

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 897**

21 Número de solicitud: 201131516

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G06F 19/24** (2011.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**20.09.2011**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**04.04.2013**

71 Solicitantes:

**SEGUGEN, S.L. (66.0%)**  
**PLAZA AMÉRICA ESPAÑOLA, Nº2**  
**28028 MADRID ES;**  
**UNIVERSIDAD DE NAVARRA (16.0%) y**  
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES**  
**CIENTÍFICAS (CSIC) (18.0%)**

72 Inventor/es:

**RODRÍGUEZ DE CÓRDOBA, Santiago;**  
**MARTÍNEZ BARRICARTE, Rubén;**  
**GARCÍA LAYANA, Alfredo;**  
**FERNÁNDEZ ROBREDO, Patricia;**  
**RECALDE MAESTRE, Sergio;**  
**PÉREZ PÉREZ, Julián;**  
**OLAVARRIETA SCAPPINI, Luz Leticia y**  
**VIÑUELA SÁNCHEZ, Antonio**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

54 Título: **MÉTODO PARA LA PREDICCIÓN DEL RIESGO DE DESARROLLAR LA ENFERMEDAD DE DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA**

57 Resumen:

Método para predecir el riesgo de desarrollar la enfermedad de degeneración macular asociada a la edad en población caucásica española que se caracteriza porque se utilizan para el cálculo marcadores genéticos prevalentes en población afectada por dicha enfermedad en relación a población sana.

ES 2 399 897 A1

## **DESCRIPCIÓN**

### **MÉTODO PARA LA PREDICCIÓN DEL RIESGO DE DESARROLLAR LA ENFERMEDAD DE DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA**

#### **5 SECTOR DE LA TÉCNICA**

La presente invención se encuentra dentro de los sectores sanitario, biotecnológico, bioquímico, y químico-farmacéutico. El objeto de la invención es un método de predicción del riesgo de desarrollar la enfermedad de degeneración macular asociada a la edad en la población caucásica española, basado en el uso marcadores genéticos. Podrá ser aplicado en investigaciones básicas o aplicadas en biología molecular, bioquímica, biotecnología, genética o en la práctica clínica para diversos fines.

#### **ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR**

La degeneración macular asociada a la edad (en lo sucesivo DMAE) es la causa más común de deficiencia visual en la población de edad avanzada, es una de las enfermedades graves que afectan a casi el 10% de los caucásicos mayores de 75 años.

En población española, el 4,2 % de las personas mayores de 60 años padece DMAE al menos en un ojo. En el año 2005, 311.000 españoles, mayores de 55 años, padecían DMAE. Debido al progresivo envejecimiento de la población se estima que en el año 2025 este número se elevará a 565.000 personas (Damián et al. (2006) Aten. Prim. 38:51-57).

El notable progreso que se está haciendo en la búsqueda de tratamientos para la DMAE ha puesto de manifiesto la necesidad de mejorar los métodos para identificar individuos en riesgo de desarrollar esta enfermedad en estados presintomáticos o muy tempranos de la enfermedad, para que estas personas puedan ser controladas a fin de retrasar, detener o revertir la aparición de la enfermedad.

La DMAE es una enfermedad compleja en la que factores genéticos y ambientales contribuyen a su desarrollo. Se han realizado muchos esfuerzos para identificar los marcadores genéticos que pudieran ser utilizados para predecir el riesgo de aparición de DMAE y medir su progresión (Klein et al. (2005) Science 308: 385-389; Haines et al. (2005) Science 308:419-421; Edwards et al. (2005) Science 308:421-424; Hughes et al. (2006) Nat. Genet. 38:1173- 1177 (2006); Jakobsdottir et al. (2005) Am. J. Hum. Genet. 77:389-407; Gold et al. (2006) Nat. Genet. 38:458-462; Yates et al. (2007) N. Engl. J. Med. 357:553-556; Ross et al. (2007) Expert. Rev. Ophthalmol. 2:443-457). Entre los

marcadores genéticos mejor conocidos por su contribución al desarrollo de la enfermedad están:

- El gen *CFH* (cromosoma 1q32, Gen ID 3075)
- El factor B del complemento (cromosoma 6p21.3, Gen ID 629)
- 5 - El componente 2 (C2) del complemento (cromosoma 6p21.3, Gen ID 717)
- El gen *PLEKHAI/ARMS2/HtrA1/LOC387715* (cromosoma 10q26, Gen ID 387715/5654/59338)

Aunque se han encontrado asociaciones de DMAE con otros marcadores genéticos  
 10 adicionales, incluyendo por ejemplo APOE, ELOVL4, TLR4 y otros (Schultz et al. (2003) Arch Ophthalmol 121:679–683; Ayyagari et al. (2001) Ophthalmic Genet. 22:233-239; Cho et al. (2009) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 50:5614–5618), no se han contrastado consistentemente en otros trabajos, y por lo tanto, se necesitan más estudios antes de que estos marcadores puedan ser usados para predecir riesgo de desarrollar DMAE.

15 Basándose en el conocimiento previo sobre los marcadores genéticos descritos en algunas de las publicaciones anteriormente señaladas, se han desarrollado sistemas de predicción de riesgo de padecer DMAE que analizan de forma individualizada o en combinación distintos polimorfismos. Entre estos sistemas de predicción se pueden destacar los descritos en los documentos: WO/2005/083126, WO/2006/088950,  
 20 WO/2006/096737, WO/2006/133295, WO/2007/044897, WO/2007/095185, WO/2007/120975, US/2008/025500 WO/2008/008986, WO/2008/013893, WO/2008/110824, WO/2009/105757, WO/2010/075519, WO/2011/039650.

Además de los polimorfismos de nucleótido único (también referido en la presente memoria como polimorfismos de nucleótido simple o por su acrónimo inglés SNP –Single Nucleotide Polymorphism–), se han descrito regiones cuya delección afecta al riesgo de  
 25 padecer DMAE. En este sentido, se ha descrito que la delección de la región de los genes *CFHR1-CFHR3* (del~~CFHR3-CFHR1~~) es un factor de protección de la enfermedad (Hughes et al. (2006) Nat. Genet. 38:1173-1177). En relación a dicha delección, se ha descrito que está en desequilibrio de ligamiento con un polimorfismo del intrón 12 del gen *CFH*, rs  
 30 6677604, (Gharavi et al. (2011) Nat Genet. 43:321-327).

En relación a los métodos de predicción conocidos en el estado de la técnica, es importante señalar que el éxito del análisis de riesgo basado en marcadores genéticos está estrechamente relacionado con poblaciones concretas. Por consiguiente, para predecir con precisión el riesgo en un individuo es necesario establecer los marcadores adecuados y su

implicación en la determinación del riesgo asociado a su presencia o ausencia para la población a la que pertenezca el individuo (Friedman et al. (2004) Arch. Ophthalmol. 122:564-572). En concreto, ninguno de los métodos conocidos puede predecir con precisión el riesgo de padecer DMAE en población caucásica española puesto que ninguno de ellos se ha validado sobre esta población.

En este mismo sentido, no todos los marcadores genéticos proporcionan la misma precisión en la predicción del riesgo de padecer una enfermedad en cada población y por lo tanto es importante elegir una adecuada combinación de marcadores para cada población a la hora de establecer el algoritmo predictivo (Seldin et al. (2006) PlosGenetics 2:e143). Ninguno de estos métodos de predicción de riesgo de desarrollar DMAE descritos hasta la fecha combina las mutaciones puntuales con las mutaciones de delección y, por lo tanto, tienen una capacidad de predicción de riesgo más limitada.

La mayoría de los métodos de predicción de riesgo de DMAE descritos hasta la fecha se basan en procedimientos experimentales que detectan las variantes de forma individualizada y por consiguiente, son muy laboriosos y costosos. Solo algunos de los sistemas descritos permiten la detección múltiple de mutaciones puntuales mediante la hibridación de cebadores específicos en sistemas de micromatrices, pero que tienen el inconveniente de ser algo menos precisos.

Por consiguiente, la invención que se desvela en este documento pretende solventar aquellas desventajas que presentan todos los métodos de predicción del riesgo de desarrollar DMAE conocidos hasta el momento, como son: (a) el hecho de no ser completamente fiables en población caucásica española para la cual no han sido contrastados específicamente, y (b) el hecho de ser bastante tediosos, costosos y no siempre suficientemente precisos.

25

## **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

En la presente invención se demuestra la eficacia predictiva de un nuevo método basado en marcadores genéticos de DMAE específicamente contrastados en población caucásica española.

Por un lado, se basa en que por primera vez se demuestra que el desequilibrio de ligamiento entre rs6677604 y delCFHR3-CFHR1 en población caucásica española es completo, como pone de manifiesto un análisis de estos dos polimorfismos en 166 muestras de individuos de dicha población, lo que permite utilizar el polimorfismo

rs6677604 para la predicción del riesgo de desarrollar DMAE en sustitución de la delección delCFHR3-CFHR1.

Por otro lado, se basa en los resultados de otros estudios que se describen en la presente memoria, que han permitido demostrar por primera vez que la variante CFHR1\*A de la proteína CFHR1 está fuertemente asociada con el desarrollo DMAE. Hay que señalar que, recientemente, se ha descrito la existencia de varios polimorfismos en el gen CFHR1 que se combinan en dos grupos para definir dos variantes de la proteína CFHR1 denominadas CFHR1\*A y CFHR1\*B. En particular, la variante CFHR1\*B se ha relacionado con predisposición al síndrome hemolítico urémico (Abarategui-Garrido et al. Blood (2009) 114:4261-4271). Sin embargo, no se ha descrito previamente la implicación de aquellos polimorfismos que definen las variantes CFHR1\*A y CFHR1\*B con DMAE y, por lo tanto, estos polimorfismos no se han utilizado hasta la fecha para predecir el riesgo de desarrollar DMAE. En consecuencia, la variante CFHR1\*A puede ser utilizada como un nuevo marcador de riesgo de esta enfermedad, sustituyendo a otros previamente utilizados y simplificando el método predictivo.

Asimismo, la presente invención presenta como novedad la utilización de un procedimiento de detección múltiple de polimorfismo mucho más seguro y menos laborioso que los habitualmente empleados en los métodos de predicción de riesgo de DMAE conocidos hasta la fecha, que como se mencionaba anteriormente resultan más costosos y menos precisos. En la presente invención, el procedimiento de detección múltiple es el método PCR multiplex seguido de minisequenciación (Syvänen et al. (1990) Genomics 8:684-692). Sin embargo, a pesar de las ventajas que presenta, requiere para su puesta a punto de un desarrollo experimental más largo e impredecible, puesto que puede ocurrir que no se encuentren las condiciones adecuadas para llevarlo a cabo. Esto implica que el uso de este método de minisequenciación y su puesta a punto requieran de una enorme actividad inventiva.

Como resultado de lo anterior, este nuevo método que aquí se describe aporta además del uso de un nuevo marcador genético en DMAE, una tecnología innovadora para la detección simultánea de SNPs basada en la tecnología de PCR múltiple (también referida en la presente memoria como PCR multiplex) y de minisequenciación.

Consecuentemente, la presente invención proporciona un nuevo método muy preciso de predicción de riesgo de desarrollar DMAE para individuos españoles de raza caucásica mediante la detección de polimorfismos en varios genes de su genoma.

El riesgo "relativo" de una persona de desarrollar DMAE se refiere al hecho de que algunas personas son más propensas a desarrollar DMAE que otras. Estas diferencias en la predisposición individual a DMAE se deben en gran medida a la constitución genética de los individuos.

5           La presente invención incluye la preparación de una muestra de DNA a partir de una muestra biológica de un individuo previamente obtenida y la detección de variaciones (cambios en la secuencia de DNA) en distintos genes asociados con DMAE. La presencia de variaciones en estos genes que se den preferentemente en individuos sanos (controles) o en pacientes con DMAE indica que los portadores tienen menor o mayor probabilidad de  
10 desarrollar DMAE respecto a la media de la población.

De acuerdo con la presente invención, un grupo de control negativo incluye a personas sanas que no padecen DMAE y un grupo control positivo incluye a los pacientes con DMAE. Se puede determinar, basado en estos grupos, si un gen potencialmente interesante para detectar predisposición a DMAE tiene o no variantes genéticas que  
15 muestren diferencias significativas en sus frecuencias entre los grupos control en población española. Si el gen es considerado útil en el análisis de predisposición a DMAE en población española, se puede también calcular la contribución específica que cada combinación de variantes en ese gen aporta a la predisposición individual total a DMAE. La predisposición individual total a DMAE será el sumatorio de las contribuciones de cada  
20 combinación de variantes que lleva el individuo en cada uno de los genes incluidos en el análisis. En este estudio se han usado datos procedentes de muestras de ADN extraídas de 191 individuos sanos (grupo control negativo) y 259 individuos que padecían DMAE (grupo control positivo).

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método de predicción de  
25 riesgo de padecer degeneración macular asociada a la edad en población caucásica española que comprende los siguientes pasos:

- a. determinar en una muestra de DNA (o ADN) un genotipo que comprende un conjunto de polimorfismos de nucleótido simple (SNP) marcador de dicha degeneración macular,
- 30 b. calcular un valor de probabilidad de padecer degeneración macular asociada a la edad mediante un algoritmo que comprende escoger al menos un parámetro dependiente de dicho genotipo previamente determinado, donde dicho parámetro escogido se selecciona de un conjunto de parámetros que han sido expresamente calculados para población caucásica española.

En el ámbito de la presente invención, el término polimorfismo de nucleótido simple marcador se refiere a una de las dos bases posibles que se sitúan en una posición definida del genoma humano, y se denomina rs (Reference SNP)

5 En el ámbito de la presente invención, el término genotipo se refiere al conjunto de información relativo a las variantes de polimorfismo de nucleótido simple, rs.

En una realización preferida, la muestra de DNA se obtiene por extracción de DNA de una muestra biológica previamente obtenida.

10 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para extraer DNA a partir de una muestra biológica. Tal como se utiliza en este documento, una "muestra biológica" se refiere a una muestra de tejido o líquido aislado de un individuo, incluyendo pero no limitado a, por ejemplo, sangre, plasma, suero, la biopsia del tumor, orina, heces, esputo, mucosa bucal, líquido cefalorraquídeo, líquido pleural, secreciones del pezón, líquido linfático, secciones externas de la piel, respiratorias, intestinales, y de las vías genitourinarias, las lágrimas, la saliva, las células (incluyendo pero no limitado a las 15 células de la sangre).

De manera preferida, dicha muestra de DNA se obtiene por extracción de DNA de una muestra biológica que se selecciona del grupo compuesto por: una muestra de sangre, una muestra de saliva y una muestra de mucosa bucal.

20 En un primer ejemplo de realización se extrae el DNA a partir de la sangre como muestra biológica.

En un segundo ejemplo realización, se extrae DNA a partir de la saliva como muestra biológica.

En un tercer ejemplo realización, se extrae DNA a partir de la mucosa bucal como muestra biológica.

25 De manera particular, este proceso de extracción de ADN de las muestras biológicas se puede realizar de forma manual o de forma automática mediante la utilización de un robot específico para la extracción de ADN.

30 Se ha llevado a cabo un estudio de la relación existente en la población caucásica española entre el polimorfismo del intrón 12 del gen *CFH* (rs6677604), alelo A, con la delección del *CFHR3-CFHR1*, que ya había sido descrita en otras poblaciones. El objeto de dicho estudio es confirmar si puede ser utilizado para la predicción de riesgo de padecer DMAE en sustitución de la delección del *CFHR3-CFHR1*. Para comprobar esta hipótesis se utilizaron parte de los ADN extraídos según se describe anteriormente de individuos afectos y sanos dentro del grupo de estudio, en concreto 166 individuos previamente

caracterizados para la delección. Esta caracterización previa de la delección se hizo mediante la técnica MLPA, amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación, (“Multiplex ligation-dependent probe amplification”) y la detección de los alelos del rs6677604 por RT-PCR mediante sondas TaqMan (Applied BioSystems). Los resultados de dichos análisis demostraron que efectivamente la hipótesis era correcta, existiendo una correlación total entre la delección y el alelo A del rs6677604 en la población estudiada, y por tanto que dicho marcador SNP podía ser utilizado por primera vez en el cálculo del riesgo de desarrollar DMAE en lugar de la delección delCFHR3-CFHR1.

RT-PCR, como se usa aquí, se refiere a PCR en tiempo real o PCR cuantitativa.

Asimismo, en la presente invención se analiza la relación que existe entre las variantes alélicas CFHR1\*A, CFHR1\*B y delCFHR3-CFHR1 (denominada aquí como alelo CFHR1\*C) de la proteína CFHR1, con el riesgo de desarrollar DMAE en población española. Para comprobar la hipótesis de si este marcador podía ser utilizado para predecir el riesgo de desarrollar DMAE se usaron las muestras del grupo de estudio citado anteriormente. En total se genotiparon 191 individuos sanos y de 259 afectos, secuenciando las regiones exónicas de *CFHR1* y *CFHR3*. Los resultados de dichos análisis demostraron que efectivamente la hipótesis inicial era correcta y que dicho marcador podía ser utilizado por primera vez en la predicción de DMAE, siendo la variante CFHR1\*A, rs388862, alelo G, un factor de riesgo y la variante CFHR1\*C un factor protector. En concreto, como se puede observar en la tabla 1, los valores OR obtenidos, Odds Ratio (también denominado razón de posibilidades), 2,085 para CFHR1\*A, en relación al desarrollo de DMAE, es equivalente a los del alelo p.402H (también referido en la presente memoria como 402-HIS) de *CFH*, rs1061170, OR de 2,267, una de las primeras variantes descritas con más peso asociadas a DMAE, (Klein et al (2005) Science 308: 385-389).

En la presente invención, “genotipar” se refiere a identificar cada una de las variantes del rs estudiado, es decir conocer las bases que porta el individuo.

Los valores OR, u Odds Ratio, como aquí se usa, se refiere a la relación  $OR = \frac{\text{número de afectados de DMAE que portan el marcador} / \text{número de afectados de DMAE que NO portan el marcador}}{\text{número de controles que portan el marcador} / \text{número de controles que NO portan el marcador}}$ .



Tabla 1. Valores OR en relación al desarrollo de DMAE asociados al alelo p.402HIS de *CFH* y al alelo CFHR1\*A de *CFHR1*.

Gen	Alelo	P-value	OR	95% IC
<b>CFH</b>	402-HIS	<0,0001	2,267	1,713-2,997
<b>CFHR1</b>	CHFR1*A	<0,0001	2,085	1,592-2,729

El estudio en conjunto de los dos SNPs, rs388862 y rs6677604, permite una completa caracterización del locus *CFHR1* en cuanto a la determinación de las tres variantes alélicas CFHR1\*A, CFHR1\*B y CFHR1\*C, aportando una herramienta muy poderosa para valorar predisposición a DMAE que no había sido descrita hasta la fecha.

Utilizando estos dos nuevos hallazgos, una realización de la presente invención estudia el riesgo de padecer DMAE en distintos individuos utilizando los polimorfismos de nucleótido simple (SNP) que combinan uno o dos de los dos nuevos marcadores con otros marcadores ya conocidos, según se describe en la tabla 2, utilizando las muestras de ADN extraídas según se describe anteriormente.

Tabla 2. SNPs incluidos en el estudio de riesgo de desarrollar DMAE.

GEN	Cambio de NT (NUCLEÓTIDO)	Cambio de aa (aminoácido)	rs
<i>CFH-E2</i>	c.184 G>A	p.I62V	rs800292
<i>CFHI-12</i>	c.1696+2019 G>A	-	rs6677604
<i>CFB-E1</i>	c.26 T>A	p.L9H	rs4151667
<i>CFB-E2</i>	c.94 C>T	p.R32W	rs12614
<i>CFB-E2</i>	c.95 G>A	p.R32Q	rs641153
<i>LOC387715</i>	c.205 G>T	p.A69S	rs10490924
<i>CFHR1</i>	c.523 G>C	p.E175Q	rs388862

15

Polimorfismo de nucleótido simple o “SNP” como se usa aquí, se refiere a un cambio de un nucleótido en una posición concreta del genoma, coexistiendo en la población ambas variantes.

En otra realización preferida, el genotipo a determinar comprende un polimorfismo (SNP) que comprende rs388862.

En otra realización preferida, el genotipo a determinar comprende un conjunto de polimorfismos (SNP) que comprende rs6677604 y rs388862.

En otra realización preferida, el genotipo a determinar comprende un conjunto de polimorfismos (SNP) que comprende rs6677604, rs388862, rs800292, 10490924, rs4151667, rs12614 y rs641153.

5 Por otra parte, en la presente invención, se proporciona un método para amplificar específicamente mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) unas regiones concretas del ADN del genoma humano, extraído como se indica anteriormente, gracias a la utilización de cebadores específicos. A estas regiones amplificadas se les denomina amplicones.

10 "Cebador" como se usa aquí, se refiere a un oligonucleótido de cadena simple producido sintéticamente que, cuando se coloca en el lugar apropiado, es capaz de actuar funcionalmente como un iniciador de la síntesis de ácidos nucleicos. Los oligonucleótidos se preparan generalmente por medio de síntesis. El cebador puede variar en longitud en función de las condiciones particulares y la exigencia de la aplicación. Por ejemplo, en aplicaciones de diagnóstico, el cebador tiene típicamente de 15 a 25 o más nucleótidos de  
15 longitud.

El término "oligonucleótidos," como se usa aquí, se refiere a cebadores y sondas de la presente invención, y se define como una molécula de ácido nucleico compuesto de dos o más desoxirribonucleótidos, preferiblemente más de tres. El tamaño exacto del oligonucleótido dependerá de diversos factores y de la aplicación particular y el uso de los  
20 oligonucleótidos.

El término "amplificación" se refiere a al uso de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa "PCR" para obtener un gran número de copias de regiones concretas del genoma usando cebadores específicos.

25 En una realización preferida de la presente invención la determinación del genotipo comprende las siguientes etapas:

- c. una amplificación de la muestra de DNA con una primera combinación de cebadores mediante una técnica de PCR múltiple,
- d. una determinación de SNPs de dicha muestra de DNA amplificada con una segunda combinación de cebadores específicos mediante una técnica de minisequenciación.

30 En dicha etapa de amplificación por PCR se pueden utilizar cebadores que amplifican las regiones del genoma humano que se muestran en la tabla 3 y como molde el DNA obtenido a partir de las muestras biológicas antes extraído. Estas regiones contienen los SNPs mostrados en la tabla 2.

Tabla 3. Regiones del genoma humano amplificadas por PCR

Gen	Amplicón	Coordenadas cromosómicas [Ensembl Human (GRCh37)]
<i>CFH</i>	FH-E2	Cr:1/196642054-196642342
<i>CFH</i>	FH-I12	Cr:1/196686418-196687418
<i>CFB</i>	FB-E1-2	Cr:6/31913934-31914716
<i>LOC387715</i>	LOC387715	Cr:10/124214344-124214505
<i>CFHR1</i>	CFHR1-E4	Cr:1/196796792-196797792

En un modo de realización preferido de la realización anterior, dicha primera combinación de cebadores de la etapa c de amplificación comprende al menos los cebadores de secuencias SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 3, SEQ ID No: 4, SEQ ID No: 5, SEQ ID No: 6, SEQ ID No: 7, SEQ ID No: 8, SEQ ID No: 9 y SEQ ID No: 10.

Es decir, se realiza la amplificación de regiones específicas del genoma humano utilizando todos los cebadores de la tabla 4 en la misma reacción generando lo que se denomina una amplificación de PCR múltiple o una PCR multiplex. Este método multiplex de amplificación ahorra tiempo y simplifica las operaciones del diagnóstico, lo cual supone una enorme ventaja competitiva con respecto a los métodos de amplificación individuales. El problema técnico que hay que salvar y que por lo tanto no resulta evidente en el estado de la técnica y requiere de una alta actividad inventiva, es que para que la reacción múltiple se pueda llevar a cabo hay que seleccionar los cebadores para que todos puedan funcionar a la misma temperatura de anillamiento en la reacción de PCR manteniendo una alta especificidad por las secuencias complementarias y evitando así que se produzcan amplificaciones inespecíficas y por consiguiente erróneas.

El término "complementarias" se refiere al amplio concepto de la complementariedad de secuencia entre las regiones de las dos hebras de un ácido nucleico o entre dos regiones de la hebra del ácido nucleico.

La generación de una reacción de PCR multiplex no siempre es posible y adquiere mayor complejidad y dificultad cuanto mayor es el número de cebadores que se han de utilizar al mismo tiempo, como es el caso de la presente invención en la que se utilizan hasta 10 cebadores en la misma reacción de amplificación.

La expresión "temperatura de anillamiento" se refiere a la temperatura a la cual dentro de la reacción de PCR se realiza el proceso de hibridación de los cebadores.

Tabla 4. Secuencia de los cebadores utilizados para la amplificación por PCR Multiplex

NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA CEBADOR	NUMERO SEQ ID
FH-E2-F	ACTGTACATTTAAATAGACACTTTTATGCAC	SEQ ID No: 1
FH-E2-R	ATTTTACACCTAGTTTTTCATAAATTTTCAC	SEQ ID No: 2
FH-I12-F	GAAAGTTGTGCACTGAAGGGAT	SEQ ID No: 3
FH-I12-R	CACCTGTCACAAGGTTGTAAGC	SEQ ID No: 4
FB-E1-2-F	AAGCAAAGCAAGCCAGGACACACCATC	SEQ ID No: 5
FB-E1-2-R	TCTCGGAGACCATGTCACTGAGAAACAG	SEQ ID No: 6
Loc387715-F	TTTCCACTCTGCGAGAGTCTGTGCTGG	SEQ ID No: 7
Loc387715-R	TCTGGGTTCCAGCAGGAGAGAAGAAGG	SEQ ID No: 8
CFHR1PA-F	AACATCAAAGCTTGTACCTGACAAA	SEQ ID No: 9
CFHR1PA-R	TGTGTTCTGTTACAGGAAGAATTG	SEQ ID No: 10

Una vez obtenida la mezcla de las regiones de DNA amplificadas mediante la reacción multiplex de PCR se procede a eliminar todos los cebadores y desoxinucleotidos sobrantes mediante una reacción con la mezcla de las enzimas exonucleasa I y fosfatasa alcalina. Los cebadores y desoxinucleotidos sobrantes se tienen que eliminar porque de no ser así interferirán con los siguientes pasos del método de diagnóstico. El uso de estas enzimas elimina las tediosas y poco eficientes etapas de purificación de las regiones amplificadas por PCR multiplex.

Otro aspecto que aumenta la dificultad del método de la presente invención, es que al realizar una amplificación multiplex de las regiones del genoma que contienen los polimorfismos de secuencia que se quieren analizar, implica que dicho análisis haya que realizarlo sobre el conjunto de las regiones amplificadas, y no de forma individualizada como se suele hacer tradicionalmente.

En este sentido, la determinación múltiple de polimorfismos de secuencia puede llevarse a cabo utilizando la tecnología denominada de minisequenciación de ADN. Esta tecnología se basa en el uso de dideoxinucleótidos, en adelante denominados ddNTPs, marcados fluorescentemente, de manera específica según sea un ddNTP de adenina, guanina, citosina o timina, como única fuente de sustrato para la DNA polimerasa, de modo que solo el ddNTP adyacente al extremo 3' del cebador de secuenciación se incorpora. De este modo, dicho cebador queda marcado de manera específica según el ddNTP que se incorpore.

La tecnología de minisequenciación utilizada en esta invención esencialmente consiste en diseñar unos cebadores específicos de secuencia que puedan ser utilizados en una reacción de extensión del cebador para generar fragmentos de DNA de cadena simple marcados por la incorporación del ddNTP marcado. Estos fragmentos de DNA pueden ser posteriormente analizados mediante electroforesis capilar utilizando un secuenciador de DNA.

Así por ejemplo, la etapa b de de determinación de SNPs puede comprender las siguientes etapas:

- e. una reacción de extensión de dicha segunda combinación de cebadores específicos de secuencia con al menos un dideoxinucleótido marcado, mediante tratamiento de dicha muestra de DNA amplificada con una mezcla de dicha segunda combinación de cebadores específicos de secuencia y con una mezcla de dideoxinucleótidos de adenina, citosina, guanina y timina marcados, por ejemplo fluorescentemente, de manera selectiva,
- f. añadir fosfatasa alcalina una vez finalizada la reacción de extensión,
- g. registrar una electroforegrama mediante electroforesis capilar.

Para analizar la mezcla originada por la minisequenciación se procede primero a eliminar como en el caso anterior los ddNTPs sobrantes mediante el uso de fosfatasa alcalina. Los ddNTPs sobrantes se tienen que eliminar porque de no ser así interferirán con el siguiente paso del método de diagnóstico. El uso de esta enzima elimina las tediosas y poco eficientes etapas de purificación de las regiones sometidas a la reacción de minisequenciación antes de que las muestras sean sometidas la electroforesis capilar.

Dicha muestra de minisequenciación tratada enzimáticamente puede ser separada en secuenciador capilar. El resultado del análisis se muestra en la forma de un electroforegrama como el que se presenta a modo de ejemplo en la figura 1.

En otro modo de realización preferido, dicha segunda combinación de cebadores específicos de secuencia de la etapa de determinación de SNPs comprende al menos los cebadores de secuencias SEQ ID No: 11, SEQ ID No: 12, SEQ ID No: 13, SEQ ID No: 14, SEQ ID No: 15, SEQ ID No: 16 y SEQ ID No: 17. Es decir, los cebadores utilizados en la reacción del minisequenciación son al menos todos los que se muestran en la tabla 5. Estos cebadores pueden determinar la presencia de un determinado nucleótido adyacente al extremo 3' del cebador en la mezcla de las regiones amplificadas por PCR mediante la incorporación del ddNTP marcado correspondiente.

Tabla 5. Secuencia de los cebadores utilizados en la minisequenciación.

<b>NOMBRE CEBADOR</b>	<b>SECUENCIA CEBADOR</b>	<b>NUMERO SEQ ID</b>
FH-E2* (R)	GATCGATCGTCCCTTCCTGCATACCATTTATTA	SEQ ID No: 11
FB-E2* c.95 (R)	GATCGATCGATCGATCGATCGAGAGAGCAGGATCCCTGG GGC	SEQ ID No: 12
FH-I12* (R)	GATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCACAGTAGCTGT GAGTCCTTTCC	SEQ ID No: 13
FB-E2* c.94	GATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCGATACC ACTCCATGGTCTTTGGCC	SEQ ID No: 14
FHR-HAP-A-F*	CGATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCC ATCTGGTGAGAGAGTACGTTAT	SEQ ID No: 15
FB-E1*	CGATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCG ATCGATCGAGCAATCTCAGCCCCCAAC	SEQ ID No: 16
Loc387715*	GATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCGATCGA TCGATCGATCGATTACACTCCATGATCCCAGCT	SEQ ID No: 17

5 En otro modo de realización particular, los cebadores seleccionados tiene longitudes distintas, de tal manera que los fragmentos resultantes de la reacción de minisequenciación tienen también longitudes directamente proporcionales a la longitud de los cebadores y por lo tanto, los múltiples fragmentos derivados de cada muestra biológica analizada podrán ser separados y diferenciados todos juntos en un único capilar mediante la electroforesis capilar. Esto supone una ventaja sustancial en relación a otros procedimientos convencionales que implican la identificación individualizada en distintos capilares de cada uno de los polimorfismos. La dificultad técnica que hay que salvar mediante la actividad inventiva es doble, ya que por una parte, hay que seleccionar cebadores específicos que como en el caso anterior sean capaces de extenderse utilizando la misma temperatura de anillamiento y por otra parte hay que seleccionar los cebadores para que generen unos fragmentos que puedan ser fácilmente separables y diferenciables dentro del rango de separación de tamaños de fragmentos que permite una electroforesis capilar. La presencia de fragmentos espurios a la presencia de fragmentos solapantes invalidaría el análisis.

En otro modo de realización distinto de los dos anteriores, la determinación del genotipo comprende las siguientes etapas:

- c. una amplificación de la muestra de DNA mediante una técnica de PCR múltiple con una combinación de cebadores que comprende al menos los cebadores de secuencia SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 3, SEQ ID No: 4, SEQ ID No: 5, SEQ ID No: 6, SEQ ID No: 7, SEQ ID No: 8, SEQ ID No: 9 y SEQ ID No: 10,
- d. una determinación de SNPs de dicha muestra de DNA amplificada mediante una técnica de minisequenciación con una segunda combinación de cebadores específicos que comprende al menos los cebadores de secuencias SEQ ID No: 11, SEQ ID No: 12, SEQ ID No: 13, SEQ ID No: 14, SEQ ID No: 15, SEQ ID No: 16 y SEQ ID No: 17.

Para validar el método de diagnóstico y establecer una estimación de la susceptibilidad de padecer DMAE, las muestras biológicas se han obtenido de individuos sanos y pacientes seleccionados de la población caucásica española. La selección de la población española es un elemento fundamental de esta invención puesto que los factores de riesgo de desarrollar DMAE están ligados a polimorfismos cuya frecuencia de aparición no es idéntica en todas las poblaciones y por lo tanto para el cálculo de la susceptibilidad no es apropiado utilizar los datos de otras poblaciones.

La población de pacientes estudiada es de origen español raza caucásica y por lo menos 60 años de edad, preferiblemente de 65 años, aún más preferiblemente mayores de 65.

Para determinar el conjunto de marcadores genéticos que proporciona una cobertura apropiada del componente genético de DMAE en población caucásica española, se realizó un estudio casos controles transversal (utilizando regresión logística univariable) de determinados marcadores en el que se compararon los genotipos de una muestra de pacientes españoles con DMAE con los de una muestras de individuos españoles con características de edad, genero y hábitos ajustados a los de los pacientes y con un estudio oftalmológico que descartaba patología ocular. Para el cálculo se han usado datos procedentes de muestras de ADN extraídas de 191 individuos sanos y 259 individuos que padecían DMAE

Posteriormente se aplicó sobre los polimorfismos seleccionados un análisis de regresión logística multivariable en el que se determinó la contribución individual de cada

genotipo (coeficientes de regresión, b) al riesgo de padecer DMAE de modo específico para población caucásica española, tabla 6. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS v14.0 para Windows (Chicago, IL, USA). El cálculo de las frecuencias entre grupos se realizó mediante un test de asociación Pearson's Chi-Cuadrado y se consideró estadísticamente significativo si  $p < 0.05$ . Se calculó el OR y el CI.

Tabla 6. Variables en la ecuación específicos de población caucásica española

i		Genotipo	b <sub>i</sub>	Sig (Pvalue)	Exp b <sub>i</sub> (OR)	I.C. 95% para Exp b <sub>i</sub>	
						Inferior	Superior
1	CFHR1_BB	rs388862 C/C rs6677604 G/G	0	0			
1	CFHR1_AA	rs388862 G/G rs6677604 G/G	0,608	0,106	1,837	0,879	3,836
1	CFHR1_CC	rs388862 -/- rs6677604 A/A	-1,466	0,025	0,231	0,64	0,835
1	CFHR1_AB	rs388862 G/C rs6677604 G/G	0,343	0,32	1,409	0,716	2,77
1	CFHR1_AC	rs388862 G/- rs6677604 G/A	-0,939	0,022	0,391	0,175	0,874
1	CFHR1_BC	rs388862 C/- rs6677604 G/A	-1,082	0,02	0,339	0,136	0,845
2	CFHV62I	rs800292 G/G	0	0,013			
2	CFHV62I(1)	rs800292 G/A	-0,742	0,005	0,476	0,285	0,795
2	CFHV62I (2)	rs800292 A/A	-0,782	0,162	0,457	0,153	1,368
3	LOC387715	rs10490924 G/G	0	0			
3	LOC387715(1)	rs10490924 G/T	0,911	0	2,487	1,56	3,963
3	LOC387715(2)	rs10490924 T/T	2,14	0	8,497	3,81	18,954
4	CFBL9H(1)	rs4151667 T/A	-1,186	0,014	0,305	0,118	0,788
5	CFBR32QW	rs12614 C/C y rs641153 A/A; X/X aa rs12614 T/T y rs641153 G/G; X/X aa rs12614 C/T y rs641153 G/A; X/X aa	0	0,002			
5	CFBR32QW(1)	rs12614 C/C y rs641153 G/G; R/R aa	0,471	0,397	1,602	0,538	4,764
5	CFBR32QW(2)	rs12614 C/C, y rs641153 G/A; R/X aa rs12614 C/T y rs641153 G/G; R/X aa	-0,382	0,503	0,683	0,224	2,083
	Constante a		-0,065	0,916	0,937		

Con estos coeficientes de regresión se determinó el valor de riesgo individual total (z) y la probabilidad de desarrollar DMAE según el algoritmo:

$$\text{Probabilidad} = e^z / 1 + e^z$$

donde:



$$- z = a + \sum_{i=1}^5 b_i$$

y donde:

- “a” es un valor constante, cuyo valor es  $a = -0,065$ ,
- “ $b_i$ ” es el valor b para cada uno de los polimorfismos determinado específicamente para población española según se detallan en la tabla 6.

Es decir, z es un valor que resulta de sumar un conjunto de parámetros que consiste en: a,  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$ ,  $b_4$  y  $b_5$ , donde:

I. a es un parámetro igual a un valor  $-0,065$ ,

II.  $b_1$  es un parámetro dependiente del genotipo previamente determinado cuyo valor se selecciona independientemente según la siguiente relación:

- $b_1$  es igual a 0 si dicho genotipo comprende SNP rs388862 C/C y SNP rs6677604 G/G;

- $b_1$  es igual a 0,608 si dicho genotipo comprende SNP rs388862 G/G y SNP rs6677604 G/G

- $b_1$  es igual a -1,466 si dicho genotipo comprende SNP rs388862 -/- y SNP rs6677604 A/A

- $b_1$  es igual a 0,343 si dicho genotipo comprende SNP rs388862 G/C y SNP rs6677604 G/G

- $b_1$  es igual a -0,939 si dicho genotipo comprende SNP rs388862 G/- y SNP rs6677604 G/A

- $b_1$  es igual a -1,082 si dicho genotipo comprende SNP rs388862 C/- y SNP rs6677604 G/A

III.  $b_2$  es un parámetro dependiente del genotipo previamente determinado cuyo valor se selecciona independientemente según la siguiente relación:

- $b_2$  es igual a 0 si dicho genotipo comprende SNP rs800292 G/G

- $b_2$  es igual a -0,742 si dicho genotipo comprende SNP rs800292 G/A

- $b_2$  es igual a -0,782 si dicho genotipo comprende SNP rs800292 A/A

IV.  $b_3$  es un parámetro dependiente del genotipo previamente determinado cuyo valor se selecciona independientemente según la siguiente relación:

- $b_3$  es igual a 0 si dicho genotipo comprende SNP rs10490924 G/G

- $b_3$  es igual a 0,911 si dicho genotipo comprende SNP rs10490924 G/T

- $b_3$  es igual a 2,14 si dicho genotipo comprende SNP rs10490924 T/T

V.  $b_4$  es un parámetro dependiente del genotipo previamente determinado cuyo valor se selecciona independientemente según la siguiente relación:

- $b_4$  es igual a -1,186 si dicho genotipo comprende SNP rs4151667 T/A

VI.  $b_5$  es un parámetro dependiente del genotipo previamente determinado cuyo valor se selecciona independientemente según la siguiente relación:

5

- $b_5$  es igual a 0 si dicho genotipo comprende un genotipo seleccionado entre uno del grupo compuesto por:

i. una combinación de SNP rs12614 C/C y SNP rs641153 A/A,

ii. una combinación de SNP rs12614 T/T y SNP rs641153 G/G,

10

iii. una combinación de SNP rs12614 C/T y SNP rs641153 G/A;

- $b_5$  es igual a 0,471 si dicho genotipo comprende:

iv. una combinación de SNP rs12614 C/C y SNP rs641153 G/G;

- $b_5$  es igual a -0,382 si dicho genotipo comprende un genotipo seleccionado entre uno del grupo compuesto por:

15

v. una combinación de SNP rs12614 C/C y SNP rs641153 G/A,

vi. una combinación de SNP rs12614 C/T y SNP rs641153 G/G.

20

En la presente memoria, los pares A/A, C/C, G/G, T/T, G/C (o C/G), G/A (o A/G), G/T (o T/G), T/A (o A/T), G/- (o -/G), C/- (o -/C) y -/- representa a cada uno de los pares de alelos que definen un genotipo en base a los polimorfismos de estudio. A se refiere a una base de adenina, C se refiere a una base de citosina, G se refiere a una base de guanina, T se refiere a una base de timina y el símbolo “-“ (también referido como del) se refiere a una delección delCFHR3-CFHR1.

25

Este modelo, basado exclusivamente en factores genéticos para determinar la probabilidad de desarrollar DMAE en población española, se validó mediante la técnica estadística curva ROC (Receiver Operating Characteristic) o curva de rendimiento diagnóstico resultando en una precisión notable (Área bajo la curva, AUC=79,1; Intervalo de confianza asintótica, CI, al 95%; límites inferior y superior CI, 75-83.2; índice significación, valor P,  $P < 0,001$ ; sensibilidad y especificidad ~70%) como se puede observar en la figura 2.

30

Como resultado de la aplicación de la fórmula a los resultados del análisis, los sujetos de estudio se pueden clasificar en cuartiles de la siguiente manera: riesgo muy bajo, bajo, moderado y elevado. Valores de p hasta 0,25, no incluido, determinan riesgo muy bajo, valores desde 0,25 incluido hasta 0,50, no incluido, determinan riesgo bajo, valores

de p desde 0,50 incluido hasta 0,75 no incluido determinan riesgo moderado y valores de p desde 0,75 incluido determinan riesgo elevado.

5 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

10

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**FIGURA 1.** Ejemplo de electroforegrama donde se identifican los polimorfismos SNPs usados para evaluar el riesgo genético de desarrollar DMAE. En esta figura se puede observar los picos generados en el análisis de una muestra tipo. En principio cada una de las posiciones puede dar origen a dos picos, cada uno de ellos perteneciente a unos de los dos potenciales alelos. En principio, las bases representadas son las que se incorporan y están en el sentido de la lectura, en el caso de que estén en sentido contrario las bases informativas aparecen en paréntesis. En este caso observamos picos que se desdoblaron como es el caso del SNP estudiado en el FH-I12 y FB-E2 , indicando que es una posición heterocigota, y picos únicos indicando posición homocigota en el resto, excepto en el caso de CFHR1 que puesto que el marcador CFH-I12 indica una delección solo tiene una copia. El genotipo observado en cada una de las posiciones es el siguiente: FH-E2 C/C (G/G), FB-E2 c95 C/C (G/G), FH-I12 C/T (G/A), FB-E2 c94 C/T, CFHR1 C/-, FB-E1 T/T, LOC387715 G/G.

25 **FIGURA 2.** Curva de rendimiento diagnóstico (ROC) para el algoritmo empleado para el cálculo de la probabilidad de desarrollar DMAE en población caucásica española con los marcadores genéticos seleccionados.

**FIGURA 3.** Simulación de distribución de riesgo relativo de padecer DMAE para población caucásica española mayor de 80 años en virtud del análisis de los marcadores genéticos rs800292, rs6677604, rs4151667, rs12614, rs641153, rs10490924, rs388862 .

30

**EJEMPLOS DE REALIZACION DE LA INVENCION.****EJEMPLO 1. Extracción de ADN**

La muestra biológica que se obtiene de cada individuo que se va a analizar puede ser sangre, saliva o mucosa bucal.

La extracción de ADN de sangre se realiza a partir de 200 µl de la muestra de sangre líquida, se deposita en un tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml, debidamente rotulado para su identificación. Los tubos con la muestra para su purificación se colocan en el adaptador de tubos del extractor automático QIAcube (QIAGEN). Se usa el kit QIAamp ADN Blood Mini Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Al finalizar el proceso la muestra de ADN se eluye en 30 µl de agua. El ADN se conserva refrigerado a 4°C durante el procesamiento de la muestra y a -20°C en su almacenamiento posterior.

La extracción de ADN de saliva se realiza a partir de 200 µl de la muestra de saliva líquida que se recoge previamente en un tubo colector de SalivaGene® Collection Module II (Invitex). Se depositan estos 200 µl de saliva en un tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml, debidamente rotulado para su identificación. Los tubos con la muestra para su purificación se colocan en el adaptador de tubos del extractor automático QIAcube (QIAGEN). Se usa el kit QIAamp ADN Blood Mini Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Al finalizar el proceso la muestra de ADN se eluye en 30 µl de agua. El ADN se conserva refrigerado a 4°C durante el procesamiento de la muestra y a -20°C en su almacenamiento posterior.

La muestra para la extracción del ADN de mucosa bucal se recoge mediante una torunda EPICENTRE (Catch-AII), o similar, de cada individuo a partir de su mucosa bucal durante 30 s del interior de cada mejilla, utilizando cada vez un lado distinto de la torunda. Se deja secar la torunda entre 5-10 min y luego se introduce en su estuche y se conserva a temperatura ambiente. Para procesar la muestra se corta la torunda y se introduce en un tubo tipo Eppendorf de 1.5 ml con 600 µl de tampón TNES (50 mM Tris, pH 7,5; 0.4 M NaCl; 100 mM EDTA; 0,5% SDS) precalentado a 56°C, se añaden 350 µg de proteinasa K (17.5 µl de una solución de 20 µg/µl) y se incuba a 56°C 12 horas. Posteriormente, se traspa el extracto en un nuevo tubo tipo Eppendorf de 2 ml y se purifica el ADN con el extractor automático QIAcube (QIAGEN) y el kit "QIAamp ADN Micro Kit" (QIAGEN) eluyendo la muestra de ADN en 30 µl de agua, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se conserva refrigerado a 4°C durante el procesamiento de la muestra y a -20°C en su almacenamiento posterior.

**EJEMPLO 2. Estudio de la asociación del polimorfismo del intrón 12 del gen *CFH* (rs6677604), alelo A, con la delección *delCFHR3-CFHR1* en población caucásica española.**

Para confirmar en la población objeto de estudio que el alelo A del rs6677604 y el alelo *delCFHR3-CFHR1* están en desequilibrio de ligamiento, el estudio se divide en tres partes. La primera es la caracterización por MLPA de la delección en la población objeto de estudio, la segunda la caracterización del SNP del intrón 12 del *CFH* (rs6677604) en un subconjunto de dicha población, por RT-PCR mediante el uso de sondas TaqMan y la tercera la correlación de los datos de ambas pruebas.

En la primera parte del estudio se caracterizaron los 191 sujetos sanos y 259 afectados del grupo de estudio. Las variaciones en el número de copias de *CFHR1* y *CFHR3* se analizaron por MLPA usando la mezcla comercial o mix 1 P236 A1 ARMD de MRC-Holland. Los cebadores usados en la caracterización de la región genómica que incluye la delección se recogen en la tabla 7, incluyendo los controles internos para los genes *BCAP31*, en el cromosoma X y el gen *MORF4L1*, en el cromosoma 15. Los cebadores adicionales incluidos en la prueba fueron sintetizados por Sigma-Aldrich.

La MLPA, amplificación múltiple de sondas dependiente de ligación, (“Multiplex ligation-dependent probe amplification”) es una variación de la reacción en cadena de la polimerasa que mediante el uso de sondas se puede aplicar entre otros fines para detectar el número de copias de una región genómica. Cada sonda se compone de dos oligonucleótidos que reconocen los sitios adyacentes de destino en el ADN. Sólo cuando los dos oligonucleótidos de la sonda hibridan con sus respectivas zonas complementarias pueden ser ligados. La ventaja de la división de la sonda en dos partes es que sólo los oligonucleótidos ligados, pero no la sonda de oligonucleótidos no unidos, se amplifican posteriormente con dos cebadores, uno de ellos marcado fluorescentemente. Cada sonda tiene una longitud total única, por lo que los amplicones resultantes pueden ser separados e identificados por electroforesis capilar. Al comparar el patrón de pico obtenido en una muestra dada con la obtenida en muestras diferentes de referencia se puede determinar la cantidad relativa de cada amplicón. Esta relación es una medida relativa de la cantidad la secuencia diana presente en el ADN de la muestra.

Tabla 7. Secuencia de los cebadores utilizados en la MLPA para la detección de polimorfismos de delección en la región *CFHR1-CFHR3*

Nombre (Núm. SEQ ID)	Exón	Longitud (pb)	Gen	Secuencia cebador
X-BCAP31 (SEQ ID No: 18)	Exón 6	91	<i>BCAP31</i>	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAACAGGAGCCTGA AGGCTGACCT
BCAP31-Y (SEQ ID No: 19)				pGCAGAAGCTAAAGGACGAGCTGGACTTCTA GATTGGATCTTGCTGGCAC
X-CFH1191C (SEQ ID No: 20)	Exón 23	100	<i>CFH</i>	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGACTGGACAGCC AAACAGAAGCTTTATTC
X-CFHR1191C (SEQ ID No: 21)	Exón 6	105	<i>CFHR1</i>	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGACTGACTGAGG ACAGCCAAACAGAAGCTTTATTT
CFH1191-Y (SEQ ID No: 22)				pGAGAACAGGTGAATCAGYTGAATTTGTCTA GATTGGATCTTGCTGGCAC
X-CFHL1ex2 (SEQ ID No: 23)	Exón 23	110	<i>CFHR1</i>	GGGTTCCCTAAGGGTTGGACATAGTTCGTAA TAGAAAACCTCCCCTGTAGGAACC
CFHL1ex2-Y (SEQ ID No: 24)				pTGGGAAAATGGCTTATATTTTTCTTCATCTA CTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
X-MORF4L1 (SEQ ID No: 25)	Intrón 8	119	<i>MORF4L</i>	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGATGCTCCATAA CTTAGAATGG
MORF4L1-Y (SEQ ID No: 26)				pGGTTACATCGCAATAAACCCAGAGACTGAC TGACTGACTGACTGACTGACTGACTTCTAGAT TGGATCTTGCTGGCAC
X-CFHex5 (SEQ ID No: 27)	Exón 5	125	<i>CFH</i>	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGACTGACTGACT GACTCGAGGGAATACCATTTTGGACAAGCAG TACG
CFHex5-Y (SEQ ID No: 28)				pGTTTGTATGTAACCTCAGGCTACAAGATTGAA GGCTGTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC

X-CFHL3ex3 (SEQ ID No: 29)	Exón 1	130	<i>CFHR3</i>	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGACTGACTGACT GACTGCATTGTTACTAATCAATGTCATTCTGA CCTTGTGG
CFHL3ex3-Y (SEQ ID No: 30)				pGTTTCCTGTGCTAATGGACAAGGTAAGTTAA AAGCTTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
X- CFHL3ex6 (SEQ ID No: 31)	Exón 6	135	<i>CFHR3</i>	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGACTGACTGACT GACTGACTGACTCTTCAGCATTGTTACCCTAA ATGTATGTCCAACCTTC
CFHL3ex6-Y (SEQ ID No: 32)				pCACTTTTCCACTTCTCACTCTTATGGTCTCAC GTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
X-CFHL5ex5 (SEQ ID No: 33)	Exón 5	140	<i>CFHR5</i>	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGACTGACTGACT GACTGACTGACTGACTCGCCGGCCTAAGAA AATACAATGTGTGGATG
CFHL5ex5-Y (SEQ ID No: 34)				pGAGAATGGACAACCTTACCCTTGTGTTGA GCGGACTTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC
X-CFHL2ex5 (SEQ ID No: 35)	Exón 5	145	<i>CFHR2</i>	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGACTGACTGACT GACTGACTGACTGACTGACTCGCCAACAAAA TTCATTCAATTCGAGCAAT
CFHL2ex5-Y (SEQ ID No: 36)				pGTGTCAGAAATGGGAACTGGTATATCCCAG GCGACTGACTTCTAGATTGGATCTTGCTGGCA C
X-CFHL4F (SEQ ID No: 37)	Exón 6	150	<i>CFHR4</i>	GGGTTCCCTAAGGGTTGGAGACTGACTGAGC ACACACTGATTGGTAAATTTTATCCCTACAAT G
CFHL4F-Y (SEQ ID No: 38)				pGGACTTTCTTAGTTGAGTTGTGCATCGTATG GACTGACTGACTGACTGACTGACTGACTGAC TTCTAGATTGGATCTTGCTGGCAC

Para la MLPA se parte de un ADN a una concentración de 50 ng/μl procedente de la extracción de una muestra biológica. Para preparar la reacción de MLPA se depositan 5 μl de ADN en un tubo eppendorf específico para PCR de 0,2 ml, y se somete a una desnaturalización de 5 min a 98°C en un termociclador 2720 ThermalCycler (Applied Biosystems). A continuación se prepara una mezcla maestra del kit de MLPA (EK1-MRC-Holland MLPA) que contiene 1,5 μl de tampón MLPA (MRC-Holland MLPA) 1.5 μl de

una mezcla de cebadores mostrados en la tabla 5 preparada de la siguiente manera: del stock de cada una de las sondas que está a 100 mM, se diluye a una concentración de 1 mM en un volumen final de 500  $\mu$ l. Se mezclan las sondas por parejas o en algunos casos se utilizan como sondas independientes según como indicamos: X-BCAP31 y BCAP31-Y; X-CFH-1191C; X-CFHR1191C; CFH1191-Y; X-CFHL1ex2 y CFHL1ex2-Y; X-MORF4L1 y MORF4L1-Y; X-CFHex5 y CFHex5-Y; X-CFHL3ex3 y CFHL3ex3-Y; X-CFHL3ex6 y CFHL3ex6-Y; X-CFHL5ex5 y CFHL5ex5-Y; X-CFHL2ex5 y CFHL2ex5-Y; X-CFHL4F y CFHL4F-Y, cada una de estas parejas de sondas o sondas independientes se ajusta a 100X en un volumen final de 1 ml. Para la mezcla final se toma 10  $\mu$ l de cada una de las sondas (11 sondas en total) del 100X en un tubo eppendorf y se lleva a 1 ml con tampón o buffer TE 1X. De este 1 ml de mezcla de sondas se toman 1,5  $\mu$ l, más  $\mu$ l de buffer TE 1X hasta completar 5  $\mu$ l de volumen total con el ADN (previamente desnaturalizado) a concentración final de 150 ng totales. Luego se somete la mezcla a un ciclo de reacción en el termociclador 2720 ThermalCycler (Applied Biosystems) utilizando el programa en las siguientes condiciones: 95 °C – 1 min; 60 °C – 16 h. Una vez que ha terminado la reacción se calienta la mezcla de reacción en el termociclador a 54°C y a continuación se añaden 32  $\mu$ l de la mezcla maestra para realizar la reacción de ligación que contiene 3  $\mu$ l de tampón A ligase-65 (Ligase-65 buffer A de EK1-MRC-Holland MLPA), 3  $\mu$ l de tampón B ligase-65 (Ligase-65 buffer B de EK1-MRC-Holland MLPA), 25  $\mu$ l de agua y 1  $\mu$ l de ligase-65 (Ligase-65 de de EK1-MRC-Holland MLPA). Todo ellos se somete de nuevo a 1 ciclo del termociclador C2720 ThermalCycler (Applied Biosystems) en las siguientes condiciones: 54 °C – 15 min; 98 °C – 5 min, 15 °C en pausa.

En un tubo eppendorf específico para PCR de 0.2 ml se prepara una mezcla de reacción que contiene 4  $\mu$ l de tampón PCR SALSA (EK1-MRC-Holland MLPA) y 26  $\mu$ l de agua, añadiendo a esta mezcla, 10  $\mu$ l del producto resultante de la reacción de ligación anterior.

Por otro lado se prepara una nueva mezcla maestra que contiene 2  $\mu$ l de cebadores SALSA FAM PCR primers (EK1-MRC-Holland MLPA), 2  $\mu$ l de tampón de dilución de SALSA (EK1-MRC-Holland MLPA), 5,5  $\mu$ l de agua y 0,5  $\mu$ l de SALSA Polimerasa (EK1-MRC-Holland MLPA).

Para la reacción final de PCR se mezcla 30  $\mu$ l de la mezcla de PCR+ 30  $\mu$ l de la mezcla de Polimerasa y 10  $\mu$ l de la mezcla de la ligación (que contiene el ADN y las sondas). Esto se lleva a un programa en un termociclador 2720 ThermalCycler (Applied Biosystems) en las siguientes condiciones: 60°C en pausa y se añaden los 10  $\mu$ l de la mix



generada a 10  $\mu$ L del producto de ligación anterior continuando con el programa en el termociclador en las siguientes condiciones: 35 ciclos (95°C – 30 s; 60°C – 30s, 72°C – 60 s), 72°C 20 min, 15°C indefinido.

Una vez finalizada la reacción de MLPA se procede a correr las muestras en un secuenciador automático ABI3730 (Applied Biosystems). Previamente a la carga de las muestras se añaden a 2  $\mu$ L de la muestra 0.2  $\mu$ L of marcador interno (500LIZ) y 10  $\mu$ L de formamida (ABI no. 4311320) (Applied Biosystems). El equipo genera un electroforegrama en formato “fsa” que es posteriormente analizado con el programa PeakScanner V1.0 (Applied Biosystems). Este programa permite determinar la presencia o ausencia de la delección.

El análisis de las muestras revela que dentro del grupo de control, n=191, 112 muestras eran genotipo wt/wt para la región *CFHR1-CFHR3*, 70 muestras mostraban heterocigosis, wt/del, y 9 eran homocigotas para la delección, del/del; en el caso de los afectos, n=259, 219 eran homocigotas wt/wt, 36 heterocigotas, wt/del, y 4 homocigotas del/del.

El análisis del rs6677604, A/G, por RT-PCR se realizó mediante sondas TaqMan (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante sobre 166 muestras de las previamente caracterizadas por MLPA elegidas al azar entre el grupo del ensayo. Los datos de la RT-PCR se analizaron con el programa iQ5 v1.0 (Bio-Rad). De las 166 muestras, 105 muestras presentaban genotipo G/G, 54 muestras A/G y 9 muestras A/A. El alelo A del rs6677604 es el que está en desequilibrio de ligamiento con la delección *CFHR1-CFHR3*.

El análisis estadístico muestra una correlación total entre el alelo A del rs6677604 y la delección *CFHR1-CFHR3* en población caucásica española, por tanto queda demostrado que pueden usarse indistintamente en el cálculo de la probabilidad de desarrollar DMAE en la población objeto de estudio. Se hace notar que las técnicas de detección de SNPs son menos tediosas que la MLPA y que por tanto una actividad inventiva es la reducción de la complejidad del ensayo respecto a otros métodos descritos.

### 30 **EJEMPLO 3. Estudio de la asociación de las variantes alélicas del gen *CFHR1* y el riesgo de desarrollar DMAE en población caucásica española.**

Para establecer la relación entre las variantes alélicas de la proteína CFHR1 y el riesgo de desarrollar DMAE en población caucásica española se secuenciaron todas las regiones exónicas de los genes *CFHR1* y *CFHR3* en las muestras objeto de estudio, 191

sanos y 259 afectados. Estas regiones se amplificaron por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante cebadores específicos, tabla 8 y posteriormente se secuenciaron usando el kit BigDye Terminator Version 3.1 (Applied Biosystems) cargando las muestras en un secuenciador automático ABI 3730. Con objeto de comparar el valor de la asociación de las variantes obtenidas con otras caracterizadas para el desarrollo de DMAE se estudió la variante descrita que influye fuertemente en el desarrollo de la enfermedad como es el alelo p.402H de *CFH*, rs1061170, (Klein et al (2005) Science 308: 385-389). Este alelo se estudió mediante la amplificación por PCR con los cebadores específicos FH-E9-F y FH-E9-R y minisequenciando con el cebador FH-E9\*, y los cebadores que se pueden ver en la tabla 9.

Tabla 8. Cebadores usados para la amplificación de los exones de *CFHR3* y *CFHR1*

Exón	Tamaño pb	Secuencia cebador	NUMERO SEQ ID
<b><i>CFHR3</i></b>			
CFHR3ex1-F	220	CTAGCTTCATGGTAGTGCAC	SEQ ID No: 39
CFHR3ex1-R		TTTAAGAGGGGAAGCTGAGTG	SEQ ID No: 40
CFHR3ex2-F	472	AAATGTTTGAGAGAAGGTGATATC	SEQ ID No: 41
CFHR3ex2-R		TTTTTCATATGATTTTCAAGAACTC	SEQ ID No: 42
CFHR3ex3-F	282	CATTTACTTTATTTATTTATCATTGCTATG	SEQ ID No: 43
CFHR3ex3-R		TCTGAGACTGTCGTCCG	SEQ ID No: 44
CFHR3ex4-F	547	CTTGTTCCCTCCTATAAAAGAAC	SEQ ID No: 45
CFHR3ex4-R		GCAACTAACATATTTTGCTGATAC	SEQ ID No: 46
CFHR3ex5-F	604	TTGAAAATGCAGATGTCTTCC	SEQ ID No: 47
CFHR3ex5-R		GAACTCCTGACCTCATGG	SEQ ID No: 48
CFHR3ex6-F2	507	CATTTTATTTGCTCATGAAAGAG	SEQ ID No: 49
CFHR3ex6-R2		TTCATTGATAAGAAGTCCAATATAAGA	SEQ ID No: 50
<b><i>CFHR1</i></b>			
CFHR1ex1-F	400	GGACTTTACTAACTAGCTTCCAG	SEQ ID No: 51
CFHR1ex1-R		GCAACTTAGAGGATGGAGAG	SEQ ID No: 52
CFHR1ex2-F	248	TTATGTTATTTTCCCAGCAACAT	SEQ ID No: 53
CFHR1ex2-R		AATGACATCCATTTAATGAACAGA	SEQ ID No: 54
CFHR1ex3-F	330	AAGCGCAGAGATTACCAGAG	SEQ ID No: 55
CFHR1ex3-R		GATAACAGCATATGAGAGAACAG	SEQ ID No: 56
CFHR1ex4-F	460	CGTCTTGAAACATATTTGTAAGTGTATT	SEQ ID No: 57
CFHR1ex4-R		GGTCGAATCTTTCTCAAAAATAATAC	SEQ ID No: 58
CFHR1ex5-F	314	TGTATTTTGATTTGCTCTCACAAT	SEQ ID No: 59
CFHR1ex5-R		GATTATTTTGTACCAACAGCA	SEQ ID No: 60

CFHR1ex6-F	703	ATTTAAATCAATATGATGTTTTTACATAGTC	SEQ ID No: 61
CFHR1ex6-R		CAGAAATAAAGTCTGAAAAATTGCA	SEQ ID No: 62

Tabla 9. Cebadores usados para la caracterización del rs1061170.

NOMBRE CEBADOR	SECUENCIA CEBADOR	NUMERO SEQ ID
FH-E9-F	GCAAACCTTTGTTAGTAACTTTAGTTCGTC	SEQ ID No: 51
FH-E9-R	AAACTAAATAGGTCCATTGGTAAAACAAGG	SEQ ID No: 52
FH-E9*	TATTTGGAAAATGGATATAATCAAAAT	SEQ ID No: 53

Para la preparación de la reacción de PCR con los cebadores FHE9-F y R se mezclan 3,1  $\mu$ l de la solución maestra “Multiplex PCR kit” de Qiagen, 0,62 $\mu$ l de la mezcla de cebadores (FHE9-F: 1  $\mu$ l de cebador a 100  $\mu$ M; FHE9-R: 1  $\mu$ l de cebador a 100  $\mu$ M. A esta mezcla se le añade tampón TE hasta 50  $\mu$ l), 2,5  $\mu$ l de DNA (a 50 ng/ $\mu$ l) y agua hasta un total de 6,2  $\mu$ l.

La mezcla de PCR (6.25  $\mu$ l) se somete a una reacción de amplificación por PCR que se lleva a cabo con la en un equipo termociclador Veriti 96 Well Fast Termocycler (Applied Biosystems) en las siguientes condiciones: 95<sup>o</sup>C - 15 min; 40 ciclos (95<sup>o</sup>C - 30 s; 62<sup>o</sup>C – 1,5 min; 72<sup>o</sup>C – 1,5 min); 72<sup>o</sup>C - 10 min.

A continuación se traspara 1  $\mu$ l de la reacción de PCR a un tubo de PCR de 0,2 ml y se le añaden 4  $\mu$ l de agua y 2  $\mu$ l de ExoSAP (USB, ExoSAP-IT) incubándose la mezcla durante 1 h a 37<sup>o</sup>C y 15 min a 75<sup>o</sup>C.

Para la preparación de la reacción de minisequenciación se mezclan 0,75  $\mu$ l de la solución mastermix del kit SNAPSHOT (Applied Biosystems), 0,75  $\mu$ l de tampón BigDye Terminador v1.1, v3.1 5X sequencing Buffer (Applied Biosystems), 0,5  $\mu$ l de la mezcla de cebadores (2  $\mu$ l de 100  $\mu$ M; FHE9); completando hasta 50  $\mu$ l con tampón TE, 1  $\mu$ l del producto final obtenido de la PCR y 2  $\mu$ l de agua.

La mezcla anterior se somete a una reacción similar a la PCR en cuanto al tipo de ciclos de subida y bajada de la temperatura que se lleva a cabo en un equipo termociclador Veriti 96 Well Fast Termocycler (Applied Biosystems), o similar, en las siguientes condiciones: 25 ciclos (96<sup>o</sup>C - 10 s; 50<sup>o</sup>C – 5 s; 60<sup>o</sup>C – 30 s).

El producto final de la reacción de minisequenciación (5  $\mu$ l) se traspara a un tubo de PCR de 0,2 ml y se trata con 0,5  $\mu$ l de fosfatasa alcalina de gamba SAP (USB) durante 1 h a 37<sup>o</sup>C y 15 min a 75<sup>o</sup>C.

Una vez finalizado el tratamiento con la enzima SAP la muestra se corre en un secuenciador automático ABI3730 (Applied Biosystems). A la muestra se le añade un marcador de referencia (GS 120 LIZ) (Applied Biosystems) que permitirá determinar el tamaño de los cebadores marcados por la incorporación de la base adyacente. Los datos  
 5 obtenidos en la electroforesis capilar, que lleva a cabo el secuenciador automático de ADN, generan un electroforegrama que se analiza utilizando el programa informático GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems). El programa analiza de forma automática los datos del electroforegrama, interpretando los picos generados por cada uno de los  
 10 cebadores y su SNP asociado. Estos picos aparecen en diferentes posiciones dependiendo de la longitud del cebador usado y del ddNTP marcado fluorescentemente incorporado. Esto permite asignar el nucleótido de cada una de las posiciones que se está analizando. Por cada SNP analizado se observa un único pico en los casos en los que la muestra (SNP) se encuentre en homocigosis o dos picos si la muestra está en heterocigosis, cada uno marcado por un fluoróforo diferente.

15 El análisis de desequilibrio de ligamiento de las variantes dentro de *CFH* y *CFHR1* se realizó con el programa MIDAS (Gaunt et al (2006) BMC Bioinformatics. 27;7:227). Las frecuencias de los haplotipos entre casos y controles se estimaron usando el algoritmo EM (Expectation Maximization) implementado por el software SNPstats (<http://bioinfo.iconcologia.net/snpstats/start.htm>). El cálculo de las frecuencias entre  
 20 grupos se realizó mediante un test de asociación Pearson's Chi-Cuadrado y se consideró estadísticamente significativo si  $p < 0.05$ . Se calculó el OR y el CI.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa SPSS v14.0 para Windows (Chicago, IL, USA). El cálculo de las frecuencias entre grupos se realizó mediante un test de asociación Pearson's Chi-Cuadrado y se consideró estadísticamente significativo si  $p < 0.05$ . Se calculó el OR y el CI. El resultado de estos análisis demuestra que como se  
 25 puede ver la tabla siguiente, tabla 10, la asociación de los alelos *CFHR1*\*A (identificado por el rs388862, alelo G) y *CFHR1*\*C (identificado por el marcador rs6677604, alelo A) con DMAE es muy fuerte. En concreto muestra que los valores OR, Odds Ratio, en relación al desarrollo de DMAE son equivalentes a los del alelo p.402H de *CFH*,  
 30 rs1061170 y a los de la del*CFHR3*-*CFHR1*, respectivamente.

El estudio en conjunto de los dos SNPs, rs388862 y rs6677604, permite una completa caracterización del locus *CFHR1* en cuanto a la determinación de las tres variantes alélicas *CFHR1*\*A, *CFHR1*\*B y *CFHR1*\*C, aportando una herramienta muy poderosa para valorar predisposición a DMAE que no había sido descrita hasta la fecha.

Tabla 10. Valores OR en relacion al desarrollo de DMAE asociados al alelo p.402HIS de *CFH* y a los alelos CFHR1\*A y CFHR1\*C de *CFHR1*

Gen	Alelo	P-value	OR	95% IC
CFH	402-HIS	<0,0001	2,267	1,713-2,997
CFHR1	CHFR1*A	<0,0001	2,085	1,592-2,729
	CHFR1*C	<0,0001	0,341	0,233-0,499

**EJEMPLO 4. Amplificación por PCR multiplex de las regiones de interés de los genes**  
5 ***CFH*, *CFB*, *LOC387715* y *CFHR1***

Para la preparación de la reacción de PCR múltiplex se mezclan 3,1 µl de la solución maestra “Multiplex PCR kit” de Qiagen, 0,62µl de la mezcla de cebadores (1 µl de cada uno de los cebadores siguientes a una concentración 100µM más 34 µl de tampón TE; FH-E2-F, FH-E2-R, FH-I12-F,FH-I12-R, FB-E1-2-F, FB-E1-2-R, Loc387715-F,Loc387715-R, CFHR1PA-F, CFHR1PA-R) cuya secuencia se detalla en la tabla 4, 2,5 µl  
10 de DNA (a 50 ng/µl) y agua hasta un total de 6,2 µl.

La mezcla multiplex (6.25 µl) se somete a una reacción de amplificación por PCR que se lleva a cabo con la en un equipo termociclador Veriti 96 Well Fast Termocycler (Applied Biosystems), o similar, en las siguientes condiciones: 95°C - 15 min; 40 ciclos  
15 (95°C - 30 s; 62°C – 1,5 min; 72°C – 1,5 min); 72°C - 10 min.

A continuación se traspasa 1 µl de la reacción múltiplex a un tubo de PCR de 0,2 ml y se le añaden 4 µl de agua y 2 µl de ExoSAP (USB, ExoSAP-IT) incubándose la mezcla durante 1 h a 37°C y 15 min a 75°C.

20 **EJEMPLO 5. Minisequenciación de los polimorfismos rs800292, rs6677604, rs4151667, rs12614, rs641153, rs10490924, rs388862.**

La técnica de minisequenciación multiplex permite analizar en una sola muestra diferentes polimorfismos. Esto se consigue usando cebadores de diferente longitud para cada una de las posiciones a estudiar. De este modo se pueden separar e identificar  
25 eficientemente en la electroforesis capilar. Para la preparación de la reacción de minisequenciación se mezclan 0,75 µl de la solución mastermix del kit SNAPSHOT (Applied Biosystems), 0,75 µl de tampón BigDye Terminador v1.1, v3.1 5X sequencing Buffer (Applied Biosystems), 0,5 µl de la mezcla de cebadores (FH-E2\*(R) 0,5 µl a 50 µM, FB-E2\* c.95(R) 2 µl a 100 µM, FH-I12\*(R) 0,6 µl a 10 µM, FB-E2\* c.94 2 µl a 100

$\mu\text{M}$ , FHR-HAP-A-F\* 1  $\mu\text{l}$  a 100  $\mu\text{M}$ , FB-E1\* 1  $\mu\text{l}$  a 100  $\mu\text{M}$ , Loc387715\* 0,25  $\mu\text{l}$  a 5  $\mu\text{M}$ ); completando hasta 50  $\mu\text{l}$  con tampón TE) cuya secuencia se detalla en la tabla 5, 1  $\mu\text{l}$  del producto final obtenido de la PCR multiplex y 2,  $\mu\text{l}$  de agua.

La mezcla anterior se somete a una reacción similar a la PCR en cuanto al tipo de  
5 ciclos de subida y bajada de la temperatura que se lleva a cabo en un equipo termociclador Veriti 96 Well Fast Termocycler (Applied Biosystems), o similar, en las siguientes condiciones: 25 ciclos (96°C - 10 s; 50°C – 5 s; 60°C – 30 s).

El producto final de la reacción de minisequenciación (5  $\mu\text{l}$ ) se traspasa a un tubo de PCR de 0,2 ml y se trata con 0,5  $\mu\text{l}$  de fosfatasa alcalina de gamba SAP (USB) durante  
10 1 h a 37°C y 15 min a 75°C.

Una vez finalizado el tratamiento con la enzima SAP la muestra se corre en un secuenciador automático ABI3730 (Applied Biosystems). A la muestra se le añade un marcador de referencia (GS 120 LIZ) (Applied Biosystems) que permitirá determinar el tamaño de los cebadores marcados por la incorporación de la base adyacente. Los datos  
15 obtenidos en la electroforesis capilar, que lleva a cabo el secuenciador automático de ADN, generan un electroforegrama que se analiza utilizando el programa informático GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems). El programa analiza de forma automática los datos del electroforegrama, interpretando los picos generados por cada uno de los cebadores y su SNP asociado. Estos picos aparecen en diferentes posiciones dependiendo  
20 de la longitud del cebador usado y del ddNTP marcado fluorescentemente incorporado. Esto permite asignar el nucleótido de cada una de las posiciones que se está analizando. Por cada SNP analizado se observa un único pico en los casos en los que la muestra (SNP) se encuentre en homocigosis o dos picos si la muestra está en heterocigosis, cada uno marcado por un fluoróforo diferente. Un ejemplo del resultado de la electroforesis capilar  
25 se puede observar en la figura 1.

**EJEMPLO 6. Análisis estadístico para la predicción del riesgo de padecer DMAE utilizando los polimorfismos rs800292, rs6677604, rs4151667, rs12614, rs641153, rs10490924, rs388862.**

Una vez se ha obtenido el resultado del análisis de los polimorfismos genéticos seleccionados, se procede a realizar el análisis estadístico a partir del genotipo que permite incluir al sujeto de la muestra en uno de los grupos de riesgo. La fórmula aplicada es

$$\text{Probabilidad} = e^z / 1 + e^z$$

Donde:  $z = a + \sum_{i=1}^5 b_i$ ;  $a=-0,065$  (valor constante)

Donde: el valor b para cada uno de los polimorfismos determinado específicamente para población caucásica española se detalla en la tabla 6 y se ha calculado a partir de los datos obtenidos de marcadores de muestras de ADN extraídas de 191 individuos sanos y 259 individuos que padecían DMAE.

Como ejemplo se muestra el análisis de dos individuos ejemplo. Los genotipos de los polimorfismos estudiados para dos individuos utilizados como ejemplos denominados individuo A e individuo B se muestran en las tablas 11 y 12 respectivamente

Tabla 11. Genotipo del individuo A

<i>FH-E2</i>	<i>FHI-12</i>	<i>FB-E1</i>	<i>FB-E2</i>	<i>FB-E2</i>	<i>LOC387715</i>	<i>CFHRI</i>
c.184 G>A	c.1696+2019 G>A	c.26 T>A	c.94 C>T	c.95 G>A	c.205 G>T	c.523 G>C
p.I62V	-	p.L9H	p.R32W	p.R32Q	p.A69S	p.E175Q
G/G	G/G	T/T	C/C	G/G	T/T	G/C

Tabla 12. Genotipo del individuo B

<i>FH-E2</i>	<i>FHI-12</i>	<i>FB-E1</i>	<i>FB-E2</i>	<i>FB-E2</i>	<i>LOC387715</i>	<i>CFHRI</i>
c.184 G>A	c.1696+2019 G>A	c.26 T>A	c.94 C>T	c.95 G>A	c.205 G>T	c.523 G>C
p.I62V	-	p.L9H	p.R32W	p.R32Q	p.A69S	p.E175Q
G/G	G/A	T/T	C/T	G/G	G/G	C/C

En el caso del individuo A la aplicación del algoritmo indica que el valor de p, expresado en porcentaje, es 94,73 lo cual le sitúa dentro del grupo de riesgo elevado; en el caso del individuo B el valor de p es 17,81 lo que le sitúa en el grupo de riesgo muy bajo. En el caso del individuo A muestra un riesgo mucho más alto que la población española general y el individuo B muestra un riesgo muy por debajo que la media de población caucásica española.

**EJEMPLO 7. Simulación de riesgo relativo de padecer DMAE para población caucásica española mayor de 80 años.**

La prevalencia de DMAE en población caucásica española de más de 80 años es del 25%. En este ejemplo de simulación podemos ver como se distribuye dentro de cada cuartil de riesgo relativo esta población. Aplicando el algoritmo descrito se categorizan los individuos sanos y los enfermos del estudio y se determinan los porcentajes de individuos en cada categoría de riesgo en población general. Estos porcentajes se aplican ahora a esta población mayor de 80 años, considerando que el 75% son sanos y el 25% enfermos. El resultado es una gráfica como la siguiente, figura 3, en la que se ven claramente los riesgos relativos en cada categoría para población caucásica española mayor de 80 años. Así por ejemplo para un individuo que sus marcadores genéticos lo asignan en el cuartil de riesgo muy bajo tiene un 6% de probabilidad de desarrollar DMAE mientras que si encaja en el riesgo alto tiene un 61% de probabilidad de desarrollar la enfermedad, dentro de su categoría. Visto de otro modo, si tiene marcadores de riesgo elevado tiene alrededor de 10 veces más de probabilidad de desarrollar la enfermedad que si tiene marcadores de riesgo muy bajo. Si este análisis se hiciera sobre una persona que aún no ha desarrollado la enfermedad y que por sus marcadores genéticos encajara en el riesgo alto tendría oportunidad de tomar medidas que ralentizaran la progresión de la enfermedad, esto incluye cambio de hábitos de vida o tratamientos con compuestos que frenan la progresión de la enfermedad, además de pasar revisiones periódicas para detectar los primeros síntomas. Si esta persona desconociera su elevado riesgo es probable que acudiera al oftalmólogo una vez los primeros síntomas se hubieran manifestado de una forma evidente lo cual impediría realizar tratamientos preventivos que muy probablemente habrían retrasado la aparición de la enfermedad. Por tanto, es evidente la utilidad de la realización de la prueba para población en riesgo como puedan ser familiares de afectos de DMAE.



**REIVINDICACIONES**

1. Un método de predicción de riesgo de padecer degeneración macular asociada a la edad en población caucásica española que comprende los siguientes pasos:
  - a. determinar en una muestra de DNA un genotipo que comprende un conjunto de polimorfismos de nucleótido simple (SNP) marcadores de dicha degeneración macular,
  - b. calcular un valor de probabilidad de padecer degeneración macular asociada a la edad mediante un algoritmo que comprende escoger al menos un parámetro dependiente de dicho genotipo previamente determinado.
2. Un método según la reivindicación 1, caracterizado porque la muestra de DNA se obtiene por extracción de DNA de una muestra biológica previamente obtenida.
3. Un método según la reivindicación 2, caracterizado porque la muestra biológica se selecciona del grupo compuesto por: una muestra de sangre, una muestra de saliva y una muestra de mucosa bucal.
4. Un método según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque dicho conjunto de polimorfismos comprende el polimorfismo (SNP) **rs388862**.
5. Un método según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque dicho conjunto de polimorfismos comprende polimorfismos (SNP) **rs6677604 y rs388862**.
6. Un método según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque dicho conjunto de polimorfismos comprende polimorfismos (SNP) **rs800292, rs6677604, rs4151667, rs12614, rs641153, rs10490924, y rs388862**.
7. Un método según una de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la determinación del genotipo comprende las siguientes etapas:
  - c. una amplificación de la muestra de DNA con una primera combinación de cebadores mediante una técnica de PCR múltiple,
  - d. una determinación de SNPs de dicha muestra de DNA amplificada con una segunda combinación de cebadores específicos mediante una técnica de minisequenciación.
8. Un método según la reivindicación 7, caracterizado porque previamente a la etapa d, dicha muestra de DNA amplificada se trata con fosfatasa alcalina y exonucleasa I.

9. Un método según una de las reivindicaciones 7 u 8, caracterizado porque dicha minisequenciación comprende:
- e. una reacción de extensión de la segunda combinación de cebadores específicos con al menos un dideoxinucleótido marcado, mediante tratamiento de dicha muestra de DNA amplificado con una mezcla de dicha segunda combinación de cebadores y una mezcla de dideoxinucleótidos de adenina, citosina, guanina y timina marcados fluorescentemente de manera selectiva,
  - f. añadir fosfatasa alcalina una vez finalizada la reacción de extensión,
  - g. registrar un electroforegrama mediante electroforesis capilar.
10. Un método según una de las reivindicaciones 7 a 9, caracterizado porque en la etapa de amplificación dicha primera combinación de cebadores comprende los cebadores de secuencias SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 3, SEQ ID No: 4, SEQ ID No: 5, SEQ ID No: 6, SEQ ID No: 7, SEQ ID No: 8, SEQ ID No: 9 y SEQ ID No: 10.
11. Un método según una de las reivindicaciones 7 a 10, caracterizado porque en la etapa de minisequenciación dicha segunda combinación de cebadores específicos comprende los cebadores de secuencias SEQ ID No: 11, SEQ ID No: 12, SEQ ID No: 13, SEQ ID No: 14, SEQ ID No: 15, SEQ ID No: 16 y SEQ ID No: 17.
12. Un método según una de las reivindicaciones 7 a 11, caracterizado porque la determinación del genotipo comprende las siguientes etapas:
- e. una amplificación de la muestra de DNA mediante una técnica de PCR múltiple con una combinación de cebadores que comprende al menos los cebadores de secuencia SEQ ID No: 1, SEQ ID No: 2, SEQ ID No: 3, SEQ ID No: 4, SEQ ID No: 5, SEQ ID No: 6, SEQ ID No: 7, SEQ ID No: 8, SEQ ID No: 9 y SEQ ID No: 10;
  - f. una determinación de SNPs de dicha muestra de DNA amplificada mediante una técnica de minisequenciación con una segunda combinación de cebadores específicos que comprende al menos los cebadores de secuencias SEQ ID No: 11, SEQ ID No: 12, SEQ ID No: 13, SEQ ID No: 14, SEQ ID No: 15, SEQ ID No: 16 y SEQ ID No: 17.

30

13. Un método según una de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque dicho algoritmo se define por la siguiente ecuación:

$$\text{Probabilidad} = e^z/(1+e^z),$$

donde z es un valor que resulta de sumar un conjunto de parámetros que consiste en: a, b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub>, b<sub>3</sub>, b<sub>4</sub> y b<sub>5</sub>, donde

5

I. a es un parámetro igual a un valor -0,065,

II. b<sub>1</sub> es un parámetro dependiente del genotipo previamente determinado cuyo valor se selecciona independientemente según la siguiente relación:

- b<sub>1</sub> es igual a 0 si dicho genotipo comprende SNP rs388862 C/C y SNP rs6677604 G/G;

10

- b<sub>1</sub> es igual a 0,608 si dicho genotipo comprende SNP rs388862 G/G y SNP rs6677604 G/G

- b<sub>1</sub> es igual a -1,466 si dicho genotipo comprende SNP rs388862 -/- y SNP rs6677604 A/A

15

- b<sub>1</sub> es igual a 0,343 si dicho genotipo comprende SNP rs388862 G/C y SNP rs6677604 G/G

- b<sub>1</sub> es igual a -0,939 si dicho genotipo comprende SNP rs388862 G/- y SNP rs6677604 G/A

20

- b<sub>1</sub> es igual a -1,082 si dicho genotipo comprende SNP rs388862 C/- y SNP rs6677604 G/A

III. b<sub>2</sub> es un parámetro dependiente del genotipo previamente determinado cuyo valor se selecciona independientemente según la siguiente relación:

- b<sub>2</sub> es igual a 0 si dicho genotipo comprende SNP rs800292 G/G

- b<sub>2</sub> es igual a -0,742 si dicho genotipo comprende SNP rs800292 G/A

25

- b<sub>2</sub> es igual a -0,782 si dicho genotipo comprende SNP rs800292 A/A

IV. b<sub>3</sub> es un parámetro dependiente del genotipo previamente determinado cuyo valor se selecciona independientemente según la siguiente relación:

- b<sub>3</sub> es igual a 0 si dicho genotipo comprende SNP rs10490924 G/G

- b<sub>3</sub> es igual a 0,911 si dicho genotipo comprende SNP rs10490924 G/T

30

- b<sub>3</sub> es igual a 2,14 si dicho genotipo comprende SNP rs10490924 T/T

V. b<sub>4</sub> es un parámetro dependiente del genotipo previamente determinado cuyo valor se selecciona independientemente según la siguiente relación:

- b<sub>4</sub> es igual a -1,186 si dicho genotipo comprende SNP rs4151667 T/A

VI.  $b_5$  es un parámetro dependiente del genotipo previamente determinado cuyo valor se selecciona independientemente según la siguiente relación:

- $b_5$  es igual a 0 si dicho genotipo comprende un genotipo seleccionado entre uno del grupo compuesto por:
  - 5           i. una combinación de SNP rs12614 C/C y SNP rs641153 A/A,
  - ii. una combinación de SNP rs12614 T/T y SNP rs641153 G/G,
  - iii. una combinación de SNP rs12614 C/T y SNP rs641153 G/A;
- $b_5$  es igual a 0,471 si dicho genotipo comprende:
  - iv. una combinación de SNP rs12614 C/C y SNP rs641153 G/G;
- 10       -  $b_5$  es igual a -0,382 si dicho genotipo comprende un genotipo seleccionado entre uno del grupo compuesto por:
  - v. una combinación de SNP rs12614 C/C y SNP rs641153 G/A,
  - vi. una combinación de SNP rs12614 C/T y SNP rs641153 G/G.

15

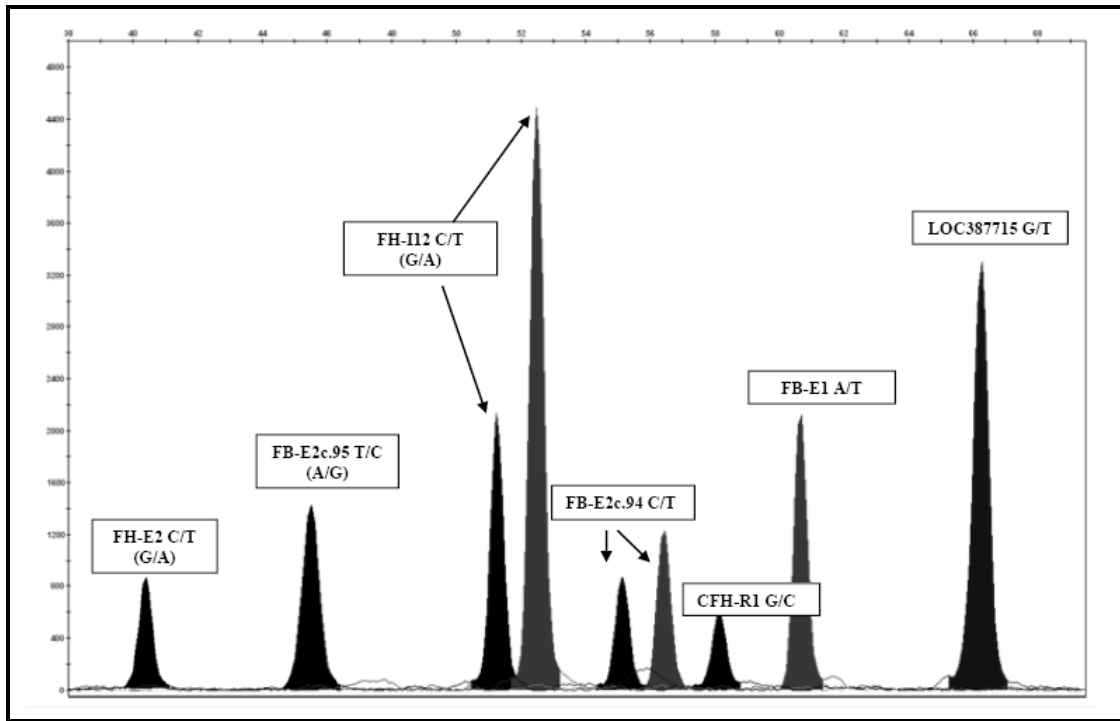


FIGURA 1

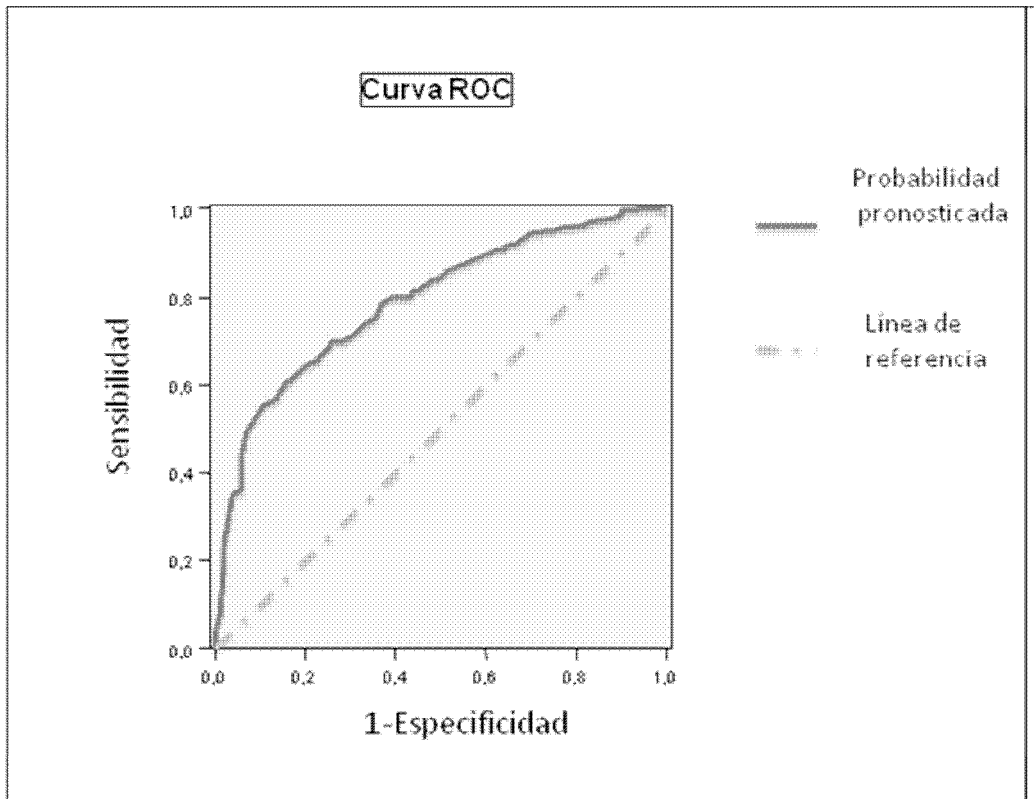


FIGURA 2

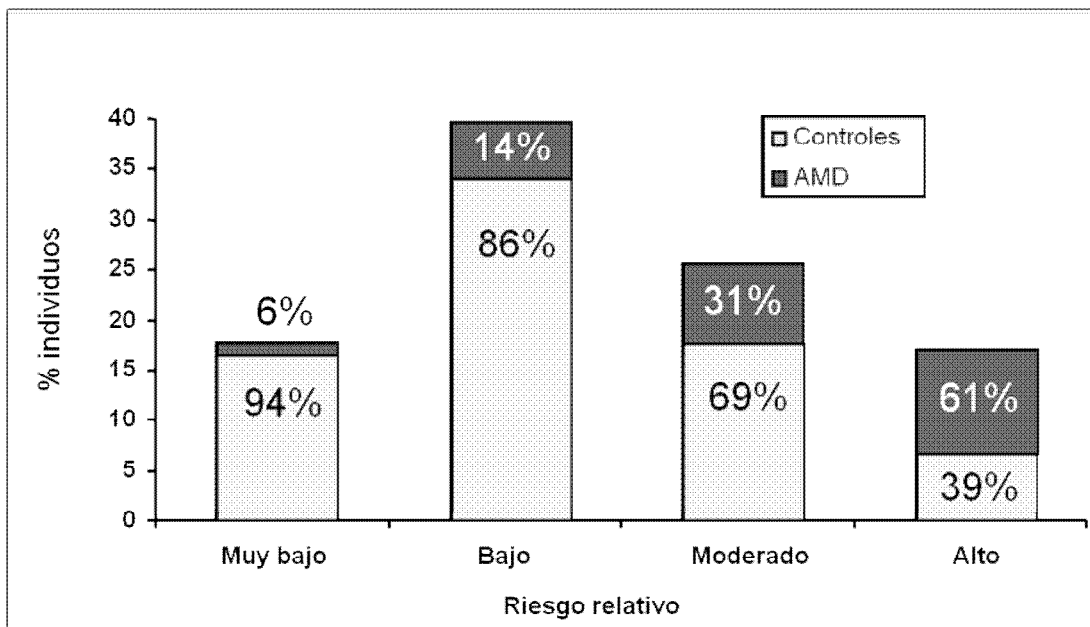


FIGURA 3

# ES 2 399 897 A1

## LISTA DE SECUENCIAS

- <110> SECUGEN S.L.  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS  
UNIVERSIDAD DE NAVARRA
- <120> MÉTODO PARA LA PREDICCIÓN DEL RIESGO DE DESARROLLAR  
LA ENFERMEDAD DE DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA  
EDAD EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA
- <160> 65
- <170> BiSSAP 1.0
- <210> 1  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens
- <220>  
<221> source  
<222> 1..30  
<223> /mol\_type="DNA"  
/note="Secuencia del cebador FH-E2-F"  
/organism="Homo sapiens"
- <400> 1  
actgtacatt taaatagaca ctttatgcac 30
- <210> 2  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens
- <220>  
<221> source  
<222> 1..30  
<223> /mol\_type="DNA"  
/note="Secuencia del cebador FH-E2-R"  
/organism="Homo sapiens"
- <400> 2  
atttttacac ctagttttca taaatttcac 30
- <210> 3  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens
- <220>  
<221> source  
<222> 1..22  
<223> /mol\_type="DNA"  
/note="Secuencia del cebador FH-I12-F"  
/organism="Homo sapiens"
- <400> 3  
gaaagttgtg cactgaaggg at 22
- <210> 4  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens
- <220>  
<221> source  
<222> 1..22

ES 2 399 897 A1

<223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Secuencia del cebador FH-I12-R"  
 /organism="Homo sapiens"

<400> 4  
 cacctgtcac aaggttgtaa gc 22

<210> 5  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..27  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Secuencia del cebador FB-E1-2-F"  
 /organism="Homo sapiens"

<400> 5  
 aagcaaagca agccaggaca caccatc 27

<210> 6  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..28  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Secuencia del cebador FB-E1-2-R"  
 /organism="Homo sapiens"

<400> 6  
 tctcggagac catgtcactg agaaacag 28

<210> 7  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..27  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Secuencia del cebador Loc387715-F"  
 /organism="Homo sapiens"

<400> 7  
 tttccactct gcgagagtct gtgctgg 27

<210> 8  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..27  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Secuencia del cebador Loc387715-R"  
 /organism="Homo sapiens"

<400> 8  
 tctgggttcc agcaggagag aagaagg 27



ES 2 399 897 A1

<210> 9  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..25  
 <223> /mol\_type="DNA"  
       /note="Secuencia del cebador CFHR1PA-F"  
       /organism="Homo sapiens"  
  
 <400> 9  
 aacatcaaag cttgtacctg acaaa 25

<210> 10  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..25  
 <223> /mol\_type="DNA"  
       /note="Secuencia del cebador CFHR1PA-R"  
       /organism="Homo sapiens"  
  
 <400> 10  
 tgtgttctgt tcacaggaag aattg 25

<210> 11  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..32  
 <223> /mol\_type="DNA"  
       /note="Secuencia del cebador FH-E2\* (R)"  
       /organism="Artificial Sequence"  
  
 <400> 11  
 gatcgcgatcgt cccttcctgc ataccattat ta 32

<210> 12  
 <211> 42  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..42  
 <223> /mol\_type="DNA"  
       /note="Secuencia del cebador FB-E2\* c.95 (R)"  
       /organism="Artificial Sequence"  
  
 <400> 12  
 gatcgcgatcga tcgatcgcgatc gagagagcag gatccctggg gc 42

<210> 13  
 <211> 50  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

ES 2 399 897 A1

```

<220>
<221> source
<222> 1..50
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador FH-I12* (R)"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 13
gatcgatcga tcgatcgatc gatcgatcac agtagctgtg agtcctttcc      50

<210> 14
<211> 56
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..56
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador FB-E2* c.94"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 14
gatcgatcga tcgatcgatc gatcgatcga tcgataccac tccatggtct ttggcc      56

<210> 15
<211> 60
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..60
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador FHR-HAP-A-F*"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 15
cgatcgatcg atcgatcgat cgatcgatcg atcgatccat ctggtgagag agtacgttat      60

<210> 16
<211> 65
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..65
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador FB-E1*"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 16
cgatcgatcg atcgatcgat cgatcgatcg atcgatcgat cgatcgagca atctcagccc      60
ccaac      65

<210> 17
<211> 72
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..72

```

ES 2 399 897 A1

```

<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador Loc387715*"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 17
gatcgatcga tcgatcgatc gatcgatcga tcgatcgatc gatcgatcga ttcacactcc      60
atgatcccag ct                                                                72

<210> 18
<211> 41
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..41
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador X-BCAP31"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 18
gggttcccta agggttggaa caggagcctg aaggctgacc t                                41

<210> 19
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..49
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador BCAP31-Y"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1
<223> /note="G en posición 1 corresponde a una guanina unida a un grupo
      fosfato (pG)"

<400> 19
gcagaagcta aaggacgagc tggacttcta gattggatct tgctggcac                        49

<210> 20
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..48
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador X-CFH-1191C"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 20
gggttcccta agggttggag actggacagc caaacagaag ctttattc                        48

<210> 21
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

```

ES 2 399 897 A1

```

<221> source
<222> 1..54
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador X-CFHR1191C"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 21
gggttccta agggttggag actgactgag gacagccaaa cagaagcttt attt      54

<210> 22
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..49
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador CFH1191-Y"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1
<223> /note="G en posición 1 corresponde a una guanina unida a un grupo
      fosfato (pG)"

<400> 22
gagaacaggt gaatcagytg aatttgctca gattggatct tgctggcac      49

<210> 23
<211> 55
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..55
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador X-CFHL1ex2"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 23
gggttccta agggttggac atagttcgta atagaaaact tcccctgtag gaacc      55

<210> 24
<211> 55
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..55
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador CFHL1ex2-Y"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1
<223> /note="T en posición 1 corresponde a una timina unida a un grupo
      fosfato (pT)"

<400> 24
tgggaaaatg gcttatattt ttctcatct actctagatt ggatcttgct ggcac      55

```

ES 2 399 897 A1

<210> 25  
 <211> 41  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..41  
 <223> /mol\_type="DNA"  
       /note="Secuencia del cebador X-MORF4L1"  
       /organism="Artificial Sequence"  
  
 <400> 25  
 gggttccta agggttggag atgctcata acttagaatg g 41  
  
 <210> 26  
 <211> 78  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..78  
 <223> /mol\_type="DNA"  
       /note="Secuencia del cebador MORF4L1-Y"  
       /organism="Artificial Sequence"  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1  
 <223> /note="G en posición 1 corresponde a una guanina unida a un grupo  
       fosfato (pG)"  
  
 <400> 26  
 ggttacatcg caataaacc agagactgac tgactgactg actgactgac tgacttctag 60  
 attgcatctt gctggcac 78  
  
 <210> 27  
 <211> 66  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..66  
 <223> /mol\_type="DNA"  
       /note="Secuencia del cebador X-CFHex5"  
       /organism="Artificial Sequence"  
  
 <400> 27  
 gggttccta agggttggag actgactgac tgactcgagg gaatacatt ttggacaagc 60  
 agtacg 66  
  
 <210> 28  
 <211> 59  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..59  
 <223> /mol\_type="DNA"  
       /note="Secuencia del cebador CFHex5-Y"  
       /organism="Artificial Sequence"

ES 2 399 897 A1

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1  
 <223> /note="G en posición 1 corresponde a una guanina unida a un grupo fosfato (pG)"

<400> 28  
 gtttgatgt aactcaggct acaagattga aggctgtcta gattggatct tgctggcac 59

<210> 29  
 <211> 71  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..71  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Secuencia del cebador X-CFHL3ex3"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 29  
 gggttcccta agggttggag actgactgac tgactgcatt gttactaatc aatgtcattc 60  
 tgaccttgtg g 71

<210> 30  
 <211> 59  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..59  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Secuencia del cebador CFHL3ex3-Y"  
 /organism="Artificial Sequence"

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 1  
 <223> /note="G en posición 1 corresponde a una guanina unida a un grupo fosfato (pG)"

<400> 30  
 gtttcctgtg ctaatggaca aggtaagtta aaagcttcta gattggatct tgctggcac 59

<210> 31  
 <211> 79  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..79  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Secuencia del cebador X-CFHL3ex6"  
 /organism="Artificial Sequence"

<400> 31  
 gggttcccta agggttggag actgactgac tgactgactg actcttcagc attgttacc 60  
 taaatgtatg tccaacttc 79

<210> 32  
 <211> 56

ES 2 399 897 A1

```

<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..56
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador CFHL3ex6-Y"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1
<223> /note="C en posición 1 corresponde a una citosina unida a un grup
      o fosfato (pC)"

<400> 32
cacttttcca cttctcactc ttatggcttc acgtctagat tggatcttgc tggcac      56

<210> 33
<211> 79
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..79
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador X-CFHL5ex5"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 33
gggttccta agggttggag actgactgac tgactgactg actgactcgc cgggcctaag      60
aaaatacaat gtgtggatg      79

<210> 34
<211> 61
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..61
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador CFHL5ex5-Y"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1
<223> /note="G en posición 1 corresponde a una guanina unida a un grupo
      fosfato (pG)"

<400> 34
gagaatggac aactttacc acttgtgttg agcggacttc tagattggat cttgctggca      60
c      61

<210> 35
<211> 82
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..82

```

ES 2 399 897 A1

```

<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador X-CFHL2ex5"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 35
gggttccta agggttggag actgactgac tgactgactg actgactgac tcgccaaca      60
aatctcattc atttcgagca at                                             82

<210> 36
<211> 63
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..63
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador CFHL2ex5-Y"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1
<223> /note="G en posición 1 corresponde a una guanina unida a un grupo
      fosfato (pG)"

<400> 36
gtgtcagaat gggaaactgg tatatcccag gcgactgact tctagattgg atcttgctgg      60
cac                                                                                   63

<210> 37
<211> 64
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..64
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador X-CFHL4F"
      /organism="Artificial Sequence"

<400> 37
gggttccta agggttggag actgactgag cacacactga ttggtaaatt ttatccctac      60
aatg                                                                                   64

<210> 38
<211> 86
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<221> source
<222> 1..86
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador CFHL4F-Y"
      /organism="Artificial Sequence"

<220>
<221> misc_feature
<222> 1
<223> /note="G en posición 1 corresponde a una guanina unida a un grupo
      fosfato (pG)"

```



ES 2 399 897 A1

```

<400> 38
ggacttttctt agttgagttg tgcacatcgat ggactgactg actgactgac tgactgactg      60
acttctagat tggatcttgc tggcac                                             86

<210> 39
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador CFHR3ex1-F"
      /organism="Homo sapiens"

<400> 39
ctagcttcat ggtagtgcac                                                    20

<210> 40
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> source
<222> 1..20
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador CFHR3ex1-R"
      /organism="Homo sapiens"

<400> 40
tttaagaggg aagctgagtg                                                  20

<210> 41
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> source
<222> 1..24
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador CFHR3ex2-F"
      /organism="Homo sapiens"

<400> 41
aatgtttga gagaaggtga tatc                                             24

<210> 42
<211> 25
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador CFHR3ex2-R"
      /organism="Homo sapiens"

<400> 42
ttttcatat gattttcaag aactc                                           25

```

ES 2 399 897 A1

```

<210> 43
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> source
<222> 1..30
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador CFHR3ex3-F"
      /organism="Homo sapiens"

<400> 43
catttacttt atttatttat cattgctatg                                     30

<210> 44
<211> 17
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> source
<222> 1..17
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador CFHR3ex3-R"
      /organism="Homo sapiens"

<400> 44
tctgagactg tcgtccg                                                  17

<210> 45
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> source
<222> 1..23
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador CFHR3ex4-F"
      /organism="Homo sapiens"

<400> 45
cttgttccct cctataaaag aac                                          23

<210> 46
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> source
<222> 1..24
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador CFHR3ex4-R"
      /organism="Homo sapiens"

<400> 46
gcaactaaca tattttgctg atac                                         24

<210> 47
<211> 21
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>

```

ES 2 399 897 A1

```

<221> source
<222> 1..21
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador CFHR3ex5-F"
      /organism="Homo sapiens"

<400> 47
ttgaaaatgc agatgtcttc c                                21

<210> 48
<211> 18
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> source
<222> 1..18
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador CFHR3ex5-R"
      /organism="Homo sapiens"

<400> 48
gaactcctga cctcatgg                                    18

<210> 49
<211> 23
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> source
<222> 1..23
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador CFHR3ex6-F2"
      /organism="Homo sapiens"

<400> 49
cattttatattt gctcatgaaa gag                            23

<210> 50
<211> 27
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> source
<222> 1..27
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador CFHR3ex6-R2"
      /organism="Homo sapiens"

<400> 50
ttcattgata agaagtccaa tataaga                          27

<210> 51
<211> 24
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> source
<222> 1..24
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador CFHR1ex1-F"
      /organism="Homo sapiens"

```

ES 2 399 897 A1

<400> 51  
 ggactttact aaactagctt ccag 24

<210> 52  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..20  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Secuencia del cebador CFHR1ex1-R"  
 /organism="Homo sapiens"

<400> 52  
 gcaacttaga ggatggagag 20

<210> 53  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..23  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Secuencia del cebador CFHR1ex2-F"  
 /organism="Homo sapiens"

<400> 53  
 ttatgttatt ttcccagcaa cat 23

<210> 54  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..24  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Secuencia del cebador CFHR1ex2-R"  
 /organism="Homo sapiens"

<400> 54  
 aatgacatcc atttaatgaa caga 24

<210> 55  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..20  
 <223> /mol\_type="DNA"  
 /note="Secuencia del cebador CFHR1ex3-F"  
 /organism="Homo sapiens"

<400> 55  
 aagcgcagag attaccagag 20

<210> 56  
 <211> 23

ES 2 399 897 A1

<212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..23  
 <223> /mol\_type="DNA"  
       /note="Secuencia del cebador CFHR1ex3-R"  
       /organism="Homo sapiens"  
  
 <400> 56  
 gataacagca tatgagagaa cag 23  
  
 <210> 57  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..28  
 <223> /mol\_type="DNA"  
       /note="Secuencia del cebador CFHR1ex4-F"  
       /organism="Homo sapiens"  
  
 <400> 57  
 cgtcttgaaa catatttgta actgtatt 28  
  
 <210> 58  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..26  
 <223> /mol\_type="DNA"  
       /note="Secuencia del cebador CFHR1ex4-R"  
       /organism="Homo sapiens"  
  
 <400> 58  
 ggtcgaatct ttctcaaaaa taatac 26  
  
 <210> 59  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..24  
 <223> /mol\_type="DNA"  
       /note="Secuencia del cebador CFHR1ex5-F"  
       /organism="Homo sapiens"  
  
 <400> 59  
 tgtattttga tttgctctca caat 24  
  
 <210> 60  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..22

ES 2 399 897 A1

```

<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador CFHR1ex5-R"
      /organism="Homo sapiens"

<400> 60
gattattttg ttaccaacag ca                                22

<210> 61
<211> 31
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> source
<222> 1..31
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador CFHR1ex6-F"
      /organism="Homo sapiens"

<400> 61
atttaaataca atatgatggt tttacatagt c                    31

<210> 62
<211> 25
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> source
<222> 1..25
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador CFHR1ex6-R"
      /organism="Homo sapiens"

<400> 62
cagaaataaaa gtctgaaaaa ttgca                            25

<210> 63
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> source
<222> 1..30
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador FH-E9-F"
      /organism="Homo sapiens"

<400> 63
gcaaaccttt gttagtaact ttagttcgtc                       30

<210> 64
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> source
<222> 1..30
<223> /mol_type="DNA"
      /note="Secuencia del cebador FH-E9-R"
      /organism="Homo sapiens"

<400> 64
aaactaaata ggtccattgg taaaacaagg                       30

```

<210> 65  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> source  
<222> 1..27  
<223> /mol\_type="DNA"  
/note="Secuencia del cebador FH-E9\*"  
/organism="Homo sapiens"

<400> 65  
tatttggaat atggatataa tcaaaat

27



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201131516

②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.09.2011

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)  
**G06F19/24** (2011.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HUGHES ANNE E. ET AL. A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-related macular. Nature Genetics. Abril 2007. Vol. 39. Nº. 4, página 1173-1177. ISSN 1061-4036	1-12
A		13
X	US 2009269761 A1 (CAMBRIDGE ENTPR LTD) 29.10.2009.,	1-12
X	WO 2008110828 A1 (DSM IP ASSETS BV) 18.09.2008,	1-12

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
08.05.2012

Examinador  
J. Manso Tomico

Página  
1/4



Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, G06F

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, NPL, XPESP

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 08.05.2012

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-13	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 13	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-12	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Hughes Anne E. et al. A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-related macular. Nature Genetics. Abril 2007. Vol. 39. Nº. 4, página 1173-1177. ISSN 1061-4036	
D02	US 2009269761 A1 (CAMBRIDGE ENTPR LTD)	29.10.2009
D03	WO 2008110828 A1 (DSM IP ASSETS BV)	18.09.2008

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud divulga un método para predecir el riesgo de padecer degeneración macular asociada a la edad (AMD) en población caucásica española mediante la determinación de un conjunto de SNPs y su uso para desarrollar un algoritmo con el cual realizar un cálculo de probabilidades de riesgo.

Las reivindicaciones 1-12 divulgan 3 métodos distintos de predicción en base a combinaciones de SNPs diferentes para llevar a cabo tal diagnóstico. En concreto son las reivindicaciones 4, 5, 6 la que divulgan tales combinaciones. Dado que ninguno de los documentos del estado de la técnica recuperados divulgan idénticas combinaciones de SNPs para determinar el riesgo a sufrir AMD, se considera que tales combinaciones cumplirían con el requisito de novedad. Por tanto, las reivindicaciones 1-12 cumplirían con lo mencionado en el art. 6 de la ley 11/1986. Igualmente, ninguno de los documentos del estado de la técnica divulgan un algoritmo para calcular la probabilidad de sufrir AMD en base a los polimorfismos divulgados, por lo que las reivindicación 13 cumpliría con lo mencionado en el art. 6 de la ley 11/1986.

La contribución técnica de las reivindicaciones 1-12 puede considerarse como la provisión de 3 combinaciones de SNPs para ser incluidos en estudios de riesgo de sufrir AMD. Con respecto al estado de la técnica, el problema técnico planteado sería la provisión de SNPs alternativos, o combinaciones de SNPs alternativos y la provisión de oligonucleótidos utilizados en la detección de los mismos. Según se menciona en la propia solicitud sólo los SNPs rs388862 y rs6677604 serían nuevos hallazgos, los cuales, combinados con los otros SNPs ya conocidos darían lugar a las combinaciones de las reivindicaciones 5 y 6. Estos dos SNPs se encuentran en los genes CFH y CFHR1, genes ya conocidos por su relación con la enfermedad descrita (D02 tabla 1).

Así pues, tomando en consideración el estado de la técnica recuperado junto al amplio conocimiento de los factores genéticos implicados en el desarrollo de la enfermedad AMD, sería obvio para el experto en la materia la provisión de nuevos SNPs y oligonucleótidos adicionales que específicamente detecten esos SNPs. Además sería obvio esperar que distintas poblaciones estudiadas revelarían diferentes mutaciones cuando se comparasen unas y otras. Por lo tanto, las reivindicaciones 1-12 no cumplirían con lo mencionado en el art. 8 de la ley 11/1986.

Sin embargo, la provisión del algoritmo de la reivindicación 13, desarrollado para obtener datos de probabilidad sí que cumpliría el requisito de actividad inventiva, tal y como se menciona en el art. 8 de la ley 11/1986.