, a kits de diagnóstico que contienen sondas o cebadores, a métodos para tratar un individuo con riesgo de o que sufre AMD, y a composiciones útiles para tratar un individuo con riesgo de o que sufre AMD.

45 Se ha demostrado que una variación habitual en la región no codificante del gen de HTRA1 humano está fuertemente asociada con AMD. La presente invención se refiere a métodos y a composiciones para detectar tales variaciones que están correlacionadas con la aparición de degeneración macular relacionada con la edad en seres humanos.

50 HtrA (requisito de temperatura elevada) se identificó inicialmente en *E. coli* como una proteína de choque térmico, y se encontró subsiguientemente que existe de forma ubicua en microbios, plantas y animales. HTRA1 humana es un miembro de la familia de HtrA de serina proteasas. Sus rasgos estructurales incluyen un dominio de serina proteasa semejante a tripsina muy conservado, así como un dominio de proteína de unión a factor de crecimiento semejante a insulina y un motivo inhibidor de serina proteasa de tipo Kazal.

55 Se ha observado la reducción de la expresión del gen de HTRA1 humano en ciertos cánceres (cáncer de ovarios, melanoma), en estrecha correlación con progresión maligna y metástasis de estos tumores. Por otro lado, la sobreexpresión de HTRA1 en tumores suprime la proliferación y migración de células tumorales, sugiriendo que HTRA1 tiene propiedades supresoras de tumores en ciertos cánceres. Contrariamente al tejido tumoral, la expresión

de HTRA1 está aumentada en el músculo esquelético de distrofia muscular de Duchenne y en cartílago de articulaciones osteoartríticas, que puede contribuir al desarrollo de esta enfermedad.

La variación en la región no codificante del gen de HTRA1 humano que está fuertemente asociado con AMD descrita aquí es la variación que corresponde al polimorfismo de un solo nucleótido identificado como rs11200638. La variación es un polimorfismo de un solo nucleótido (G→A) en la región del promotor del gen de HTRA1 humano. Un polimorfismo de un solo nucleótido situado en la región reguladora no codificante en la posición -512, con relación al sitio de iniciación de la transcripción putativo del gen de HTRA1 humano en el cromosoma 10 humano, está asociado con el riesgo de desarrollar degeneración macular relacionada con la edad (AMD). Este polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) se identifica como rs11240638. Basándose en esta asociación como se describe aquí, es posible determinar si un individuo tiene riesgo de desarrollar AMD usando ensayos de diagnóstico que se pueden llevar a cabo de forma habitual y reproduciblemente en una variedad de muestras procedentes del individuo. Si la variante de HTRA1 se detecta en una muestra usando un ensayo de diagnóstico, este hallazgo se puede usar para determinar si un individuo tiene riesgo de desarrollar AMD, para ayudar a diagnosticar AMD, o para confirmar un diagnóstico de AMD basado en otros datos.

La región promotora es la región reguladora de un gen que es una sección codificante no codificante que no se traduce en una secuencia proteica. Ciertos factores de transcripción celulares se pueden unir a la región promotora de un gen para influir sobre su actividad transcripcional. El polimorfismo de un solo nucleótido que se identifica como rs11200638 está situado en la posición -512 con relación al sitio de iniciación de la transcripción putativo.

Los polimorfismos en la región promotora pueden alterar, en ciertas circunstancias, la capacidad de los factores de transcripción para unirse al promotor, por ejemplo cambiando la afinidad de un sitio de unión al factor de transcripción situado en la secuencia promotora, para el factor de transcripción correspondiente.

Los cambios en la unión del factor de transcripción al promotor pueden afectar a la actividad de un promotor, por ejemplo la actividad transcripcional del promotor, lo que puede influir en la velocidad de transcripción de un gen. Una mayor velocidad de transcripción puede conducir a que se produzca más proteína correspondiente. Una menor velocidad de transcripción puede conducir a que se produzca menos proteína correspondiente. Los cambios en los niveles proteicos pueden afectar a muchos procesos biológicos, y pueden tener potencialmente efectos debilitantes.

El término "G→A", como se usa aquí, significa un cambio de una única base nucleotídica de una G de tipo salvaje a una A variante en una cierta posición en el genoma. Tales cambios son conocidos en la técnica como "polimorfismos de un solo nucleótido" o SNP(s). Tales cambios pueden afectar a uno o a ambos alelos, y esto puede ocurrir de una manera heterocigota u homocigota. El cambio "G→A", como se usa aquí, se entiende que incluye ambos genotipos posibles; un cambio G→A heterocigoto y un cambio GG→AA homocigoto, incluso aunque se denomine aquí solamente como G→A por razones de simplicidad.

Un gen de HTRA1 puede ser el ADNc o la forma genómica del gen, que puede incluir secuencias reguladoras en dirección arriba y en dirección abajo, tales como secuencias promotoras. El polipéptido de HTRA1 se puede codificar mediante una secuencia codificante de longitud completa, o mediante cualquier porción de la secuencia codificante, en tanto que se retenga la actividad deseada o las propiedades funcionales (por ejemplo, actividad enzimática, unión a ligando, transducción de señal, etc) de la longitud completa o del fragmento. El gen de HTRA1 puede incluir además secuencias localizadas adyacentes a la región codificante tanto en los extremos 5' como 3' para una distancia de alrededor de alrededor de 1-2 kb en cualquier extremo, de manera que el gen corresponde a la longitud del ARNm de longitud completa. Las secuencias que están situadas 5' de la región codificante y que están presentes en el ARNm se denominan como secuencias no traducidas de 5'. Las secuencias que están situadas 3' o en dirección de la región codificante y que están presentes en el ARNm se denominan como secuencias no traducidas de 3'.

Para proporcionar una comprensión global de la invención, ahora se describirán ciertas realizaciones ilustrativas, incluyendo composiciones y métodos para identificar o ayudar a identificar individuos con riesgo de desarrollar AMD, así como para diagnosticar o ayudar en el diagnóstico de AMD. Sin embargo, se entenderá por un experto normal en la técnica que las composiciones y métodos descritos aquí se pueden adaptar y modificar como sea apropiado para la solicitud señalada, y que las composiciones y métodos descritos aquí se pueden emplear en otras aplicaciones adecuadas, y que tales otras adiciones y modificaciones no se separaran del alcance de la misma.

Sondas y cebadores polinucleotídicos de HTRA1

0020 Se describen aquí polinucleótidos aislados y/o recombinantes que detectan específicamente una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 que está correlacionado con la aparición de AMD. Tal variación en el promotor de HTRA1 es el polimorfismo de un solo nucleótido que se identifica como rs 11200638. Las sondas polinucleotídicas se pueden hibridar a una variación (denominada como variación de interés) en un gen de HTRA1 de una manera específica y tiene típicamente una secuencia que es completa o parcialmente complementaria a la secuencia de la variación. Las sondas polinucleotídicas también se pueden hibridar a secuencias en uno cualquiera o en ambos lados de la variación de interés; se pueden hibridar a secuencias de flanqueo en uno cualquiera o en ambos lados de la variación de interés. Las sondas polinucleotídicas se pueden hibridar a un segmento de ADN

diana, de manera que la variación se alinea con una posición central de la sonda, o la variación se puede alinear con otra posición, tal como una posición terminal, de la sonda.

Una sonda polinucleotídica se puede hibridar, en condiciones restrictivas, a una molécula de ácido nucleico que comprende un gen de HTRA1 variante, o una porción o variante alélica del mismo, que está correlacionado con la aparición de AMD en seres humanos. Por ejemplo, una sonda polinucleotídica se hibrida a una variación en el promotor de HTRA1 que está correlacionada con la aparición de AMD en seres humanos. En un ejemplo específico, la variación es una base nucleotídica distinta de G en la posición -512 con relación al sitio de iniciación de la transcripción putativo del gen de HTRA1 humano. Una sonda polinucleotídica se puede hibridar, en condiciones restrictivas, a una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) de un gen de HTRA1, o una variante alélica del mismo, en la que la molécula de ácido nucleico comprende una variación que está correlacionada con la aparición de AMD en seres humanos, tal como la variación que se identifica como SNP rs 11200638.

Una sonda polinucleotídica puede ser una sonda específica de alelos. El diseño y uso de sondas específicas de alelos para analizar polimorfismos se describen, por ejemplo, por Saiki et al., *Nature* 324: 163-166 (1986); Dattagupta, documento EP 235726; y Saiki, documento WO 89/11548. Las sondas específicas de alelos se pueden diseñar para que se hibriden a un segmento de un ADN diana procedente de un individuo, pero que no se hibriden al segmento correspondiente de otro individuo debido a la presencia de formas polimórficas diferentes o variaciones en los segmentos respectivos de los dos individuos. Las condiciones de hibridación deberían ser suficientemente restrictivas de manera que haya una diferencia significativa en la intensidad de hibridación entre los alelos. En algunas realizaciones, una sonda se hibrida a sólo uno de los alelos.

Mediante los métodos y polinucleótidos descritos aquí, se puede detectar una variedad de variaciones en el gen de HTRA1 que predisponen a un individuo a AMD. En una realización específica, la variación en el gen de HTRA1 que está correlacionado con la aparición de AMD es una variación en la región no codificante del gen de HTRA1. Más específicamente, la variación es un polimorfismo de un solo nucleótido (G→A) en la posición -512 del sitio de iniciación de la transcripción putativo del promotor del gen de HTRA1 humano. Este polimorfismo se identifica como rs11200638. Los polimorfismos distintos de aquellos en la posición -512, descritos anteriormente, se pueden detectar en la región no codificante del gen de HTRA1 humano particularmente en la secuencia promotora usando los métodos y polinucleótidos descritos aquí.

Se puede detectar cualquier polimorfismo de nucleótido de una región codificante, exón, frontera de exón-intrón, péptido señal, región no traducida de 5', región promotora, secuencia potenciadora, región no traducida de 3' o intrón que esté asociado con AMD. Estos polimorfismos incluyen, pero no se limitan a, cambios que: alteran la secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas por el gen de HTRA1, producen productos de ajuste alternativos, crean productos truncados, introducen un codón de parada prematura, introducen un exón críptico, alteran el grado o expresión en mayor o menor grado, alteran la especificidad tisular de la expresión de HTRA1, introducen cambios en la estructura terciaria de las proteínas codificadas por HTRA1, introducen cambios en la afinidad de unión o especificidad de las proteínas expresadas por HTRA1, o alteran la función de las proteínas codificadas por HTRA1.

Se describen aquí polinucleótidos que son variantes de los polinucleótidos descritos aquí, con la condición de que los polinucleótidos variantes mantengan su capacidad para detectar específicamente una variación en la región no codificante del gen de HTRA1, tal como una variación en el promotor de HTRA1 (por ejemplo, una variación que codifica un cambio de posición -512 del sitio de iniciación de la transcripción putativo o el gen de HTRA1 humano) que está correlacionada con la aparición de AMD. Los polinucleótidos variantes pueden incluir, por ejemplo, secuencias que difieren en una o más sustituciones, adicciones o supresiones nucleotídicas.

El polinucleótido aislado puede ser una sonda que se hibrida, en condiciones restrictivas, a una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 que está correlacionado con la aparición de AMD en seres humanos. La sonda se puede hibridar a una variación que es el polimorfismo de un solo nucleótido (G→A) en la posición -512 del sitio de iniciación de la transcripción putativo del promotor del gen de HTRA1 humano, que se identifica como rs11200638. Como se usa aquí, el término "hibridación" se usa en referencia al emparejamiento de ácidos nucleicos complementarios. La expresión "detecta específicamente", como se usa en referencia a un polinucleótido, pretende decir, como se entiende generalmente en la técnica, que el polinucleótido es selectivo entre un ácido nucleico de interés y otros ácidos nucleicos no de interés. Tal polinucleótido puede distinguir entre la secuencia de un ácido nucleico de interés y la secuencia de un ácido nucleico que no es de interés de manera que el polinucleótido es útil para, como mínimo, detectar la presencia de la secuencia de ácido nucleico de interés en un tipo particular de muestra biológica. El término "sonda" se refiere a un polinucleótido que es capaz de hibridarse a un ácido nucleico de interés. El polinucleótido puede ser de origen natural, como en una digestión de restricción purificada, o se puede producir sintéticamente, de forma recombinante o mediante amplificación de ácidos nucleicos (por ejemplo, amplificación mediante PCR).

Es bien sabido en la técnica cómo llevar a cabo experimentos de hibridación con moléculas de ácido nucleico. El experto está familiarizado con las condiciones de hibridación requeridas en la presente invención, y entiende fácilmente que se pueden variar las condiciones de restricción apropiadas que promueven la hibridación del ADN. Tales condiciones de hibridación se citan en libros de texto estándar, tales como *Molecular Cloning: A laboratory*

Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (2001); y Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons (1992). Particularmente útiles en los métodos de la presente invención son los polinucleótidos que son capaces de hibridarse a un gen de HTRA1 variante, o una región de un gen de HTRA1 variante, en condiciones restrictivas. En condiciones restrictivas, un polinucleótido que se hibrida a un gen de HTRA1 variante no se hibrida a un gen de HTRA1 de tipo salvaje.

La hibridación de ácidos nucleicos se efectúa mediante condiciones tales como concentración salina, temperatura, disolventes orgánicos, composición de las bases, longitud de las hebras complementarias, y el número de desemparejamientos de bases nucleotídicas entre los ácidos nucleicos que se hibridan, como apreciarán fácilmente los expertos en la técnica. Las condiciones restrictivas de temperatura incluirán generalmente temperaturas por encima de 30°C, o pueden estar por encima de 37°C o 45°C. La restricción aumenta con la temperatura. Por ejemplo, temperaturas mayores que 45°C son condiciones muy restrictivas. Las condiciones restrictivas de sal serán normalmente menores que 1000 mM, o pueden ser menores que 500 mM o 200 mM. Por ejemplo, se podría llevar a cabo la hibridación a 6,0x de cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a alrededor de 45°C, seguido de un lavado de 2,0x SSC a 50°C. Por ejemplo, la concentración de sal en la etapa de lavado se puede seleccionar desde una baja restricción de alrededor de 2,0x SSC a 50°C hasta una elevada restricción de alrededor de 0,2x SSC a 50°C. Además, la temperatura en la etapa de lavado se puede incrementar desde condiciones de baja restricción a temperatura ambiente, alrededor de 22°C, hasta condiciones de restricción elevada a alrededor de 65°C. Tanto la temperatura como la sal se pueden variar, o la temperatura o la concentración de la sal se pueden mantener constantes mientras que se cambia la otra variable. Particularmente útiles en los métodos de la presente invención son polinucleótidos que son capaces de hibridarse a un gen de HTRA1 variante, o una región de un gen de HTRA1 variante, en condiciones restrictivas. Se entiende, sin embargo, que las condiciones de restricción apropiadas se pueden variar en la presente invención para promover la hibridación del ADN. En ciertas realizaciones, los polinucleótidos de la presente invención se hibridan a un gen de HTRA1 variante, o una región de un gen de HTRA1 variante, en condiciones muy restrictivas. En condiciones restrictivas, un polinucleótido que se hibrida a una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 no se hibrida a un gen de HTRA1 de tipo salvaje. En una realización, la invención proporciona ácidos nucleicos que se hibridan en condiciones de baja restricción de 6,0x SSC a temperatura ambiente, seguido de un lavado a 2,0x SSC a temperatura ambiente. La combinación de parámetros, sin embargo, es mucho más importante que la medida de cualquier parámetro individual. Véase, por ejemplo, Wetmur y Davidson, 1968. Las secuencias de las sondas también se pueden hibridar específicamente a un ADN dúplex en ciertas condiciones para formar complejos de ADN triplex o de orden superior. La preparación de tales sondas y las condiciones de hibridación adecuadas son bien conocidas en la técnica. Un método para obtener ADN que codifica los constructos biosintéticos descritos aquí es mediante ensamblaje de oligonucleótidos sintéticos producidos en un sintetizador de oligonucleótidos convencional, automatizado.

Una sonda o cebador polinucleotídico se puede marcar de manera que sea detectable en una variedad de sistemas de detección, incluyendo, pero sin limitarse a, sistemas enzimáticos (por ejemplo, ELISA, así como ensayos histoquímicos a base de enzimas), fluorescentes, radioactivos, químicos y luminiscentes. Una sonda o cebador polinucleotídico puede incluir además un resto extintor que, cuando se coloca próximo a un marcador (por ejemplo, un marcador fluorescente), hace que haya poca o ninguna señal procedente del marcador. La detección del marcador se puede realizar por medios directos o indirectos (por ejemplo, vía una ligación de biotina/avidina o biotina/estreptavidina). No se pretende que la presente invención esté limitada a ningún sistema de detección o marcador particular.

El polinucleótido aislado puede ser un cebador que se hibrida, en condiciones restrictivas, adyacente, en dirección arriba, o en dirección abajo a una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 que está correlacionado con la aparición de AMD en seres humanos. El polinucleótido aislado se puede hibridar, en condiciones restrictivas, a una molécula de ácido nucleico que comprende todo o una porción de un gen de HTRA1 variante que está correlacionado con la aparición de AMD en seres humanos. Como alternativa, el cebador polinucleotídico aislado se puede hibridar, en condiciones restrictivas, a una molécula de ácido nucleico que comprende al menos 50 nucleótidos contiguos de un gen de HTRA1 variante que está correlacionado con la aparición de AMD en seres humanos. Por ejemplo, un cebador polinucleotídico se puede hibridar adyacente, en dirección arriba, o en dirección abajo, a la región del gen de HTRA1 humano que codifica un cambio en la posición -512 del sitio de iniciación de la transcripción putativo del promotor del gen de HTRA1 humano, que se identifica como rs11200638.

Como se usa aquí, el término "cebador" se refiere a un polinucleótido que es capaz de actuar como un punto de iniciación de la síntesis de ácido nucleico cuando se coloca en condiciones en las que se produce la síntesis de un producto de extensión de cebador que es complementario a una hebra de ácido nucleico (por ejemplo, en presencia de nucleótidos, un agente inductor tal como ADN polimerasa, y temperatura, pH y concentración de electrolitos adecuados). Como alternativa, el cebador puede ser capaz de ligarse a un ácido nucleico próximo cuando se coloca en condiciones en las que se produce la ligación de dos ácidos nucleicos no ligados (por ejemplo, en presencia de un ácido nucleico próximo, un agente inductor tal como ADN ligasa, y temperatura, pH y concentración de electrolitos adecuados). Un cebador polinucleotídico puede ser de origen natural, como en una digestión de restricción purificada, o se puede producir sintéticamente. El cebador es preferiblemente monocatenario para la eficiencia máxima en la amplificación, pero puede ser, como alternativa, bicatenario. Si es bicatenario, el cebador se trata primeramente para separar sus hebras antes de ser usado. Preferiblemente, el cebador es un oligodesoxirribonucleótido. Las longitudes exactas de los cebadores dependerán de muchos factores, incluyendo

temperatura, fuente del cebador, y el uso del método. En ciertas realizaciones, el cebador polinucleotídico de la invención tiene al menos 10 nucleótidos de longitud, y se hibrida a un lado u otro de una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 que está correlacionado con la aparición de AMD en seres humanos. Los presentes polinucleótidos pueden contener alteraciones, tales como una o más sustituciones, adiciones o supresiones nucleotídicas, con la condición de que se hibriden a su gen de HTRA1 variante diana con el mismo grado de especificidad.

Se describe aquí un par de cebadores que detectan específicamente una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 que está correlacionado con la aparición de AMD en seres humanos, tal como la variación identificada como SNP rs 11200638. En tal caso, el primer cebador se hibrida en dirección arriba de la variación, y el segundo cebador se hibrida en dirección abajo desde la variación. Se entiende que uno de los cebadores se hibrida a una hebra de una región de ADN que comprende una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 que está correlacionado con la aparición de AMD, y el segundo cebador se hibrida a la hebra complementaria de una región de ADN que comprende una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 que está correlacionado con la aparición de AMD en seres humanos. Como se usa aquí, la expresión "región de ADN" se refiere a una longitud subcromosómica de ADN.

También se describe aquí un cebador específico de alelos que se hibrida a un sitio en ADN diana que solapa una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 que está correlacionado con la aparición de AMD en seres humanos. Un cebador específico de alelos de la invención sólo ceba la amplificación de una forma alélica a la que el cebador presenta una complementariedad perfecta. Este cebador se puede usar, por ejemplo, junto con un segundo cebador que se hibrida en un sitio distante. La amplificación puede transcurrir así a partir de los dos cebadores, dando como resultado un producto detectable que indica la presencia de un gen de HTRA1 variante que está correlacionado con la aparición de AMD en seres humanos.

3. Ensayos de detección

Se describen aquí polinucleótidos útiles para detectar una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 que está correlacionado con la aparición de degeneración macular relacionada con la edad, tal como la variación identificada como SNP rs11200638. Preferiblemente, estos polinucleótidos son capaces de hibridarse en condiciones de hibridación restrictivas a una región de ADN que comprende una variación en la región no codificante, por ejemplo en la región promotora, del gen de HTRA1 que está correlacionado con la aparición de degeneración macular relacionada con la edad.

Los polinucleótidos de la invención se pueden usar en cualquier ensayo que permita la detección de una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 humano que está correlacionado con la aparición de AMD. Tales métodos pueden englobar, por ejemplo, métodos de secuenciación de ADN, hibridación, ligación, o de extensión del cebador. Además, en la invención se puede utilizar cualquier combinación de estos métodos. En una realización, la presencia de una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 humano que está correlacionado con la aparición de AMD se detecta y/o determina mediante secuenciación de ADN. La determinación de la secuencia de ADN se puede llevar a cabo por métodos estándar tales como la tecnología de terminación de cadena didesoxi y electroforesis en gel, o mediante otros métodos tales como pirosecuenciación (Biotage AB, Uppsala, Suecia). Por ejemplo, la secuenciación de ADN mediante terminación de cadena didesoxi se puede llevar a cabo usando cebadores sin marcar y terminadores marcados (por ejemplo, fluorescentes o radioactivos). Como alternativa, la secuenciación se puede llevar a cabo usando cebadores marcados y terminadores sin marcar. La secuencia de ácido nucleico del ADN en la muestra se puede comparar con la secuencia de ácido nucleico de ADN de tipo salvaje para identificar si está presente una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 que está correlacionado con la aparición de AMD.

La presencia de una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 que está correlacionado con la aparición de AMD se puede detectar y/o determinar mediante hibridación. Una sonda polinucleotídica se puede hibridar a una variación en la región no codificante del gen de HTRA1, y nucleótidos de flanco, que está correlacionado con AMD, pero no a un gen de HTRA1 de tipo salvaje. La sonda polinucleotídica puede comprender nucleótidos que están marcados fluorescentemente, radiactivamente, o químicamente para facilitar la detección de la hibridación. La hibridación se puede llevar a cabo y detectar mediante métodos estándar conocidos en la técnica, tales como mediante transferencia Northern, transferencia Southern, hibridación in situ fluorescente (FISH), o mediante hibridación a polinucleótidos inmovilizados sobre un soporte sólido, tal como una matriz o micromatriz de ADN. Como se usa aquí, la expresión "matriz de ADN" y "micromatriz" se refiere a una disposición ordenada de elementos de matriz hibridables. Los elementos de matriz están dispuestos de manera que haya preferiblemente al menos uno o más elementos de matriz diferentes inmovilizados sobre una superficie sustrato. La señal de hibridación procedente de cada uno de los elementos de matriz es distinguible de forma individual. En una realización preferida, los elementos de matriz pueden comprender polinucleótidos, aunque la presente invención también se podría usar con ADNc u otros tipos de elementos de matriz de ácido nucleico.

La sonda polinucleotídica se puede usar para hibridar ADN genómico mediante FISH. FISH se puede usar, por ejemplo, en células de la metafase, para detectar una supresión en ADN genómico. El ADN genómico se desnaturaliza para separar las hebras complementarias dentro de la estructura de doble hélice del ADN. La sonda

polinucleotídica se añade entonces al ADN genómico desnaturalizado. Si está presente una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 que está correlacionado con la aparición de AMD, la sonda se hibridará al ADN genómico. La señal de la sonda (por ejemplo, fluorescencia) se puede detectar entonces mediante un microscopio fluorescente en busca de la presencia o ausencia de señal. Por lo tanto, la ausencia de señal indica la ausencia de una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 que está correlacionado con la aparición de AMD. Un ejemplo de tal variación es una base nucleotídica distinta de AG en la posición -512 con relación al sitio de inicio de la transcripción putativo del gen de HTRA1 humano. También se puede aplicar una sonda polinucleotídica marcada a polinucleótidos inmovilizados sobre una matriz de ADN. La hibridación se puede detectar, por ejemplo, midiendo la intensidad de la sonda marcada que queda en la matriz de ADN después del lavado. Los polinucleótidos descritos aquí también se pueden usar en ensayos comerciales, tales como el ensayo de Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA).

La presencia de una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 humano que está correlacionado con la aparición de AMD se puede detectar y/o determinar mediante extensión de cebador con ADN polimerasa. Un cebador polinucleotídico se puede hibridar inmediatamente adyacente a la variación. Para detectar la variación, se puede usar una reacción de secuenciación de una sola base, usando terminadores didesoxinucleotídicos marcados. La presencia de una variación dará como resultado la incorporación del terminador marcado, mientras que la ausencia de una variación no dará como resultado la incorporación del terminador. Un cebador polinucleotídico de la invención se puede hibridar a una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 que está correlacionado con la aparición de AMD. El cebador, o una porción del mismo, no se hibridará a un gen de HTRA1 de tipo salvaje. La presencia de una variación dará como resultado la extensión del cebador, mientras que la ausencia de una variación no dará como resultado la extensión del cebador. Los cebadores y/o nucleótidos pueden incluir además sondas fluorescentes, radioactivas, o químicas. Un cebador marcado mediante extensión del cebador se puede detectar midiendo la intensidad del producto de la extensión, tal como mediante electroforesis en gel, espectrometría de masas, o cualquier otro método para detectar marcadores fluorescentes, radioactivos o químicos.

La presencia de una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 que está correlacionado con la aparición de AMD se puede detectar y/o determinar mediante ligación. Un cebador polinucleotídico de la invención se puede hibridar a una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 humano que está correlacionado con la aparición de AMD, tal como la variación que se identifica como SNP rs 11200638. El cebador, o una porción del mismo, no se hibridará a un gen de HTRA1 de tipo salvaje. También se proporciona un segundo polinucleótido que se hibrida a una región del gen de HTRA1 inmediatamente adyacente al primer cebador. Uno, o ambos, de los cebadores polinucleotídicos se puede marcar fluorescentemente, radiactivamente o químicamente. La ligación de los dos cebadores polinucleotídicos se producirá en presencia de ADN ligasa si está presente una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 que está correlacionado con la aparición de AMD. La ligación se puede detectar mediante electroforesis en gel, espectrometría de masas, o midiendo la intensidad de los marcadores fluorescentes, radioactivos o químicos.

La presencia de una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 humano que está correlacionado con la aparición de AMD se puede detectar y/o determinar mediante extensión de una sola base (SBE). Por ejemplo, se puede usar un cebador marcado fluorescentemente que está acoplado con transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) entre el marcador de la base añadida y el marcador del cebador. Típicamente, el método, tal como el descrito por Chen et al., (PNAS 94:10756-61 (1997), incorporado aquí como referencia) usa un cebador polinucleotídico específico del locus, marcado en el término 5' con 5-carboxifluoresceína (FAM). Este cebador marcado se diseña de manera que el extremo de 3' esté inmediatamente adyacente al sitio polimórfico de interés. El cebador marcado se hibrida al locus, y se lleva a cabo, en forma de secuenciación por terminador fluorescente, con didesoxirribonucleótidos (ddNTPs) marcados fluorescentemente, la extensión de una sola base del cebador marcado, excepto que no están presentes desoxirribonucleótidos. Para inferir la identidad del nucleótido añadido, se usa un incremento en la fluorescencia del ddNTP añadido en respuesta a la excitación a la longitud de onda del cebador marcado.

Los métodos para detectar una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 que está correlacionado con la aparición de AMD pueden incluir la amplificación de una región de ADN que comprende la variación. Se puede usar cualquier método de amplificación. Por ejemplo, una región de ADN que comprende la variación se amplifica usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La PCR se describió inicialmente por Mullis (véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n^{os} 4.683.195, 4.683.202 y 4.965.188, incorporadas aquí como referencia), que describe un método para incrementar la concentración de una región de ADN, en una mezcla de ADN genómico, sin clonación o purificación. También se pueden usar otros métodos de PCR para la amplificación del ácido nucleico, incluyendo, pero sin limitarse a, RT-PCR, PCR cuantitativa, PCR en tiempo real, análisis de ADN polimórfico amplificado rápido, amplificación rápida de extremos de ADNc (RACE), o amplificación de círculo rodante. Por ejemplo, los cebadores polinucleotídicos de la invención se combinan con una mezcla de ADN (o cualquier secuencia polinucleotídica que se puede amplificar con los cebadores polinucleotídicos de la invención), en la que el ADN comprende el gen de HTRA1. La mezcla también incluye los reactivos necesarios para la amplificación (por ejemplo, trifosfatos de desoxirribonucleótidos, tampón, etc.), necesarios para la reacción de ciclación térmica. Según métodos de PCR estándar, la mezcla sufre una serie de etapas de desnaturalización, apareamiento de cebadores, y extensión de polimerasa, para amplificar la región del ADN que comprende la variación en la región no codificante del gen de HTRA1. Un ejemplo para tal variación es la presencia de una base nucleotídica distinta de G en la

posición -512 con respecto al sitio de inicio de la transcripción putativo del gen de HTRA1 humano. La longitud de la región amplificada de ADN se determina mediante las posiciones relativas de los cebadores entre sí, y por lo tanto esta longitud es un parámetro controlable. Por ejemplo, la hibridación de los cebadores se puede producir de tal manera que los extremos de los cebadores próximos a la variación estén separados 1 a 10.000 pares de bases (por ejemplo, 10 pares de bases (pb), 50 pb, 200 pb, 500 pb, 1.000 pb, 2.500 pb, 5.000 pb, o 10.000 pb).

Para la amplificación y detección de ADN amplificado, se usa instrumentación estándar conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se ha desarrollado una amplia variedad de instrumentación para llevar a cabo las amplificaciones de ácidos nucleicos, particularmente PCR; por ejemplo, Johnson et al, patente U.S. nº 5.038.852 (ciclador térmico controlado por ordenador); Wittwer et al, Nucleic Acids Research, 17: 4353-4357 (1989) (PCR de tubo capilar); Hallsby, patente U.S. nº 5.187.084 (control de temperatura a base de aire); Garner et al, Biotechniques, 14: 112-115 (1993) (PCR de alto rendimiento en placas de 864 pocillos); Wilding et al, solicitud internacional nº PCT/US93/04039 (PCR en estructuras micromaquinadas); Schnipelsky et al, solicitud de patente europea nº 90301061.9 (publ. nº 0381501 A2) (dispositivo de PCR desechable, de un solo uso), y similares. Se puede utilizar PCR en tiempo real u otros métodos conocidos en la técnica, tales como el ensayo Taqman.

Un gen de HTRA1 variante que está correlacionado con la aparición de AMD en seres humanos se puede detectar usando análisis de polimorfismos de conformación de cadena sencilla, que identifica diferencias de bases mediante alteración en la migración electroforética de productos de PCR monocatenarios, como se describe en Orita et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 86, 2766-2770 (1989). Los productos de PCR amplificados se pueden generar como se describe anteriormente, y se pueden calentar o desnaturalizar de otro modo, para formar productos de amplificación monocatenarios. Los ácidos nucleicos monocatenarios se pueden volver a plegar o pueden formar estructuras secundarias que dependen parcialmente de la secuencia de las bases. Las movilidades electroforéticas diferentes de los productos de amplificación monocatenarios se pueden relacionar con las diferencias de las secuencias de las bases entre alelos de secuencias diana.

El ADN amplificado se puede analizar en conjunción con uno de los métodos de detección descritos aquí, tales como mediante secuenciación de ADN. El ADN amplificado se puede analizar como alternativa mediante hibridación con una sonda marcada, hibridación a una matriz o micromatriz de ADN, mediante incorporación de cebadores biotinilados seguido de la detección con el conjugado de avidina-enzima, o mediante incorporación de trifosfatos desoxinucleotídicos marcados con ³²P, tales como dCTP o dATP, en el segmento amplificado. En una realización específica, el ADN amplificado se analiza determinando la longitud del ADN amplificado mediante electroforesis o cromatografía. Por ejemplo, el ADN amplificado se analiza mediante electroforesis en gel. Los métodos de electroforesis en gel son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al., John Wiley & Sons: 1992. El ADN amplificado se puede visualizar, por ejemplo, por medios fluorescentes o radioactivos, o con otros colorantes o marcadores que intercalan ADN. El ADN también puede ser transferido a un soporte sólido, tal como una membrana de nitrocelulosa, y se puede someter a transferencia Southern tras electroforesis en gel. El ADN se puede exponer a bromuro de etidio, y se visualiza en luz ultravioleta.

Anticuerpos

Usando inmunógenos derivados del péptido de HTRA1, se pueden obtener antisueros anti-proteína/anti-péptido o anticuerpos monoclonales mediante protocolos estándar (véase, por ejemplo, Antibodies: A Laboratory Manual ed. de Harlow y Lane (Cold Spring Harbor Press: 1988)). Un mamífero, tal como un ratón, un hámster o un conejo, se puede inmunizar con una forma inmunógena de un péptido de HTRA1, un fragmento antigénico que es capaz de provocar una respuesta de anticuerpo, o una proteína de fusión. El ratón inoculado puede no expresar HTRA1 endógeno, facilitando así el aislamiento de anticuerpos que de otro modo serían eliminados como anti-anticuerpos propios. Las técnicas para conferir inmunogenicidad en una proteína o péptido incluyen la conjugación a soportes, u otras técnicas bien conocidas en la técnica. Una porción inmunógena de un péptido de HTRA1 se puede administrar en presencia de adyuvante. El progreso de la inmunización se puede monitorizar mediante detección de títulos de anticuerpo en plasma o suero. Para evaluar los niveles de anticuerpos, se pueden usar ELISA estándar u otros inmunoensayos, con el inmunógeno como antígeno.

Tras la inmunización de un animal con una preparación antigénica de un polipéptido de HTRA1, se pueden obtener antisueros y, si se desea, se pueden aislar anticuerpos policlonales a partir del suero. Para producir anticuerpos monoclonales, se pueden cosechar células productoras de anticuerpos (linfocitos) a partir de un animal inmunizado, y se pueden fusionar mediante procedimientos de fusión de células somáticas estándar con células inmortalizantes tales como células de mieloma, para producir células de hibridoma. Tales técnicas son bien conocidas en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la técnica de hibridoma (desarrollada originalmente por Kohler y Milstein, (1975) Nature, 256: 495-497), la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbar et al., (1983) Immunology Today, 4: 72), y la técnica de hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al., (1985) Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. p. 77-96). Las células de hibridoma se pueden identificar inmunoquímicamente para determinar la producción de anticuerpos específicamente reactivos con un polipéptido de HTRA1 y anticuerpos monoclonales aislados de un cultivo que comprende tales células de hibridoma.

El término "anticuerpo", como se usa aquí, pretende incluir fragmentos del mismo que también son específicamente reactivos con un polipéptido de HTRA1. Los anticuerpos se pueden fragmentar usando técnicas convencionales, y

los fragmentos se pueden identificar en busca de utilidad de la misma manera como se describe anteriormente para anticuerpos completos. Por ejemplo, los fragmentos F(ab)₂ se pueden generar tratando un anticuerpo con pepsina. El fragmento F(ab)₂ resultante se puede tratar para reducir los puentes de disulfuro para producir fragmentos Fab. Los anticuerpos descritos aquí incluyen moléculas biespecíficas, monocatenarias, y quiméricas y humanizadas que tienen afinidad por un polipéptido de HTRA1 conferida por al menos una región CDR del anticuerpo. El anticuerpo puede comprender además un marcador unido a él, y capaz de ser detectado (por ejemplo, el marcador puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima o un cofactor enzimático).

Un anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, y se describen aquí métodos para generar nuevos anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos de HTRA1. Por ejemplo, un método para generar un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a un polipéptido de HTRA1 puede comprender administrar a un ratón una cantidad de una composición inmunógena que comprende el polipéptido de HTRA1 para estimular una respuesta inmunitaria detectable, obtener células productoras de anticuerpo (por ejemplo, células del bazo) a partir del ratón, y fusionar las células productoras de anticuerpo con células de mieloma para obtener hibridomas productores de anticuerpo, y ensayar los hibridomas productores de anticuerpo para identificar un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal que se une específicamente al polipéptido de HTRA1. Una vez obtenido, un hibridoma se puede propagar en un cultivo celular, opcionalmente en condiciones de cultivo en las que las células derivadas del hibridoma producen el anticuerpo monoclonal que se une específicamente al polipéptido de HTRA1. El anticuerpo monoclonal se puede purificar del cultivo celular.

Los anticuerpos reactivos a HTRA1 están comercialmente disponibles (por ejemplo, de Imgenex) y también se describen, por ejemplo, en la solicitud PCT nº WO 00/08134.

La expresión “específicamente reactivo con”, como se usa en referencia a un anticuerpo, pretende decir, como se entiende generalmente en la técnica, que el anticuerpo es suficientemente selectivo entre el antígeno de interés (por ejemplo, un polipéptido de HTRA1) y otros antígenos que no son de interés, y que el anticuerpo es útil para, como mínimo, detectar la presencia del antígeno de interés en un tipo particular de muestra biológica. En ciertos métodos que emplean el anticuerpo, tales como aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable un mayor grado de especificidad en la unión. Los anticuerpos monoclonales tienen generalmente una mayor tendencia (en comparación con anticuerpos policlonales) a discriminar efectivamente entre los antígenos deseados y los polipéptidos que reaccionan de forma cruzada. Una característica que influye en la especificidad de una interacción anticuerpo-antígeno es la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Aunque la especificidad deseada se puede alcanzar con un intervalo de diferentes afinidades, los anticuerpos generalmente preferidos tendrán una afinidad (una constante de disociación) de alrededor de 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} o menos.

Además, las técnicas usadas para identificar anticuerpos a fin de identificar un anticuerpo deseable pueden influir en las propiedades del anticuerpo obtenido. Por ejemplo, si un anticuerpo se va a usar para la unión a un antígeno en disolución, puede ser deseable ensayar la unión en disolución. Existe una variedad de diferentes técnicas para ensayar la interacción entre anticuerpos y antígenos para identificar anticuerpos particularmente deseables. Tales técnicas incluyen los ensayos ELISA, los ensayos de unión mediante resonancia de plasmones de superficie (por ejemplo, el ensayo de unión de Biacore, Bia-core AB, Uppsala, Suecia), ensayos de sándwich (por ejemplo, el sistema de perlas paramagnéticas de IGEN International, Inc., Gaithersburg, Maryland), transferencias Western, ensayos de inmunoprecipitación, e inmunohistoquímica.

6. Composiciones farmacéuticas

Los métodos y composiciones descritos aquí para tratar a un sujeto que padece AMD se pueden usar para el tratamiento profiláctico de individuos que han sido diagnosticados o pronosticados con riesgo de desarrollar AMD. En este caso, la composición se administra en una cantidad y dosis que es suficiente para retrasar, ralentizar o prevenir el comienzo de AMD o síntomas relacionados. Como alternativa, los métodos y composiciones descritos aquí se pueden usar para el tratamiento terapéutico de individuos que padecen AMD. En este caso, la composición se administra en una cantidad y dosis que es suficiente para retrasar o ralentizar la progresión de la afección, total o parcialmente, o en una cantidad y dosis que es suficiente para invertir la afección hasta el punto de eliminar el trastorno. Se entiende que una cantidad efectiva de una composición para tratar un sujeto que ha sido diagnosticado o pronosticado con riesgo de desarrollar AMD es una dosis o cantidad que está en cantidades suficientes para tratar a un sujeto o para tratar el propio trastorno.

Las composiciones se pueden formular con un vehículo farmacéuticamente aceptable, o para la administración en una forma conveniente para uso en medicina humana.

Los métodos terapéuticos pueden incluir administrar la composición tópicamente, sistémicamente, o localmente. La composición se puede administrar localmente en el ojo que está afectado o en riesgo de estar afectado por AMD. Por ejemplo, las composiciones terapéuticas de la invención se pueden formular para la administración, por ejemplo, mediante inyección (por ejemplo, intravenosamente, subcutáneamente, o intramuscularmente), inhalación o insuflamiento (ya sea a través de la boca o de la nariz), o mediante administración oral, bucal, sublingual, transdérmica, nasal, o parenteral. En otra realización específica, la administración local se puede restringir además al área en el ojo que esté afectada por AMD, tal como el epitelio pigmentario de la retina (RPE) y la membrana de

Bruch, por ejemplo la inyección dirigida de la composición terapéutica. Las composiciones descritas aquí se pueden formular como parte de un implante o dispositivo. Cuando se administra, la composición terapéutica para uso en esta invención está en forma fisiológicamente aceptable, libre de pirógenos. Además, la composición se puede encapsular o inyectar en una forma viscosa para el suministro al sitio en el que están presentes las células diana, tales como a las células del ojo. En Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, PA., se pueden encontrar generalmente técnicas y formulaciones. Además de los polipéptidos de SRF, AP2 alfa, o HTRA1, o una molécula de ácido nucleico que codifican un polipéptido de SRF, AP2 alfa, o HTRA1, o su variante, los agentes terapéuticamente útiles pueden estar incluidos opcionalmente en cualquiera de las composiciones como se describen anteriormente. Además, los agentes terapéuticamente útiles se pueden administrar, alternativa o adicionalmente, de forma simultánea o secuencial con polipéptidos de SRF, AP2 alfa, o HTRA1 o una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de SRF, AP2 alfa, o HTRA1, o su variante, según los métodos de la invención. Además, se contemplan combinaciones que incluyen un polipéptido de CFH o una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de CFH, o su variante.

Las composiciones de la invención se pueden administrar oralmente, por ejemplo en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, tabletas (usando una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábica o tragacanto), polvos, gránulos, o como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica) y/o como colutorios y similares, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de un agente como ingrediente activo. Un agente también se puede administrar como un bolo, electuario o pasta.

En formas de dosificación sólidas para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos, y similares), uno o más compuestos terapéuticos se pueden mezclar con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato dicálcico, y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o extendedores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa, y/o goma arábica; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o de tapioca, ácido algínico, ciertos silicatos, y carbonato de sodio; (5) agentes que retardan la disolución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla bentonítica; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio, y sus mezclas; y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes. También se pueden emplear como cargas composiciones sólidas de un tipo similar en cápsulas de gelatina rellenas duras y blandas, usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de peso molecular elevado, y similares.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes, y elixires, farmacéuticamente aceptables. Además del ingrediente activo, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes usados habitualmente en la técnica, tales como agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, de cacahuate, de maíz, de germen, de oliva, de ricino, y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofúrico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos con sorbitán, y sus mezclas. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol, y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y sus mezclas.

Algunas composiciones descritas aquí se pueden administrar tópicamente, ya sea a la piel o a las membranas mucosas. Las formulaciones tópicas pueden incluir además uno o más de la amplia variedad de agentes que se sabe que son efectivos como potenciadores de la penetración de la piel o del estrato córneo. Los ejemplos de estos son 2-pirrolidona, N-metil-2-pirrolidona, dimetilacetamida, dimetilformamida, propilenglicol, alcohol metílico o isopropílico, dimetilsulfóxido, y azona. Además, se pueden incluir agentes adicionales para hacer a la formulación cosméticamente aceptable. Los ejemplos de estos son grasas, ceras, aceites, colorantes, fragancias, conservantes, estabilizantes, y agentes tensioactivos. También se pueden incluir agentes queratolíticos, tales como los conocidos en la técnica. Los ejemplos son ácido salicílico y azufre.

Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica incluyen polvos, pulverizaciones, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, disoluciones, parches, e inhalantes. El compuesto activo se puede mezclar en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualesquiera conservantes, tampones, o propelentes que se puedan necesitar. Los ungüentos, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un compuesto de la invención en cuestión (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico aislada o producida

recombinantemente que codifica un polipéptido de SRF, AP2 alfa, o HTRA1, o un polipéptido de SRF, AP2 alfa, o HTRA1 aislado o producido recombinantemente, o su variante, tal como una variante negativa dominante), excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o sus mezclas.

5 Los polvos y pulverizaciones pueden contener, además de un compuesto en cuestión, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio, y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Las pulverizaciones pueden contener adicionalmente propelentes habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos no sustituidos volátiles, tales como butano y propano.

10 Se entiende que el régimen de dosificación estará determinado para un individuo, teniendo en cuenta, por ejemplo, diversos factores que modifican la acción de los compuestos de la invención en cuestión (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico aislada o producida recombinantemente que codifica un polipéptido de SRF, AP2 alfa, o HTRA1 o un polipéptido de SRF, AP2 alfa, o HTRA1 aislado o producido recombinantemente, o su variante, tal como una variante negativa dominante), la gravedad o estadio de AMD, la vía de administración, y las características únicas para el individuo, tales como la edad, el peso y el tamaño. Una persona de pericia normal en la técnica es capaz de
15 determinar la dosis requerida para tratar al sujeto. En una realización, la dosis puede oscilar desde alrededor de 1,0 ng/kg hasta alrededor de 100 mg/kg de peso corporal del sujeto. Basándose en la composición, la dosis se puede suministrar de forma continua, o a intervalos periódicos. Por ejemplo, en una o más ocasiones separadas. Los intervalos de tiempo deseados de las múltiples dosis de una composición particular se pueden determinar sin experimentación excesiva por un experto en la técnica. Por ejemplo, el compuesto se puede suministrar de forma
20 horaria, diaria, semanal, mensual, anual (por ejemplo, en una forma de liberación en el tiempo), o como un suministro de una sola vez.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden comprender un polipéptido de SRF, AP2 alfa, o HTRA1 o una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido de SRF, AP2 alfa, o HTRA1, o su variante, tal como una variante negativa dominante, en combinación con una o
25 más disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas, isotónicas, estériles, farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que se pueden reconstituir en disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes del uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos, solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor al que va destinada, o agentes de suspensión o espesantes. Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden emplear en
30 las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño requerido de partículas en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

35 Las composiciones de la invención también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos se puede asegurar mediante la inclusión de diversos agentes bactericidas y antifúngicos, por ejemplo parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares, en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede producir mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como
40 monoestearato de aluminio y gelatina.

Una persona de pericia normal en la técnica es capaz de determinar la cantidad requerida para tratar al sujeto. Se entiende que el régimen de dosificación estará determinado para un individuo, teniendo en cuenta, por ejemplo, diversos factores que modifican la acción de los compuestos de la invención en cuestión, la gravedad o estadio de
45 AMD, la vía de administración, y las características únicas para el individuo, tales como edad, peso, y tamaño. Una persona de pericia normal en la técnica es capaz de determinar la dosis requerida para tratar al sujeto. En una realización, la dosis puede oscilar desde alrededor de 1,0 ng/kg hasta alrededor de 100 mg/kg de peso corporal del sujeto. La dosis se puede suministrar de forma continua, o a intervalos periódicos. Por ejemplo, en una o más ocasiones separadas. Los intervalos de tiempo deseados de múltiples dosis de una composición particular se
50 pueden determinar sin experimentación excesiva por un experto en la técnica. Por ejemplo, el compuesto se puede suministrar de forma horaria, diaria, semanal, mensual, anual (por ejemplo, en una forma de liberación en el tiempo), o como un suministro de una sola vez. Como se usa aquí, el término "objeto" significa cualquier animal individual capaz de estar afligido con AMD. Los sujetos incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, primates, caballos, pájaros, vacas, cerdos, perros, gatos, ratones, ratas, cobayas, hurones, y conejos. En la realización preferida el
55 sujeto es un ser humano.

Las muestras usadas en los métodos descritos aquí pueden comprender células del ojo, oído, nariz, dientes, lengua, epidermis, epitelio, sangre, lágrimas, saliva, moco, aparato urinario, orina, músculo, cartílago, piel, o cualquier otro tejido o fluido corporal del que se pueda obtener suficiente ADN o ARN.

60 La muestra se debería procesar suficientemente para hacer que el ADN o ARN, que está presente, esté disponible para el ensayo en los métodos descritos aquí. Por ejemplo, las muestras se pueden procesar de tal forma que el

ADN de la muestra esté disponible para amplificación o para hibridación a otro polinucleótido. Las muestras procesadas pueden ser lisados brutos en los que el ADN o ARN disponible no está purificado de otro material celular. Como alternativa, las muestras se pueden procesar para aislar el ADN o ARN disponible de uno o más contaminantes que están presentes en su fuente natural. Las muestras se pueden procesar por cualquier medio conocido en la técnica que haga al ADN o ARN disponible para el ensayo en los métodos descritos aquí. Los métodos para procesar muestras incluyen, pero no se limitan a, medios mecánicos, químicos o moleculares de lisado y/o purificación de células y lisados celulares. Los métodos de procesamiento pueden incluir, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis, y purificación mediante inmovinoafinidad con anticuerpos específicos para epítomos particulares del polipéptido.

8. Kits

También se proporcionan aquí kits, por ejemplo kits para fines terapéuticos o kits para detectar un gen de HTRA1 variante en una muestra procedente de un individuo. En una realización, un kit comprende al menos un medio recipiente que tiene en él una dosis previamente medida de una sonda polinucleotídica que se hibrida, en condiciones restrictivas, a una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 que está correlacionado con la aparición de AMD en seres humanos. En otra realización, un kit comprende al menos un medio recipiente que tiene en él una dosis previamente medida de un cebador polinucleotídico que se hibrida, en condiciones restrictivas, adyacente a un lado de una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 que está correlacionado con la aparición de AMD en seres humanos. En una realización adicional, se proporciona en una dosis previamente medida un segundo cebador polinucleotídico que se hibrida, en condiciones restrictivas, al otro lado de una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 que está correlacionado con la aparición de AMD en seres humanos. Los kits comprenden además una etiqueta y/o instrucciones para el uso del kit terapéutico o de diagnóstico en la detección de HTRA1 en una muestra. Los kits también pueden incluir material de embalaje tal como, pero sin limitarse a, hielo, hielo seco, Styrofoam, espuma, plástico, celofán, envoltura contraíble, envoltura de burbujas, papel, cartón, bolitas de almidón, lazos para atar, clips metálicos, botes metálicos, Drierite, vidrio y caucho (véanse los productos disponibles de www.papermart.com para ejemplos de material de embalaje). En todavía otra realización, el cebador polinucleotídico que se hibrida, en condiciones restrictivas, a una variación en la región no codificante del gen de HTRA1 que está correlacionado con la aparición de AMD en seres humanos se combina con un segundo cebador polinucleotídico que se hibrida, en condiciones restrictivas, a una variación en el gen de CFH que está correlacionado con la aparición de AMD en seres humanos.

La práctica de los presentes métodos empleará, excepto que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología celular, cultivo celular, biología molecular, biología transgénica, microbiología, ADN recombinante, e inmunología, que están dentro de la pericia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (2001); *DNA Cloning*, Volúmenes I y II (D. N. Glover ed., 1985); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait ed., 1984); Mullis et al. patente U.S. n° 4.683.195; *Nucleic Acid Hybridization* (B. D. Hames y S. J. Higgins eds. 1984); *Transcription And Translation* (B. D. Hames y S. J. Higgins eds. 1984); *Culture Of Animal Cells* (R. I. Freshney, Alan R Liss, Inc., 1987); *Immobilized Cells And Enzymes* (IRL Press, 1986); B. Perbal, *A Practical Guide To Molecular Cloning* (1984); el tratado *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc., N.Y.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller y M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); *Methods In Enzymology*, Vols. 154 y 155 (Wu et al. eds.), *Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology* (Mayer y Walker, eds., Academic Press, Londres, 1987); *Handbook Of Experimental Immunology*, Volúmenes I-IV (D. M. Weir y C. C. Blackwell, eds., 1986); *Manipulating the Mouse Embryo*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986).

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos son con fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes de ningún modo.

Los siguientes Métodos y Materiales se usaron en el trabajo descrito aquí, particularmente en los Ejemplos 1 y 2.

Participantes del estudio

En este estudio se usaron participantes tanto previamente reclutados (L. Baum et al, *Ophthalmologica* 217, 111 (2003), C. P. Pang et al., *Ophthalmologica* 214, 289 (2000)) como nuevamente reclutados. Todo reclutamiento se llevó a cabo según los criterios descritos en (C. P. Pang et al., *Ophthalmologica* 214, 289 (2000)). De forma breve, todos los participantes recibieron un protocolo de examen estándar y una medida de la agudeza visual. Se llevó a cabo una biomicroscopía con lámpara de hendidura de los fondos de ojos mediante un oftalmólogo experto, y un fotógrafo oftálmico entrenado hizo fotografías del fondo a color estereoscópicas. Se llevó a cabo una graduación usando la clasificación estándar sugerida por el Internacional Agerelated Maculopathy Epidemiological Study Group. Los controles no mostraron signos de AMD o ninguna otra enfermedad ocular importante, excepto catarata senil. Durante el cuestionario de anamnesis, a los participantes se les preguntó sobre su hábito de fumar, y esa información se anotó. Un fumador se definió como una persona que fumó al menos 5 cigarrillos diariamente durante más de un año. Los fumadores se subdividieron en tres grupos: aquellos que nunca fumaron, aquellos que fueron fumadores, y aquellos que fueron fumadores en ese momento.

De los 117 casos disponibles para los Solicitantes, los Solicitantes excluyeron cualquiera clasificado como AMD etapa 3 ó 4 (n=18), para seleccionar solamente los casos "húmedos" de AMD. Para emparejar mucho mejor la distribución de edades entre los casos y los controles, los Solicitantes excluyeron los casos con >90 años de edad (n=2). Debido a que la población de control original (n=153) fue significativamente más joven que la de los casos, el Solicitante excluyó los casos con <65 años de edad (n=22). En la Tabla 1 se dan las características del grupo final de 96 casos y 130 controles.

Tabla 1. Características de casos y controles en la cohorte de Hong Kong.

	Casos (AMD Grado 5)	Controles
Total	96	130
Emparejamientos (%)	68	33
Edad media ($\pm$ s.d.) (años)	74,9 $\pm$ 6,8	74,2 $\pm$ 5,7
Intervalo de edad (años)	60-89	65-99
Fumadores (%)	63	26

Genotipado

Se genotipó cada individuo usando el conjunto de micromatrices Affymetrix GeneChip Mapping 100K. El ensayo de genotipado de SNP consistió en dos chips (XbaI y HindIII) con 58.960 y 57.244 SNPs, respectivamente. Aproximadamente se procesaron 250 ng de ADN genómico para cada chip según el protocolo de Affymetrix (H. Matsuzaki et al., Nat Methods 1, 109 (2004)).

Se consideraron solamente aquellos chips individuales que lograron una proporción de genotipos correctamente identificados de >90% para ser usables para el análisis. Se genotiparon 268 individuos para HindIII, y 266 para HindIII y XbaI.

La calidad de los datos de SNP autosómicos individuales se evaluó examinando las proporciones de genotipos correctamente identificados. SNPs con proporciones de genotipos correctamente identificados <85% se eliminaron del análisis. Para eliminar adicionalmente SNPs con posibles errores de genotipado, se excluyeron SNPs heterocigotos sin ningún heterocigoto observado, y los SNPs con solamente heterocigotos. Para eliminar SNPs no informativos, se excluyeron SNPs no heterocigotos. Finalmente, se evaluaron las desviaciones del equilibrio de Hardy Weinberg (HWE), y se excluyeron los SNPs con un $HWE \chi^2 > 50$. Mediante estas exclusiones, en gran medida debido a proporciones bajas de genotipos correctamente identificados de <85%, quedaron 97.824 SNPs autosómicos para el análisis. Estos datos se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Calidad de los datos de genotipado

<i>Número de Individuos</i>	
Hind	268
Xba	267*
Calidad de los datos por chip	
Proporción mediana de genotipos correctamente identificados por chip (Hind)	99,41%
Proporción mediana de genotipos correctamente identificados por chip (Xba)	99,33%
Proporción mínima de genotipos correctamente identificados por chip (Hind)	94,33%
Proporción mínima de genotipos correctamente identificados por chip (Xba)	76,72%*
Calidad de los datos por individuo	
Número medio de emparejamientos para SNPs comunes entre dos chips [#]	30,7
Número mínimo de emparejamientos para SNPs comunes entre dos chips [#]	26
Número total de SNPs	116204
Número de SNPs autosómicos	113841

Proporción de genotipos correctamente identificados (por SNP)	
SNPs con proporción de genotipos correctamente identificados del 100%	71156
SNPs con proporción de genotipos correctamente identificados entre 85% y 100%	41934
SNPs con proporción de genotipos correctamente identificados menores que 85%	751
SNPs con proporción de genotipos correctamente identificados por encima de 85% (Hind; proporción de genotipos no identificados correctamente de 40 o menos)	113090
Polimorfismo del locus (para SNPs autosómicos con proporción de genotipos correctamente identificados > 85%)	
Número de SNPs sin polimorfismo observado	14867
Número de SNPs solamente con heterocigotos observados	17
Número de SNPs polimórficos sin heterocigotos observados	36
Número de SNPs con frecuencia alélica menor < 0,01	6008
Equilibrio de Hardy-Weinberg (para SNPs polimórficos independientemente de MAF)	
Número de SNPs con HWE $\chi^2 > 50$	346
Número final de SNPs	97824
*Después de que se eliminó el chip de Xbal con la baja proporción de genotipos correctamente identificados, se genotiparon 266 muestras en el chip Xbal, y la proporción mínima de genotipos correctamente identificados fue 95,85%.	
#De los 31 SNPs que son comunes entre los dos chips.	

Análisis estadístico

- El análisis inicial se llevó a cabo construyendo tablas de 2 x 2 de los recuentos alélicos y tablas de 2 x 3 de los recuentos genotípicos para cada SNP en todos los casos y controles. Subsiguientemente, se calcularon las estadísticas χ^2 de Pearson, y se computaron los valores de P comparando la estadística χ^2 con una distribución χ^2 con 1 ó 2 df para los ensayos alélico y genotípico, respectivamente. Los SNPs que producen un valor de P menor que $5,1 \times 10^{-7}$ (significancia de 0,05 [0,05/97.824] ajustada a Bonferroni se seleccionaron para el análisis posterior.
- Se usaron dos métodos diferentes, control genómico (GC) y la prueba F de control genómico (GCF), H. Okamoto et al., Mol Vis 12, 156 (2006), para ensayar la presencia de la mezcla en la muestra. El primer método, GC, usa la mediana de los valores χ^2 para un número de SNPs no asociados (SNPs nulos) en el estudio. Con el fin de ensayar el control genómico, se consideraron todos los SNPs no significativos como SNPs nulos. Después, el valor χ^2 se dividió entre la membrana y se comparó con una distribución χ^2 para ensayar la significancia. El segundo método, GCF, usa la media de los valores χ^2 nulos en lugar de la mediana. Los valores χ^2 individuales se dividieron nuevamente entre la media, y la estadística resultante se comparó con una distribución F con 1, L grados de libertad, en la que L es el número de SNPs nulos usados para computar la media.
- Usando fórmulas estándar, P. Armitage, G. Berry, Statistical Methods in Medical Research (Balckwell Scientific Publications, 1971) se calcularon las relaciones de momios, los riesgos atribuibles a la población, y sus intervalos de confianza respectivos. Debido a la frecuencia relativamente elevada del alelo de riesgo en rs 10490924 en el caso/muestra de control (55%), el riesgo atribuible correspondiente se sobreestimaré, y así no proporciona una buena estimación del riesgo en la población.
- Para identificar la región de interés alrededor de rs10490924, se examinó la región unida mediante SNPs por pares en la que se observaron los cuatro gametos, R. R. Hudson, N. L. Kaplan, Genetics 111, 147 (1985), denominada subsiguientemente como la "región de 4 gametos". Se examinó el patrón de desequilibrio de ligación (LD) construyendo haplotipos para los siete SNPs internos en la región de 4 gametos usando los algoritmos de SNPHAP de D. Clayton. <http://www-gene.cimr.cam.ac.uk/clayton/software> y el PHASE de M. Stephens, N. J. Smith, P. Donnelly, Am JHum Genet 68, 978 (2001). Ambos algoritmos produjeron los mismos haplotipos en frecuencias similares. Una vez se reconstruyeron los haplotipos, se calculó D', una medida estándar de LD, usando el programa Haploxt de G. R. Abecasis, W. O. Cookson, Bioinformatics 16, 182 (2000). Entonces se visualizaron los patrones de LD para el caso/muestra de control combinada, usando GOLD (R. Klein et al, Ophthalmology 113, 373 (2006)). En la

Tabla 3 se dan las frecuencias haplotípicas estimadas para los grupos del caso y los grupos de control combinados, y para cada grupo separado.

Tabla 3. Análisis haplotípico de siete SNPs: rs2421019, rs2292623, rs2292625, rs10510110, rs2280141, rs2736911, rs10490924 en la región de 4 gametos. Las estimaciones de la frecuencia haplotípica se determinan mediante PHASE para toda la población "total" y para las poblaciones de los casos y de los controles de forma separada.

	T/C	A/G	A/G	T/C	T/G	T/C	T/G	Todos	Caso	Control
N1	2	1	2	2	2	2	1	0,45743	0,61100	0,34024
N2	2	1	2	2	2	2	2	0,17255	0,09849	0,22908
N3	2	2	2	1	1	1	2	0,14944	0,12047	0,17154
N4	1	1	2	1	1	2	2	0,07105	0,03783	0,09640
N5	1	1	2	1	1	2	1	0,05739	0,05845	0,05659
N6	1	1	1	1	1	2	2	0,03777	0,03009	0,04363
N7	2	2	2	1	1	2	1	0,02841	0,02597	0,03026
N8	2	2	2	1	1	2	2	0,01989	0,01302	0,02514
N9	2	1	2	2	2	1	2	0,00364	0,00021	0,00626
N10	2	2	2	2	2	2	1	0,00188	0,00431	0,00003
N11	1	1	2	1	1	1	2	0,00041	0,00004	0,00068
N12	1	1	1	1	1	2	1	0,00006	0,00006	0,00006
N13	2	1	1	2	2	2	2	0,00002	0,00001	0,00003

El par haplotípico más probable para cada individuo se obtuvo a partir de PHASE, y después se usó para determinar los recuentos haplotípicos dados en la Tabla 4.

Tabla 4. Recuentos haplotípicos (y frecuencia) para los casos y los controles determinados mediante PHASE usando el par haplotípico más probable como la asignación haplotípica para un individuo.

Haplotipo	Caso	Control
N1	132 (0,634)	87 (0,335)
N2	17 (0,082)	62 (0,239)
N3	24 (0,115)	45 (0,173)
N4	9 (0,043)	29 (0,112)
N6	6 (0,029)	11 (0,042)
N5	13 (0,063)	10 (0,038)
N7	5 (0,024)	10 (0,038)
N8	1 (0,005)	4 (0,015)
N11	0	1 (0,004)
N9	0	1 (0,004)
N10	1 (0,005)	0

Estos recuentos haplotípicos se usaron para crear la tabla de contingencia y para estimar el tamaño de efecto del haplotipo de riesgo dado en la Tabla 5.

Tabla 5. Tabla de contingencia y tamaño de efecto del haplotipo de riesgo. Para OR y PAR, sólo se considera el caso recesivo autosómico, en el que los casos y los controles con dos copias del haplotipo N1 se comparan con aquellos con cero copias.

	Copias de haplotipo de riesgo (N1)			OR (95%CI)	PAR (95%CI)
	2	1	0		
Caso	46(0,44)	40 (0,39)	18 (0,17)	10,40 (4,68-23,14)	0,81 (0,62-0,91)
Control	14(0,11)	59 (0,45)	57 (0,44)		

- 5 Para investigar el patrón de LD en esta región, se usó la base de datos HapMap públicamente disponible, que contiene información de 45 individuos chinos Han no relacionados procedentes de Pequín (CHB). Los genotipos para 183 SNPs unidos por la región de 4 gametos se extrajeron de la base de datos HapMap. Los genotipos se cargaron en Haploview (J. C. Barrett, B. Fry, J. Maller, M. J. Daly, Bioinformatics 21, 263 (2005)) para calcular la estadística de LD. No todos los 183 de los SNPs de HapMap en esta región se genotiparon o pasaron las comprobaciones de control de calidad por defecto (valor *P* de Hardy-Weinberg > 0,01, porcentaje mínimo de muestras genotipadas > 75%, máximo de una inconsistencia mendeliana y una frecuencia alélica mínima de 0,001). Los bloques haplotípicos se identificaron usando los parámetros expuestos por Gabriel et al. (S. B. Gabriel et al., Science 296, 2225 (2002)), es decir, para determinar los bloques se usaron intervalos de confianza de 95% alrededor de *D'*.
- 10
- 15 Entre los sitios de recombinación putativos revelados por el ensayo de cuatro gametos para rodear el SNP marcador rs10490924 (R. J. Klein et al., Science 308, 385 (2005)), se identificaron cinco haplotipos principales, N1-N5, inferidos de nueve SNPs (que se extienden 63,9 kb), que dan cuenta del >90% de todos los haplotipos en la muestra. La relación de momios (OR) para dos copias del haplotipo de riesgo, N1, es 10,40, y su intervalo de confianza (CI) del 95% solapa con el del SNP individual rs10490924, 4,68-23,14 frente a 4,83-25,69 (Tabla 5). LD se midió y representó gráficamente para cada par de los nueve SNPs. El SNP rs10490924 parece estar en LD con los SNPs en dirección 5' en *PLEKHA1*, pero el siguiente SNP genotipado está demasiado lejos en dirección (26,3 kb) para proporcionar una información significativa sobre los puntos de ruptura de recombinación/homoplasia. Los conjuntos mucho más densos de SNPs de la base de datos HapMap públicamente disponible para la población china Han en Pequín (CHB), proporcionados por los datos HapMap internacionales (D. Altshuler et al., Nature 437, 1299 (2005)), no resolvieron esta materia, mostrando que rs10490924 no estaba en LD con ningún gen en la región en esta población, y no permitió descubrir la variante que provoca la enfermedad.
- 20
- 25

Identificación de un nuevo SNP

- Se resecuenciaron los exones de los dos genes que flanquean rs10490924, *PLEKHA1* y *HTRA1*, así como una porción de la secuencia en dirección 5' para capturar cualesquiera variantes promotoras potenciales. Se secuenciaron muestras de ADN procedentes de casos homocigotos para el alelo de riesgo de rs10490924 (TT) y de controles homocigotos para el alelo no de riesgo (GG). Inmediatamente estuvieron disponibles ochenta y ocho muestras, 50 casos y 38 controles, para la secuenciación. Todas las etapas de secuenciación (diseño de cebadores, amplificación mediante PCR, secuenciación bidireccional, y análisis de mutación) se llevaron a cabo mediante Genaissance Pharmaceuticals (New Haven, CT).
- 30
- 35 Se identificaron 43 polimorfismos en los 22 fragmentos, que se secuenciaron en esta región, Tabla 6.

Tabla 6. Polimorfismos identificados a través de la resecuenciación de los genes *PLEKHA1* y *HTRA1*. La AccPos para cada polimorfismo se refiere a la posición en el acceso de GenBank GPI_36186.1 para *PLEKHA1* y BX842242.1 para *HTRA1*.

Gen	Región	Nº de rs	AccPos	Sec. Frag. 4850223	Cambio	Cambio de AA	Tipo
<i>PLEKHA1</i>	intrón 2		26919		G/A		No codificante
<i>PLEKHA1</i>	intrón 2		27167	4850223	T/C		No codificante
<i>PLEKHA1</i>	intrón 3	rs9988734	29617	4850224	A/G		No codificante
<i>PLEKHA1</i>	intrón 5		35992	18578027	-T/()		No codificante
<i>PLEKHA1</i>	intrón 6	rs3215235	45061	4850226	TCTAA/-		No codificante

ES 2 391 788 T3

Gen	Región	Nº de rs	AccPos	Sec. Frag. 4850223	Cambio	Cambio de AA	Tipo
<i>PLEKHA1</i>	intrón 8		53481	18579169	T/G		No codificante
<i>PLEKHA1</i>	intrón 9		53755	18579169	T/C		No codificante
<i>PLEKHA1</i>	intrón 9	rs11200624	53830	18579169	A/G		No codificante
<i>PLEKHA1</i>	exón 10		54250	4850228	A/T	Tyr 268 Phe	No sinónimo
<i>PLEKHA1</i>	intrón 10	rs9783213	54349	4850228	G/A		No codificante
<i>PLEKHA1</i>	intrón 10	rs2292625	56149	4850229	G/A		No codificante
<i>PLEKHA1</i>	intrón 11		56407	4850229	C/T		No codificante
<i>PLEKHA1</i>	intrón 11	rs2292626	56496	4850229	C/T		No codificante
<i>PLEKHA1</i>	intrón 11		58895	4873333	G/A		No codificante
<i>PLEKHA1</i>	exón 12	rs1045216	58979	4873333	G/A	Ala 320 Thr	No sinónimo
<i>PLEKHA1</i>	exón 12		59444	4873335	A/G/T		sinónimo
<i>HTRA1</i>	promotor		58157	710594798	G/T		No codificante
<i>HTRA1</i>	promotor	rs11200638	58120	710594798	A/G		No codificante
<i>HTRA1</i>	promotor		57997	710594798	C/T		No codificante
<i>HTRA1</i>	promotor		57992	710594798	C/T		No codificante
<i>HTRA1</i>	promotor	rs2672598	57982	710594798	T/C		No codificante
<i>HTRA1</i>	intrón 1		57018	710648330	C/A		No codificante
<i>HTRA1</i>	intrón 1		56970	710648330	C/T		No codificante
<i>HTRA1</i>	intrón 2		30047	27864	C/T		No codificante
<i>HTRA1</i>	intrón 2		29931	27864	A/G		No codificante
<i>HTRA1</i>	intrón 3	rs2239586	29429	27866	C/T		No codificante
<i>HTRA1</i>	intrón 3	rs2239587	29355	27868	G/A		No codificante
<i>HTRA1</i>	exón 4		12401	27868	C/T		No sinónimo
<i>HTRA1</i>	intrón 4	rs2672582	12164	27870	C/T		No codificante
<i>HTRA1</i>	intrón 5		11659	27870	GTTT/-		No codificante
<i>HTRA1</i>	intrón 5	rs2672583	11578	27870	C/T		No codificante
<i>HTRA1</i>	intrón 5		11577	27871	A/G		No codificante
<i>HTRA1</i>	intrón 5		10679	27871	C/T		No codificante
<i>HTRA1</i>	intrón 6	rs2672585	10267	27871	G/A		No codificante
<i>HTRA1</i>	intrón 6		10263	27873	C/G		No codificante
<i>HTRA1</i>	intrón 7		8846	27875	C/G		No codificante
<i>HTRA1</i>	intrón 7		7394	27875	*		No codificante
<i>HTRA1</i>	intrón 7		7385	27875	†		No codificante
<i>HTRA1</i>	intrón 7		7393	27875	A/T	No codificante	
<i>HTRA1</i>	exón 8	rs11538140	7136	27875	C/T	sinónimo	

Gen	Región	Nº de rs	AccPos	Sec. Frag. 4850223	Cambio	Cambio de AA	Tipo
<i>HTRA1</i>	intron 8	rs2272599	7069	27875	G/A	No codificante	
<i>HTRA1</i>	intrón 8	rs2293871	4993	27877	T/C	No codificante	
<i>HTRA1</i>	exón 9		4744	27877	C/T	sinónimo	
* TAAATAAAA/- (SEC ID nº 1)							
† ATAAAAAATAAAT/- (SEC ID nº 2)							

En la Tabla 7 se da el par de cebadores (excluyendo la cola M13) usado para la secuenciación de cada fragmento.

Tabla 7. Cebadores directos e inversos usados para regiones resecuenciadas en los genes *PLEKHA1* y *HTRA1*.

Gen	Región	Cebador directo	Cebador inverso
<i>HTRA1</i>	promotor	CGGATGCACCAAAGATTCTCC (SEC ID nº 3)	TTCGCGTCCTTCAAACCTAATGG (SEC ID nº 4)
<i>HTRA1</i>	exón 1	AGCCGGAGCACTGCGAGGG (SEC ID nº 5)	CGCGAAGCTCGGTTCCGAGG (SEC ID nº 6)
<i>HTRA1</i>	exón 2	ACGTTTTGTGGTGAACCTGAGC (SEC ID nº 7)	GCAACAGCCACACACACCTAGC (SEC ID nº 8)
<i>HTRA1</i>	exón 3	GCCCGATATATAAAGGAGCGATGG (SEC ID nº 9)	IDAGAAGTTTTCTGAGCCCCTTCC (SEC ID nº 10)
<i>HTRA1</i>	exón 4	GGGATGTTAGTTGTGAGCTCAGTTCC (SEC ID nº 11)	SECGCACTAGAATCCACATGGCTTGG (SEC ID nº 12)
<i>HTRA1</i>	exón 5	CTGGGCTTCAGAGAGAAAATCTCC (SEC ID nº 13)	IDATCCGTAGGGTCATTTGCAAGC (SEC ID nº 14)
<i>HTRA1</i>	exón 6	AGTGCCGACCTGGAGTATGTGC (SEC ID nº 15)	nºGGTGAAATGTCTGTGACCTTCTGC (SEC ID nº 16)
<i>HTRA1</i>	exón 7	GTACCCTTCTGTGGCCCTTCC (SEC ID nº 17)	AAGGGGCCAAGGCTAATGACC (SEC ID nº 18)
<i>HTRA1</i>	exón 8	CAGTGAAGTGAATCGTACCACTGC (SEC ID nº 19)	IDAGACAGAAGGCACCCTCCTATGG (SEC ID nº 20)
<i>HTRA1</i>	exón 9	CGTGCCTGACCACTGATGG (SEC ID nº 21)	CCCAAGCTGGCAAGAAAAGC (SEC ID nº 22)
<i>PLEKHA1</i>	exón 2	ACCTTACCTAATGTTGGCAAG (SEC ID nº 23)	GAAGACAAATCTAAAGCCTGTATAG (SEC ID nº 24)
<i>PLEKHA1</i>	exón 3	TATTTCCCCCTTGCTTTTCAAG (SEC ID nº 25)	CCTAAACGTAGTAATCAGGTACC (SEC ID nº 26)
<i>PLEKHA1</i>	exón 4	CTCTTACAGTTGGGAAGTGCATCC (SEC ID nº 27)	nºGGGGTGCAAATGTTATTTCC (SEC ID nº 28)
<i>PLEKHA1</i>	exón 5	AGAAATGCTAGCCAAGTGTGG (SEC ID nº 29)	GCTTGAGTATGAAACCTGTTGG (SEC ID nº 30)
<i>PLEKHA1</i>	exón 6	GAAGTAGTACCTGCCCCGAGTAAGC (SEC ID nº 31)	IDGGTGAAAAGTACATGAAGAAAGGC (SEC ID nº 32)
<i>PLEKHA1</i>	exón 7	CAGGACTTGTGCAAAACAAGAGG (SEC ID nº 33)	nºCCCCTAIII IATCTCCTGACTCTCC (SEC ID nº 34)
<i>PLEKHA1</i>	exón 8	CTGGGTAGCTAGAGAGGGATGAGG (SEC ID nº 35)	IDGTGGAATGCTGCTTTGAAGATAGG (SEC ID nº 36)
<i>PLEKHA1</i>	exón 9	TGTGCTGGATGGTTAAGAAGG (SEC ID nº 37)	nºTGTCAAATCTGATGGCCTAACC (SEC ID nº 38)

Gen	Región	Cebador directo	Cebador inverso
		37)	38)
<i>PLEKHA1</i>	exón 10	TGGGTTTGCTAAATCAGTGC (SEC ID nº 39)	CCCACTTCCTGAACATATAACC (SEC ID nº 40)
<i>PLEKHA1</i>	exón 11	CATTATTGACGCCTGTTGATGG (SEC ID nº 41)	nºCTTACATGATCCTGATCACACACC (SEC ID nº 42)
<i>PLEKHA1</i>	exón 12	TGCACATTTATGCTGCATGG (SEC ID nº 43)	CAGAGCTTGTTTCAGTCACTTTGG (SEC ID nº 44)
<i>PLEKHA1</i>	exón 12	CCTCTCGCAGCAACTCTTTGG (SEC ID nº 45)	CCCGAATGAGAACACACAATGC (SEC ID nº 46)

Genotipado adicional

Tras la identificación de rs11200638, las 270 muestras de los casos y de controles se genotiparon para rs11200638 usando el ensayo de genotipado de SNP TaqMan personalizado (Applied Biosystems). Se obtuvieron genotipos para 97 casos y 126 controles.

PCR en tiempo real de ratón

Se aislaron retinas completas de ratones C57/Black6 de 1 día, 7 días, 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses y 16 meses después del nacimiento, así como ratones Rdl de 3 meses. Se extrajo ARN total mediante TRIzol (Invitrogen). El ARN total (2 ug) se transcribió de forma inversa a ADNc usando el kit SuperTranscript (Invitrogen).

El par de cebadores para HTRA1 fue 5'-TGGGATCCGAATGATGTCGCT (directo) (SEC ID NO. 47) y 5'-ACAACCATGTTTCAGGGTG (inverso) (SEC ID NO. 48) con una longitud de 237 pb. La temperatura de hibridación fue 58°C. Se empleó el reactivo Syber Green (Bio-Rad) para el marcado del producto de la PCR, y se usó iCycler (Bio-Rad) para llevar a cabo PCR y la recogida de datos. Se llevó a cabo la PCR semicuantitativa en un volumen de reacción total de 25 ul, incluyendo 2,5 ul de 10x de tampón de PCR de Alta Fidelidad (Invitrogen), 1,5 ul de MgSO₄ (50 mM, Invitrogen), 0,4 ul de dNTP (25 mM, Invitrogen), 0,2 ul de Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), 0,2 ul de cebadores (0,1 mM), y 0,2 ul de ADNc.

Análisis computacional para el promotor de HERA1

Las secuencias promotoras para los genes de HTRA1 humano y de ratón se obtuvieron a partir del sitio web de UCSC Genome Bioinformatics (www.genome.ucsc.edu). Los sitios de unión del factor de transcripción (TF) posibles se examinaron en la región -2.000 a +100 pb de cada secuencia promotora usando las matrices ponderales posicionales extraídas de las bases de datos TRANSFAC (www.gene-regulation.com/pub/databases.html). Las huellas de la conservación de las secuencias entre los promotores humano y de ratón se generaron usando el programa DnaBlockAligner del paquete de software Wise 2.0 (www.ebi.ac.uk/Wise2/). En la secuencia del promotor de ratón, -407 se identificó como el sitio de SNP G → A de -512 en seres humanos. Sólo se consideraron adecuados aquellos sitios de unión de TF que conservaron el SNP y estaban localizados en la región promotora conservada humana y de ratón. En la Figura 3 se muestran los resultados del análisis computacional.

Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) se trataron 1×10^8 células HeLaS3 con formaldehído (concentración final de 1%) durante 10 min. para reticular las proteínas a sus dianas de unión a ADN, y se paralizaron con glicina en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) a una concentración final de 125 mM. Las células se lavaron dos veces con 1x PBS fría. El extracto nuclear se preparó hinchando las células en hielo durante 15 min. en un tampón hipotónico (20 mM de Hepes, pH 7,9, 10 mM de KCl, 1 mM de EDTA, pH 8, 10% de glicerol, 1 mM de DTT, 0,5 mM de PMSF, 0,1 mM de ortovanadato de sodio, e inhibidores de proteasa), seguido de la homogeneización en un homogeneizador Dounce (30 veces). Los núcleos se peletizaron mediante centrifugación breve, y se lisaron en tampón de radioinmunoprecipitación (RIPA) (10 mM de Tris-Cl, pH 8,0, 140 mM de NaCl, 0,025% de azida sódica, 1% de Triton X-100, 0,1% de SDS, 1% de ácido desoxicólico, 0,5 mM de PMSF, 1 mM de DTT, 0,1 mM de ortovanadato de sodio, e inhibidores de proteasa) durante 30 min. en hielo con movimiento de vórtex repetido. El extracto se sometió a ultrasonidos con un Branson 250 Sonifier para cizallar el ADN (salida 20%, ciclo de trabajo 100%, cinco pulsos de 30 segundos), y las muestras se aclararon mediante centrifugación a 14.000 rpm a 4°C durante 15 min. Se apartaron 200 µl de extracto para la purificación de una muestra de ADN de entrada de control. Se inmunoprecipitaron complejos de AP-2α o SRF-ADN a partir del extracto sometido a ultrasonidos con un anticuerpo anti-AP-2α (C-18) o anti-SRF (H-300) (Santa Cruz Biotechnology) toda la noche a 4°C con agitación suave. El ADN de la IP de cromatina de control se preparó usando IgG de conejo policlonal normal (Santa Cruz Biotechnology). Cada muestra de inmunoprecipitación se incubó con proteína A-agarosa (Upstate Biotechnology) durante 1 hora a 4°C, seguido de tres lavados con tampón de RIPA y un lavado con 1x PBS. Los complejos de

anticuerpo-proteína-ADN se eluyeron de las perlas mediante adición de 1% de SDS, 1x TE (10 mM de Tris-Cl, pH 7,6, 1 mM de EDTA, pH 8) e incubación a 65°C durante 10 min., seguido de una segunda ronda de elución con 0,67% de SDS en 1x TE, incubación durante otros 10 min. a 65°C, y después un vórtex suave durante 10 min. Las perlas se eliminaron mediante centrifugación, y los sobrenadantes se incubaron a 65°C toda la noche para invertir las reticulaciones. Para purificar el ADN, así como la muestra de ADN de entrada, se añadió ARNasaA (200 µg/muestra, en 1x TE), y después las muestras se incubaron a 37°C durante 2 horas, seguido de una incubación con disolución de proteinasa K (400 µg/ml de proteinasa K) durante 2 horas a 45°C. Finalmente, se llevó a cabo una extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, y el ADN se recuperó mediante precipitación con etanol. En (S. E. Hartman et al., Genes Dev 19, 2953 (2005)) se puede encontrar una descripción más detallada del procedimiento.

Análisis mediante PCR cuantitativo de muestras de ADN ChIP

Las muestras de ADN de IgG, AP-2 α y SRF de conejo normales para ChIP se analizaron mediante PCR cuantitativa a fin de ensayar el enriquecimiento de sitios de unión específicos. Se diseñaron cebadores para flanquear la región diana candidata en dirección 5' del gen HTRA1 gene: (-574 a -331; directo: 5'- TCACTTCACTGTGGGTCTGG-3' (SEC ID No. 49); inverso: 5'-GGGGAAAGTTCCTGCAAATC-3') (SEC ID No. 50). Los cebadores también se diseñaron para flanquear regiones promotoras humanas unidas a AP-2 α y SRF conocidas para servir como controles positivos para los ensayos de PCR de ChIP (S. Decary et al., Mol Cell Biol 22, 7877 (2002)). Para AP-2 α , se escogieron regiones en dirección 5' de la proteína 5 de unión al factor de crecimiento semejante a insulina (*IGFBP-5*; -94 a +73; directo: 5'-CTGAGTTGGGTGTTGGGAAG-3' (SEC ID No. 51); inverso: 5'-AAAGGGAAAAAGCCCACACT-3') (SEC ID No. 52) y E-cadherina (*ECAD*; -174 a -7; directo: 5'-TAGAGGGTCACCGCTCTATG-3' (SEC ID No. 53); inverso: 5'-GGGTGCGTGGCTGCAGCCAGG-3') (SEC ID No. 54) (K. P. Magnusson et al., PLoS Med 3, e5 (2006)). Los controles positivos para SRF estuvieron en dirección arriba del antígeno 1 relacionado con Fos (*FRA-1*; -238 a -91; directo: 5'-GCGGAGCTCGCAGAAACGGAGG-3' (SEC ID No. 55); inverso: 5'-GGCGCTAGCCCCCTG ACGTAGCTGCCCAT-3') (SEC ID No. 56) (P. Adiseshaiah, S. Peddakama, Q. Zhang, D. V. Kalvakolanu, S. P. Reddy, Oncogene 24, 4193 (2005)) y la proteína de respuesta de crecimiento temprana (*EGR-1*; -196 a -30; directo: 5'-CTAGGGTGCAGGATGGAGGT-3' (SEC ID No. 57); inverso: 5'-GCCTCTATTTGAAGGGTCTGG-3') (SEC ID No. 58) (U. Philippar et al., Mol Cell 16, 867 (2004)). También se ensayó una región promotora humana de control negativo, la proteína asociada a BAL y linfoma B (*BBAP*), (-151 a +59; directo 5'-CAGACAGCACAGGGAGGAG-3' (SEC ID No. 59); inverso 5'-ACTTGTACACCCGCACGAG-3') (SEC ID No. 60). Las reacciones de PCR cuantitativas se llevaron a cabo usando un sistema de detección de secuencias ABI Prism 7000 y SYBR Green Master Mix (MJ Research) y 5% de DMSO. Las condiciones de ciclación fueron las siguientes: 95°C durante 5 min., 40 ciclos de 95°C durante 30 s, 52°C durante 30 s, 72°C durante 30 s, un período de extensión final de 72°C durante 10 min., seguido de un protocolo de disociación de 60-95°C. Los valores de $\Delta\Delta Ct$ y de número de veces de cambio se calcularon con relación a las reacciones de PCR de referencia.

Ensayo informador

El efecto del SNP rs11200638 sobre la actividad del promotor de HTRA1 se evaluó usando un ensayo de luciferasa sobre células ARPE19 transfectadas (epitelio de pigmento retiniano humano immortalizadas) procedente de la 32^a pasada y células HeLaS3. Se diseñaron constructos según el esquema en la Tabla 8, conteniendo un constructo el alelo de tipo salvaje de rs11200638, conteniendo otro el alelo mutante, y un tercero sin inserto. Las células se hicieron crecer en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) con contenido elevado de glucosa + 10% de Suero Fetal Bovino (FBS) + 0,1% de gentamicina. Para la transfección, el medio se cambió a medio artificial de suero reducido (Opti-MEM I) sin gentamicina. Los cultivos se transfectaron cuando alcanzaron 80% de confluencia para las células HeLaS3 y 50% de confluencia para las células ARPE19. La transfección se llevó a cabo con lipofectamina 2000 (2 µl/ml; Invitrogen), potenciada por Proteína de Fluorescencia Verde (eGFP; 1,2 µg/ml) y los constructos (0,7 µg/ml, 1,4 µg/ml o 2,1 µg/ml para HeLaS3 y 1,4 µg/ml para ARPE19). Como control adicional, cada tipo celular se transfectó con lipofectamina sola (control). Las células se incubaron con los reactivos de transfección durante 8 horas. Después de eliminar los reactivos de transfección, se dejó que las células creciesen durante 48 horas adicionales antes de que se llevara a cabo el ensayo de luciferasa. A cada pocillo se añadieron 150 µl de tampón de lisis. Se cargaron 100 µl del lisado resultante sobre una placa de 96 pocillos negra, y se añadieron a cada pocillo 100 µl de sustrato luciferasa (Bright-Glo; Promega). La recogida de datos (tanto la intensidad de fluorescencia de GFP como la actividad de luciferasa) se llevó a cabo en un lector de placas de 96 pocillos Packard Fusion. Se repitieron experimentos independientes tres veces para cada dosis de constructo y tipo de constructo para las células HeLaS3, y seis veces para cada tipo de constructo para las células ARPE19.

Tabla 8. Diseño experimental del ensayo informador del promotor de HTRA1. Información sobre los constructos informadores usados en el ensayo.

Nombre del constructo	Vector	Inserto	Genotipo de SNP
HTRA1-AA	PGL2-Basic	-834 a +119	mutante
HTRA1-GG	PGL2-Basic	-834 a +119	tipo salvaje
vector en blanco	PGL2-Basic	Ninguno	N/A
eGFP	Vector informador de GFP para el control de la eficiencia de la transfección		

EJEMPLO 1

Para identificar una nueva o nuevas variantes genéticas que predispongan a los individuos al fenotipo de AMD neovascular húmeda en pacientes de descendencia asiática, se identificaron 96 pacientes a los que se les diagnosticó previamente AMD húmeda y 130 individuos de control de edad parecida que estaban libres de AMD (L. Baum et al., *Ophthalmologica* 217, 111 (2003), C. P. Pang et al., *Ophthalmologica* 214, 289 (2000)) a partir de una cohorte de asiáticos surorientales en Hong Kong. Las observaciones epidemiológicas indican que AMD neovascular es más prevalente entre asiáticos que entre caucásicos (A. C. Bird, *Eye* 17, 457 (2003), R. Klein et al., *Ophthalmology* 113, 373 (2006), T. S. Chang, D. Hay, P. Courtright, *Can J Ophthalmol* 34, 266 (1999)), y el drusen indistinto blando que es característico de AMD seca se observa raramente en individuos asiáticos (M. A. Sandberg, A. Weiner, S. Miller, A. R. Gaudio, *Ophthalmology* 105, 441 (1998), M. Uyama et al., *Br J Ophthalmol* 84, 1018 (2000), M. Yuzawa, K. Hagita, T. Egawa, H. Minato, M. Matsui, *Jpn J Ophthalmol* 35, 87 (1991)). Se ha demostrado que la variante de CFH Y402H que se produce frecuentemente en caucásicos (>35%) se produce menos frecuentemente en individuos de ascendencia japonesa y china (<5%) (N. Gotoh et al., *Hum Genet* 120, 139 (2006), H. Okamoto et al., *Mol Vis* 12, 156 (2006), M. A. Grassi et al., *Hum Mutat* 27, 921 (2006)). Se examinaron fotografías del fondo retiniano procedentes de cada uno de los 226 participantes en el estudio. Se llevó a cabo angiografía de tinción verde con indocianina (ICG) para excluir casos con vasculopatía coroidal polipoidal (PCV) y para verificar que en todos los casos estaba presente CNV (AMD grado 5). Los casos de AMD y los controles tuvieron una edad media de 74. En la Tabla 1 se resumen otras características de la población del estudio.

Se llevó a cabo un estudio de asociación del genoma completo en esta cohorte de asiáticos para buscar polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) usando procedimientos de genotipado y de vigilancia de calidad de datos previamente descritos (C. P. Pang et al., *Ophthalmologica* 214, 289 (2000)). De los 97.824 SNPs autosómicos que fueron informativos y pasaron los controles de calidad, rs10490924 fue el único polimorfismo que mostró una asociación significativa con AMD usando los criterios de Bonferroni (Tabla 9). La prueba de chi cuadrada de frecuencia alélica produjo un valor de P de $4,1 \times 10^{-12}$ (Tabla 9). La OR fue 11,1 (intervalo de confianza de 95% [CI] 4,83-25,69) para aquellos que poseen dos copias del alelo de riesgo cuando se compara con homocigotos de tipo salvaje, pero fue indistinguible de la unidad, 1,7 (95% de CI 0,75-3,68), para aquellos que tienen un único alelo de riesgo. El homocigoto de riesgo dio cuenta del 86% del riesgo atribuible a la población (PAR), aunque este número puede estar artificialmente inflado puesto que el alelo de riesgo fue portado por más de la mitad (~55%) de la cohorte de AMD (Tabla 9). Cuando los ensayos de relación de probabilidad se ajustaron para el género y el estado de tabaquismo, o cuando se aplicaron métodos de control genómico para controlar la estratificación de la población, hubo poco cambio en los niveles de significancia.

Tabla 9. Asociación, razones de momios y riesgo atribuible a la población (PAR) para AMD en población china. La relación de momios y PAR comparan la probabilidad de AMD en individuos con el genotipo listado de alelo de riesgo frente a aquellos homocigotos para el alelo de tipo salvaje.

SNP (alelos)	Alelo de riesgo	P nominal alélico χ^2	Razón de momios* (95% CI)	PAR* (95%CI)	Razón de momios † (95%CI)	PAR† (95% CI)
rs10490924 (G/T)	T	$4,08 \times 10^{-12}$	1,66 (0,75-3,68)	29% (0-63%)	11,14 (4,83-25,69)	86% (69%-94%)
rs11200638 (G/A)	A	$8,24 \times 10^{-12}$	1,60 (0,71-3,61)	27% (0-61%)	10,0 (4,38-22,82)	84% (66%-93%)

* Individuos de riesgo heterocigotos comparados con homocigotos de tipo salvaje.

† Individuos de riesgo homocigotos comparados con homocigotos de tipo salvaje.

SNP rs 10490924 reside entre dos genes en el cromosoma 10q26 (Figura 1): *PLEKHA1* que codifica una proteína que contiene dominio de homología de pleckstrina (GenBank ID 59338) y *HTRA1* que codifica una serina proteasa de choque térmico también conocida como *PRSS11* (GenBank ID 5654). La baja homología de secuencias a lo largo de las especies en la región intergénica que contiene rs10490924 indica que no está evolutivamente conservada (Figura 1). El cromosoma 10q26 se ha relacionado con AMD en muchos estudios de familia independientes, y esta región de ligación se estrechó previamente hasta SNP rs 10490924 (P. Armitage, G. Berry, Statistical Methods in Medical Research (Blackwell Scientific Publications, 1971)). Se pensó originalmente que SNP rs10490924 da como resultado un cambio codificante proteico en el locus hipotético LOC387715 (A. Rivera et al., Hum Mol Genet 14, 3227 (2005), J. Jakobsdottir et al., Am J Hum Genet 77, 389 (2005)). Basándose en pruebas de solamente una secuencia de ADNc única encontrada en tejido placentario, se eliminó subsiguientemente LOC387715 de la base de datos de GenBank. Se teorizó que SNP rs10490924 puede ser un marcador sustituto que está correlacionado, o está en desequilibrio de ligación (LD), con la variante putativa que provoca la enfermedad de AMD en la vejez. Los análisis haplotípicos usando los datos genotípicos del solicitante o los datos procedentes del International HapMap Project no tuvieron éxito a la hora de identificar dónde reside el sitio funcional.

Por lo tanto, se secuenció toda la región genómica local, incluyendo promotores, exones y uniones intrón-exón tanto de *PLEKHA1* como de *HTRA1*, en busca de la variante funcional. Basándose en los genotipos del SNP rs10490924 marcador, se secuenciaron 50 casos que fueron homocigotos para el alelo de riesgo y 38 controles que fueron homocigotos para el alelo de tipo salvaje. De los 43 SNPs o polimorfismos de inserción/supresión identificados (Figura 1 y Tabla 6), un SNP (rs11200638), situado 512 pares de bases (pb) en dirección 5' del sitio de iniciación transcripcional putativo de *HTRA1* y 6.096 pb en dirección 3' de SNP rs10490924, mostró un patrón de LD completo con SNP rs10490924. El genotipado de toda la cohorte reveló que SNP rs11200638 apareció a frecuencias similares a aquellas para SNP rs10490924 ($P = 8,2 \times 10^{-12}$ para el ensayo χ^2 de asociación alélica), y los dos SNPs estuvieron casi en LD completo ($D' > 0,99$) Tabla 9.

EJEMPLO 2

El SNP rs11200638 está situado 512 pares de bases (pb) en dirección arriba del sitio de iniciación de la transcripción del gen de *HTRA1* (también conocido como *PRSS11*, NM 002775).

El análisis computacional de la secuencia del promotor de *HTRA1* predijo que SNP rs11200638 reside en los sitios de unión putativos para el complejo proteico 2 alfa relacionado con el adaptador de factores de transcripción (AP2 α y el factor de respuesta del suero (SRF). Este segmento de ADN, que contiene el alelo de tipo salvaje, es parte de una isla CpG y empareja estrechamente las secuencias de respuesta de consenso de estos dos factores de transcripción (Figura 3). Se predijo que la presencia del alelo de riesgo altera la afinidad de AP2 α y SRF para el promotor de *HTRA1*. Además, el análisis del promotor con MatInspector (Genomatix Software GmbH) sugirió que la variación de secuencia en SNP rs11200638 puede alterar la unión del miembro de la familia del factor de transcripción Sp (proteína específica).

Para verificar que los factores de transcripción predichos se unen al promotor de *HTRA1* en células humanas cultivadas, se llevó a cabo la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) seguido de análisis de PCR en tiempo real cuantitativo. Se prepararon lisados a partir de células de carcinoma de cuello uterino humano en crecimiento (HeLaS3) heterocigotas en rs11200638, y se llevó a cabo la ChIP usando anticuerpos policlonales de conejo contra AP2 α o SRF. Los ensayos de PCR cuantitativos de las muestras de ADN de ChIP confirmaron que tanto AP2 α como SRF se unen en dirección arriba del gen de *HTRA1* (Figuras 2 y 3).

Para investigar la influencia de SNP rs11200638 sobre el promotor de *HTRA1*, se transfectaron transitoriamente células humanas ARPE19 (epitelio de pigmento retiniano) y HeLaS3 con un plásmido informador de luciferasa dirigido por el promotor de *HTRA1* que posee el genotipo de tipo salvaje (GG) o el homocigoto de riesgo (AA). Los resultados preliminares mostraron una tendencia persistente de mayores expresiones de luciferasa con el genotipo AA en comparación con el genotipo GG.

Se usaron los siguientes Métodos y Materiales en el trabajo descrito aquí, particularmente los Ejemplos 3, 4 y 5.

Pacientes

Este estudio fue aprobado por el University of Utah Institutional Review Board. Todos los sujetos proporcionaron su autorización escrita antes de la participación en el estudio. Los pacientes con AMD se reclutaron en el Moran Eye Center (Universidad de Utah), como lo fueron los controles normales de edad parecida (individuos de edad de 60 años o mayores sin drusen o cambios de RPE). Todos los participantes pasaron un protocolo de examen estándar y medidas de agudeza visual. Se llevó a cabo biomicroscopía de lámpara de ranura de los fondos usando una lente de 90 dioptrías. Se hicieron un par de fotografías de fondo de color estereoscópicas (50°) centradas en la fovea usando una cámara de fondo Topcon (Topcon TRV-50VT, Topcon Optical Company, Tokio, Japón) por fotógrafos oftálmicos expertos. La graduación se llevó a cabo según el sistema de clasificación de rejillas estándar sugerido por el ARM Epidemiological Study Group para maculopatía acelerada (ARM) y AMD (A. C. Bird et al., Surv Ophthalmol 39, 367

(1995)). Todas las anomalías en la mácula se caracterizaron según 1) tipo, tamaño y número de drusen, 2) hiperpigmentación o hipopigmentación de RPE, y 3) etapas avanzadas de AMD, incluyendo atrofia geográfica (GA, AMD seca), y neovascularización coloidal (CNV, AMD húmeda). En este estudio participó un total de 581 pacientes con AMD (392 con AMD húmeda, 189 con drusen confluyente blando) y 309 controles normales de edad y etnia parecida (Tabla 10).

Tabla 10. Características de casos con AMD y controles de edad y etnia parecida

	Casos	Controles
Edad media	77	72
Género (M/F)	291/290	104/205
AMD (total)	581	309
AMD (húmeda)	392	
AMD (drusen confluyente blando)	189	

Genotipado

La cohorte de Utah inicial de 442 pacientes caucásicos con AMD, incluyendo 265 con AMD húmeda y 177 con drusen confluyente blando, se genotipó, y se compararon las frecuencias alélicas con 309 controles normales de edad y etnia parecidas. La muestra expandida para el genotipado de segunda etapa de rs10490924 y rs11200638 incluyó 581 pacientes con AMD (392 con AMD húmeda, 189 con drusen confluyente blando).

Para el genotipo rs11200638, se amplificó mediante PCR el ADN genómico extraído de muestras de sangre de pacientes con AMD y pacientes del control. Se usaron cebadores oligonucleotídicos, directo 5'-ATGCCACCCACAACAACCTTT-3' (SEC ID. No. 61) e inverso 5'-CGCGTCCTTCAAACCTAATGG-3' (SEC ID. No. 62), en reacciones de PCR que contienen 5% de DMSO. El ADN se desnaturalizó a 95°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos, 94°C durante 30 segundos, 52°C durante 30 segundos, y 72°C durante 45 segundos por ciclo. El producto de PCR se digirió con Eag I, para identificar el alelo G. Para rs10490924, se usó el cebador directo 5'-TACCCAGGACCGATGGTAAC-3' (SEC ID. No. 63) y el cebador inverso 5'-GAGGAAGGCTGAATTGCCTA-3' (SEC ID. No. 64) para la amplificación mediante PCR, y se usó la digestión con PvuII para identificar el alelo G. Los 13 SNPs restantes se genotiparon usando el método SNaPshot en un analizador genético ABI 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA) según las instrucciones del fabricante. El genotipado de CFH se llevó a cabo según métodos publicados (K.P. Magnusson et al., PLoS Med 3, e5 (enero 2006)).

Análisis de datos

10g26

Se llevó a cabo el ensayo de la chi cuadrada en busca de la tendencia para el modelo aditivo con respecto a los alelos para evaluar signos de asociación. También se calcularon las razones de momios y los intervalos de confianza del 95% para estimar el tamaño de riesgo para los heterocigotos y homocigotos para los alelos de riesgo.

Análisis de dos locus (CFHY402H en 1q31 y rs11200638 en 10g26)

Se llevaron a cabo análisis de dos locus para la variante de CFH rs1061170 (Y402H) en 1q31 y rs11200638 para 10g26. Se construyó una tabla de contingencias basada en el estado de caso-control y la combinación genotípica de dos locus. Las combinaciones genotípicas de dos locus a lo largo de CFHY402H y rs11200638 fueron TT/GG, TT/AG, TT/AA, CT/GG, CT/AG, CT/AA, CC/GG, CC/AG, y CC/AA. Esta tabla de contingencia de dos locus global de 9x2 se ensayó con una estadística de chi cuadrada en 8 grados de libertad. Se calcularon las razones de momios y los intervalos de confianza del 95%, comparando cada combinación genotípica con el valor inicial de homocigosidad para el alelo común en ambos loci (TT/GG). Para los genotipos de riesgo identificados, se calcularon los riesgos atribuibles a la población (PAR), que indican la proporción de riesgo de enfermedad atribuible a los genotipos de riesgo, usando la fórmula de Levin (M. L. Levin, Acta Unio Int Contra Cancrum 9, 531 (1953)).

Inmunohistoquímica de HTRA1

Se obtuvieron ojos de donantes con AMD de Utah Lions Eye Bank. Se incubaron criosecciones de ojos fijados con paraformaldehído, en 0,3% de H₂O₂ en metanol, para paralizar la actividad de peroxidasa endógena. Se llevó a cabo la inmunohistoquímica usando 5 µg/ml de anticuerpo policlonal mono específico anti-HTRA1 humana (J. Chien et al., J Clin Invest 116, 1994 (Jul, 2006)). Se usó el kit VectorStain Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y el sustrato de peroxidasa VIP (Vector Laboratories) para la detección de HTRA1, y el inmunomarcado se capturó usando óptica Nomarski en un microscopio Nikon Eclipse 80i.

RT-PCR semicuantitativa de ARNm de *HTRA1* en muestras de linfocitos humanos

Se usó un sistema de PCR en tiempo real comercial (Opticon; MJ Research, Watertown, MA) para cuantificar los niveles del transcrito de *HTRA1* de muestras de linfocitos de sangre de pacientes. Se extrajo ARN total (RNeasy; Qiagen, Valencia, CA) de linfocitos periféricos de muestras de sangre, y se llevó a cabo la PCR con transcripción inversa (RT-PCR) usando el kit de RT-PCR QuantiTect SYBR Green (Qiagen). Se usaron cebadores de *HTRA1* (cebador directo 5'-AGCCAAAATCAAGGATGTGG-3' (exón 3) (SEC ID NO. 65) y cebador inverso 5'-GATGGCGACCACGAAGTC-3' (exón 4)) (SEC ID NO. 66), y se usaron 100 nanogramos (ng) de ARN total de cada muestra para las reacciones de RT-PCR de una etapa. Se generaron curvas patrón de 0 a 400 ng de ARN total de muestras de linfocitos de pacientes. Se amplificó un gen de mantenimiento gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en reacciones paralelas (cebador directo 5'-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3' (exón 7) (SEC ID NO. 67) y cebador inverso 5'-GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3' (SEC ID NO. 68), y se usó para normalizar los valores de *HTRA1*. Las curvas patrón de *HTRA1* y GAPDH mostraron cinéticas de amplificación similares. Se ensayaron tres a cuatro pacientes para los genotipos GG y AA en reacciones por duplicado y experimentos por duplicado. Los resultados se presentan como porcentaje de incremento en los niveles de ARN de *HTRA1* para muestras de AA con relación a muestras de GG (Figura 4B).

Análisis Western de la expresión de *HTRA1* en RPE humano

25 µg de proteína total de epitelio de pigmento retiniano procedente de cuatro ojos con AMD húmeda con un genotipo AA y seis ojos normales con un genotipo GG se sometió a SDS-PAGE. La transferencia Western se llevó a cabo usando 1,5 µg/ml de anticuerpo policlonal anti-*HTRA1* humana (J. Chen et al., J Clin Invest 116, 1994 (Jul, 2006)). El nivel de expresión de la proteína de *HTRA1* se normalizó a 3-actina. Se examinó la significancia estadística usando la prueba de la t de muestras independientes (SPSS versión 13.0).

EJEMPLO 3

Para identificar el gen crítico en el locus cromosómico 10q26 en una cohorte caucásica en Utah, se genotiparon 442 casos de AMD y 309 controles, usando un panel de 15 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) centrados alrededor del SNP asociado con riesgo más elevado, y se encontró que rs 10490924 tiene una señal de asociación significativa [$P = 8,1 \times 10^{-8}$ para un modelo de alelo-dosis aditivo, $OR_{het} = 1,35$ (0,99, 1,86), $OR_{hom} = 6,09$ (3,27, 11,34), alelo T: 39,7% en los casos frente a 24,7% en los controles]. Sin embargo, de los 15 SNPs analizados, rs11200638 fue la variante asociada más significativamente [$P = 1 \times 10^{-9}$, $OR_{het} = 1,86$ (1,35, 2,56), $OR_{hom} = 6,56$ (3,23, 13,31), alelo A: 40,3% en los casos frente a 25,2% en los controles] (Figura 4A y Tabla 11).

Tabla 11. Resultados de asociación para 15 SNPs a 10q26 en los casos con AMD y en los controles.

SNP	by	chi-trend	trend_p	ORhet	ORhom	chi_dom	dom_p	ORdom
rs986960	12408254	0,5141005	0,4733694	0,91(0,64,1,3	0,85	0,4099402	0,522	0,89 (0,64, 1,26)
rs1998345	12411429	8,1847003	0,0042245	1,37(0,99,1,9	2,02	6,1691034	0,013	1,48 (1,09,2,02)
rs2901307	12411843	5,0544893	0,0245621	0,79(0,55,1,1	0,59	3,0248076	0,082	0,73 (0,52,1,04)
rs4146894	12414537	16,549416	4,74E-05	1,76(1,22,2,5	2,32	15,445303	8,49E-05	1,96 (1,40,2,74)
rs2421016	12415750	11,094448	0,0008661	1,82(1,24,2,6	2,21	11,989527	0,0005352	1,91 (1,32,2,77)
rs1045216	12417918	0	1	0,88(0,64,1,2	1,12	0,2458672	0,62	0,92 (0,67,1,26)
rs1049092	12420443	32 1381	8 14E-08	1,35(0,99,1,8	6,09(3,27,11,	15,372106	8,80E-05	1,81 (1,35,2,45)
rs3750847	12420541	27,1378	1,86E-07	1,44(1,04,1,9	5,99(2,98,12,	14,608167	0,0001324	1,82 (1,34,2,47)
rs3750846	12420555	18,646568	1,57E-05	1,9	4,86(2,32,10,	10,332306	0,0013074	1,65 (1, 22,2, 24)
rs2014307	12420762	24,366379	5,90E-07	0,61(0,44 ,0,8	0,23	14,867718	0,0001154	0,54 (0,39,0,74)
rs1120063	12421052	37,2931	1,02E-09	1,86(1,35,2,5	6,56(3,23,13,	28,22876	3,82E-07	2,21 (1,62,3,01)
rs1049331	12421126	0,8081998	0,368653	0,71(0,49,1,0)	0,88	2,4978763	0,114	0,75 (0,52,1,07)
rs4752700	12422760	1,4022982	0,236339	0,65(0,45,0,9	0,85	4,176009	0,041	0,69 (0,49,0,99)
rs2300431	12423280	1,6662006	0,1967684	1,0	0,81	2,4436668	0,118	0,76 (0,53, 1,07)
rs714816	12424633	6,812544	0,0090517	1,11(0,80,1,5	2,26	2,2571312	0,133	1,27 (0,93,1,73)

En términos de la significancia de la asociación, el haplotipo TA a lo largo de rs10490924 y rs11200638 fue superior a rs10490924 ($P = 2,2 \times 10^{-9}$), pero inferior a rs11200638. Se genotipó 139 pacientes con AMD adicionales para estas dos variantes. Los resultados para ambos SNPs aumentaron en significancia (rs 10490924, $P = 1,2 \times 10^{-8}$; rs11200638, $P = 1,6 \times 10^{-11}$), permaneciendo la variante rs11200638 la mejor variante individual que explica la asociación [$OR_{het} = 1,90$ (1,40, 2,58), $OR_{hom} = 7,51$ (3,75, 15,04)].

EJEMPLO 4

Se ha sugerido que el factor del complemento H (CFH) media la formación de drusen (G. S. Hageman et al., Proc Natl Acad Sci USA 102, 7227 (2005)). En el estudio de asociación del genoma completo previo del solicitante, en el que la presencia de gran cantidad de drusen fue el fenotipo primario bajo investigación, se demostró que la variante de CFH Y402H es un factor de riesgo genético importante (R. J. Klein et al., Science 308, 385 (2005)). Más recientemente, se ha dado a conocer que se observó la razón de momios (OR) más elevada para CFH Y402H para casos con AMD grado 4 (es decir, la presencia de CGA) en comparación con controles con AMD grado 1 (E. A. Postel et al., Ophthalmology 113, 1504 (2006)). Se ha demostrado una asociación entre AMD y CFH Y402H, así como otras variantes de CFH intrónicas, para más de diez poblaciones caucásicas diferentes (J. Maller et al., Nat Genet 38, 1055 (2006), S. Haddad, C. A. Chen, S. L. Santangelo, J. M. Seddon, Surv Ophthalmol 51, 316 (2006), M. Li et al., Nat Genet 38, 1049 (2006), A. Thakkinian et al., Hum Mol Genet 15, 2784 (2006)). Se llevaron a cabo análisis de asociación basándose en genotipos en tanto rs11200638 y la variante de CFH rs1061170 (Y402H) en el cromosoma 1q31. En un análisis de dos locus global que enumera las nueve combinaciones genotípicas de dos locus, la asociación con AMD fue significativa ($\chi^2 = 56,56$, 8 df; $P = 2,2 \times 10^{-9}$). La Tabla 12 muestra las estimaciones de riesgo para cada combinación genotípica de dos locus en comparación con los genotipos sin riesgo del valor inicial (TT en CFHY402H y GG en rs 11200638).

Tabla 12. Razones de momios de dos locus para HTRA1 rs11200638 y CFH rs1061170. Se calcularon razones de momios con intervalos de confianza del 95% entre paréntesis para comparar cada combinación genotípica con el valor inicial de homocigosidad para el alelo común en ambos loci (TT/GG).

SNP HTRA1 rs11200638				
CFH rs1061170 (Y402H)		GG	AG	AA
	TT	1,00	1,80 (0,93,3,49)	3,43 (0,62,19,00)
	CT	1,07 (0,59,1,94)	2,31 (1,28,4,17)	7,31 (2,68,19,93)
	CC	3,07 (1,50,6,27)	3,97 (1,93,8,15)	31,52 (4,01,247,96)

La asociación de rs11200638 con AMD fue significativa cuando se analizó condicionada a la presencia del alelo de riesgo de CFH C ($P = 5,9 \times 10^{-8}$). En particular, este análisis condicional indica un efecto de alelo-dosificación de manera que los homocigotos para el alelo de riesgo A de rs11200638 tienen un mayor riesgo [$OR_{hom} = 7,29$ (3,18, 16,74)] con respecto al de los heterocigotos [$OR_{het} = 1,83$ (1,25, 2,68)] en todos los casos con AMD, incluso cuando se compara con un valor inicial que incluye individuos que poseen los genotipos de riesgo en CFH. Con un modelo de alelo-dosificación, el riesgo atribuible a la población estimado (PAR) para rs11200638 es 49,3%. Consistente con un efecto aditivo, el PAR estimado de un modelo de unión con CFH Y402H (esto es, para un alelo de riesgo en cualquier locus) es 71,4%.

EJEMPLO 5

Para investigar la significancia funcional de SNP rs11200638 en caucásicos, se usó la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR) para estudiar los niveles de expresión de ARNm de HTRA1 en linfocitos de cuatro pacientes con AMD que poseen el alelo de riesgo AA y tres controles normales que poseen el alelo normal GG (Figura 4B). Los niveles de ARNm de HTRA1 en linfocitos de pacientes con AMD con el genotipo AA fueron mayores en un factor de 2,7 que aquellos en los controles normales con el genotipo GG (Figura 4B). El nivel de proteína de HTRA1 medio en RPE de cuatro ojos de donantes con AMD con un riesgo de alelo AA homocigoto fue mayor en un factor de 1,7 que el de seis controles normales con un alelo GG homocigoto. El análisis del tejido ocular humano se limitó a cuatro ojos de donantes con AMD con un genotipo AA de los 60 donantes para este estudio. Los datos sugieren una tendencia hacia una mayor expresión con el alelo AA de riesgo. Los experimentos inmunohistoquímicos revelaron que el inmunomarcado de HTRA1 está presente en el drusen de tres pacientes con AMD.

El gen de HTRA1 codifica un miembro de una familia de serina proteasas expresadas en la retina de ratón y RPE (C. Oka et al., Development 131, 1041 (2004)). Parece que HTRA1 regula la degradación de proteoglucanos de la matriz extracelular. Se piensa que esta actividad facilita el acceso de otras enzimas de la matriz degradativas, tales

como colagenasas y metaloproteinasas de la matriz, a sus sustratos (S. Grau et al., J Biol. Chem. 281, 6124 (2006)). Concebiblemente, la sobreexpresión de HTRA1 puede alterar la integridad de la membrana de Bruch, favoreciendo la invasión de capilares coroides a través de la matriz extracelular, como ocurre en AMD húmeda. HTRA1 también se une e inhibe el factor β de crecimiento transformante (TGF- β), un regulador importante de la deposición de la matriz extracelular y angiogénesis (Oka et al., Development 131, 1041 (2004)).

5

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar o ayudar a identificar un individuo que sufre o tiene riesgo de desarrollar degeneración macular relacionada con la edad, para diagnosticar o ayudar a diagnosticar degeneración macular relacionada con la edad en un individuo, o para evaluar el riesgo de progresión de degeneración macular relacionada con la edad en un individuo, que comprende:

(I) ensayar una muestra obtenida del individuo en busca de la presencia de una base nucleotídica distinta de una G en la posición 29 en SEC ID No: 69 del gen de HTRA1 humano, en el que la presencia de una base nucleotídica distinta de una G en dicha posición del gen de HTRA1 variante indica que el individuo sufre o tiene riesgo de desarrollar o de progresión de degeneración macular relacionada con la edad; o

(II)

(a) combinar una muestra del individuo con una sonda polinucleotídica que se hibrida, en condiciones restrictivas, a una variación en la región reguladora no codificante en dirección arriba de la posición +1 del sitio de iniciación de la transcripción putativo del gen de HTRA1 humano que está correlacionado con la aparición de degeneración macular relacionada con la edad en seres humanos, pero no se hibrida a un gen de HTRA1 de tipo salvaje, produciendo de ese modo una combinación;

(b) mantener las condiciones de combinación apropiadas para que se produzca la hibridación; y

(c) determinar si se produce la hibridación, en el que la aparición de hibridación indica que el individuo tiene riesgo de desarrollar o progresión de degeneración macular relacionada con la edad; o

(III)

(a) secuenciar una región del ADN procedente de un individuo que comprende el nucleótido en la posición 29 en SEC ID No: 69 del sitio de iniciación de la transcripción putativo del promotor del gen de HTRA1 en seres humanos; y

(b) determinar si está presente en el ADN una variación de la secuencia de tipo salvaje de la región del promotor del gen de HTRA1, en el que la presencia de la variación indica que el individuo tiene riesgo de desarrollar o progresión de degeneración macular relacionada con la edad;

siendo dicha variación una base nucleotídica distinta de una G en la posición 29 en SEC ID No: 69.

2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha variante corresponde a un polimorfismo de un solo nucleótido (G → A) en la posición 29 en SEC ID No: 69 (rs11200638).

3. El método de la reivindicación 1 o reivindicación 2, que comprende además determinar en la muestra la presencia o ausencia de una variación adicional en un gen que está correlacionado con la aparición de degeneración macular relacionada con la edad en seres humanos, en el que la variación adicional es distinta de la variación en la región reguladora no codificante en dirección arriba de la posición +1 del sitio de transcripción putativo de un gen de HTRA1 humano.

4. El método de la reivindicación 3, en el que la variación adicional se detecta usando una segunda sonda que se hibrida a la variación adicional.

5. El método de la reivindicación 3, en el que la variación adicional se detecta usando un segundo conjunto de cebadores que se hibridan a cualquier lado de la variación adicional.

6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que la variación adicional es la presencia de histidina en la posición 402 de la proteína de CFH humana, que corresponde al SNP rs1061170, y/o la presencia de un aminoácido distinto de alanina en la posición 69 de la proteína humana LOC387715, por ejemplo serina, que corresponde a SNP rs10490924.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el individuo es un individuo asiático.

8. Un kit de diagnóstico para detectar un gen de HTRA1 variante en una muestra procedente de un individuo, que comprende al menos un medio de recipiente y una etiqueta y/o instrucciones para uso en el kit de diagnóstico en la detección de un gen de HTRA1 variante en una muestra, en el que dicho medio de recipiente tiene en él:

(a) una sonda polinucleotídica que se hibrida, en condiciones restrictivas, a una primera variación en la región reguladora no codificante en dirección arriba de la posición +1 del sitio de transcripción putativo del gen de HTRA1 humano que está correlacionado con la aparición de degeneración macular relacionada con la edad en seres humanos; o

(b) una sonda polinucleotídica que se hibrida, en condiciones restrictivas, adyacente a un lado de una variación en la posición 29 en SEC ID No: 69 de la región de promotor del gen de HTRA1 humano que está correlacionado con la aparición de degeneración macular relacionada con la edad en seres humanos, y opcionalmente un segundo cebador polinucleotídico que se hibrida, en condiciones restrictivas, al otro lado de la variación en la posición 29 en SEC ID No: 69;

en el que el kit comprende además una segunda sonda o par de cebadores que detecta en la muestra la presencia o ausencia de una variación adicional que está correlacionada con la aparición de degeneración macular relacionada con la edad en seres humanos, y en el que dicha primera variación es una base nucleotídica distinta de una G en la posición 29 en SEC ID No: 69, y dicha variación adicional es la presencia de histidina en la posición 402 de la proteína de CFH humana, correspondiente al SNP rs 1061170 y/o la presencia de un aminoácido distinto de alanina en la posición 69 de la proteína LOC387715, por ejemplo serina, que corresponde a SNP rs10490924.

9. Una composición para uso en un método para tratar degeneración macular relacionada con la edad, que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un anticuerpo biespecífico, monocatenario, quimérico, humanizado o humano que se une al polipéptido de HTRA1, o un anticuerpo específicamente reactivo con el polipéptido de HTRA1, en la que la unión del anticuerpo al polipéptido de HTRA1 reduce la actividad del polipéptido de HTRA1.

Figura 1:

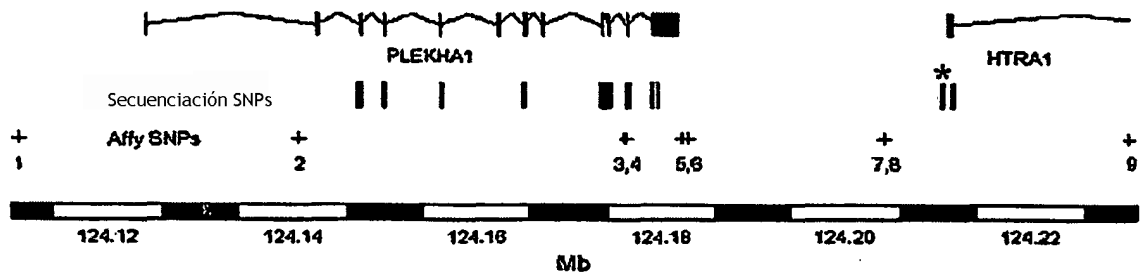


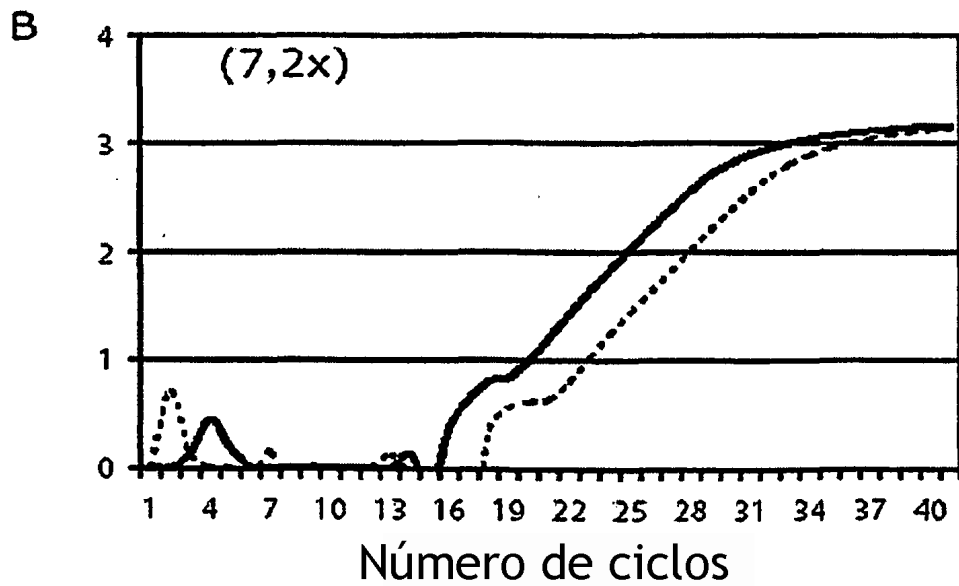
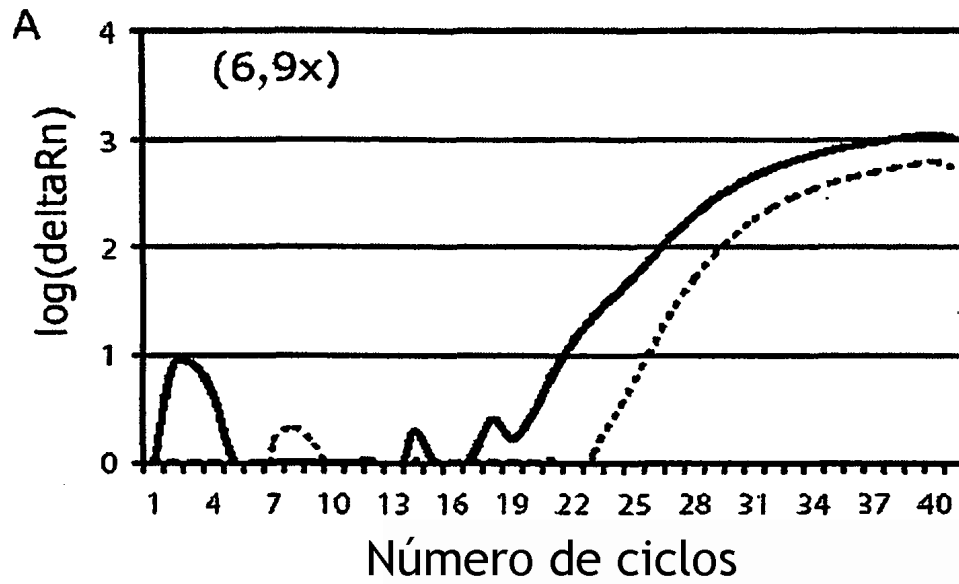
Figura 2:

Figura 3:

-512 en ser humano, -407 en ratón

GCCAGCTCCGCGGACGCTGCCTTCGTCCGGCCGCAGAGGCCCGCGGTCA GCCAGTCCTGCTGACGCTGCCTTCCCACGGCGGCGTCAAGTTCACAGCCA	ser humano ratón	(SEC ID nº 69) (SEC ID nº 70)
***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * *		

Figura 4:

