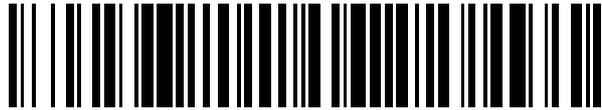


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 465**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2009 E 09708938 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014 EP 2247752**

54 Título: **Predicción y diagnóstico de la mielopatía degenerativa canina**

30 Prioridad:

04.02.2008 US 25949

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2015

73 Titular/es:

**THE CURATORS OF THE UNIVERSITY OF
MISSOURI (33.3%)**

**615 Locust Street Building, 3rd Floor
Columbia, MO 65211, US;**

**MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY
(33.3%) y**

MASSACHUSETTS GENERAL HOSPITAL (33.3%)

72 Inventor/es:

COATES, JOAN R.;

LINBLAD-TOH, KERSTIN;

WADE, CLAIRE y

JOHNSON, GARY S.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 529 465 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Predicción y diagnóstico de la mielopatía degenerativa canina

5 1. Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, a los campos de la genética molecular, la medicina veterinaria, la neurología veterinaria, la neurología humana y la medicina humana. Más concretamente, se refiere a la enfermedad veterinaria mielopatía degenerativa canina y la enfermedad humana esclerosis lateral amiotrófica. En concreto, la invención se refiere al uso de marcadores genéticos para identificar la presencia de un factor de riesgo genético principal para la mielopatía degenerativa canina, que es una enfermedad veterinaria fatal, y un modelo para la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

15 2. Descripción de la técnica relacionada

La mielopatía degenerativa canina (MDC; también conocida como radiculomielopatía degenerativa crónica) es una enfermedad neurológica común en los pastores alemanes, corgis galés y varias otras razas. La enfermedad es crónica y progresiva, y puede producir la cojera del animal y, con el tiempo, puede conducir a una amplia parálisis de las patas traseras. El animal podría quedar lisiado en unos cuantos meses o puede que sobreviva hasta 3 años. En cualquier escenario, la enfermedad debilita al animal, dificulta gravemente la calidad de vida, culmina en la eutanasia y es devastadora para los dueños de las mascotas y criadores por igual.

La MDC es una afección crónica incurable, aunque puede ser posible mantener la calidad de vida del perro durante un breve período tiempo mediante un programa adecuado de ejercicio y nutrición. Se recomienda el ejercicio para mantener la capacidad del perro para caminar, y la fisioterapia puede prolongar el período de tiempo en que el perro sigue teniendo movilidad y aumentar el tiempo de supervivencia, pero el resultado final no es favorable. Todavía no hay tratamientos de eficacia probada para detener o retardar la progresión de la MDC. Aunque no está aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos (AAF), el ácido aminocaproico (AEAC) y la n-acetilcisteína (NAC) pueden retardar la progresión, pero este tratamiento todavía es experimental y polémico.

De acuerdo con Green *et al*, 2002, "The American Genetic Association" 93:119-124, se han encontrado mutaciones en el gen humano SOD1 en la esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

Considerando la naturaleza debilitante de la enfermedad y la falta de tratamientos de eficacia probada, la identificación de marcadores genéticos para permitir la identificación de los animales que tienen predisposición a desarrollar MDC sería muy beneficiosa para los criadores y dueños de mascotas por igual.

Sumario de la invención

Así pues, de acuerdo con la presente invención, se proporciona un método de identificación de si un perro tiene o se encuentra en riesgo de desarrollar mielopatía degenerativa, o de tener crías que tengan o se encuentren en riesgo de desarrollar mielopatía degenerativa, que comprende (a) proporcionar una muestra que contenga ácido nucleico de dicho perro; y (b) evaluar la estructura de un gen SOD1 o la transcripción correspondiente al resto de aminoácido 40 del correspondiente polipéptido SOD1 en dicha muestra que contiene ácido nucleico de dicho perro; y (c) identificar si dicho perro (i) tiene o se encuentra en riesgo de desarrollar mielopatía degenerativa cuando se observa un polimorfismo en la región de codificación de SOD1 correspondiente a una sustitución homocigótica de E→K en el resto de aminoácido 40 del correspondiente polipéptido SOD1, en comparación con una transcripción o un gen SOD1 de tipo silvestre de referencia; o (iii) tiene crías que tienen o se encuentran en riesgo de desarrollar mielopatía degenerativa cuando se observa un polimorfismo en la región de codificación de SOD1 correspondiente a una sustitución heterocigótica de E→K en el resto de aminoácido 40 del correspondiente polipéptido SOD1, en comparación con una transcripción o un gen SOD1 de tipo silvestre de referencia. El perro puede ser un bóxer, un corgi galés, un retriever de Chesapeake, un Ridgeback de Rodesia, un pastor alemán, un Kerry Blue Terrier, un setter irlandés, un antiguo pastor inglés, un collie, un caniche estándar, un Fox terrier de pelo duro, otra raza, o un híbrido de los mismos. La etapa (b) puede comprender la pirosecuenciación, la hibridación de sonda competitiva, la secuenciación de terminación de cadena, la digestión de restricción, la reacción de la polimerasa específica de alelo, el análisis del polimorfismo en la configuración de una sola cadena, el análisis genético, el ensayo de discriminación alélica TaqMan[®], la electroforesis en gel de gradiente de temperatura, la reacción en cadena de la ligasa, los perfiles de la curva de fusión o la hibridación de micromatrices, el análisis de micromatrices en combinación con otros ensayos de marcadores de ácido nucleico, o puede comprender la evaluación de la estructura de un locus genético que está en desequilibrio de unión con dicho marcador genético.

La secuencia del exón 2 de SOD1 de tipo silvestre de referencia puede comprender la siguiente secuencia:

5'-ggaagtgggcctgtgtgtatcaggaaccattacagggctgactaaaggcgagcatggattccacgtccatcagttggagata
 atacacaag-3' (SEC ID N° 1)

La presente solicitud también describe un método de evaluación de un tratamiento para la mielopatía degenerativa canina o la esclerosis lateral amiotrófica que comprende evaluar la eficacia de una posible terapia contra dicha mielopatía degenerativa o esclerosis lateral amiotrófica en un perro que tiene una mutación en un gen SOD1 en comparación con una transcripción o un gen SOD1 de tipo silvestre de referencia; en el que el perro ha recibido la posible terapia. El perro puede ser un bóxer, un corgi galés, un retriever de Chesapeake, un Ridgeback de Rodesia, un pastor alemán, un Kerry Blue Terrier, un setter irlandés, un antiguo pastor inglés, un collie, un caniche estándar, un Fox terrier de pelo duro, otra raza, o un híbrido de los mismos. La mutación puede ser un polimorfismo en la región de codificación de SOD1 correspondiente a una sustitución de E→K en el resto 40 del polipéptido SOD1. La evaluación puede comprender la exploración neurológica, pruebas de electrodiagnóstico, TC/mielografía, resonancia magnética o formación de imágenes funcionales, o la evaluación puede comprender la inmunohistopatología de médula espinal.

Se contempla que cualquier método o composición descritos en el presente documento se puede implantar con respecto a cualquier otro método o composición descritos en el presente documento.

El uso de la palabra "un", "uno" o "una", cuando se usa junto con el término "que comprende" en las reivindicaciones y/o en la memoria descriptiva, puede significar "uno", pero también coincide con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno".

Estas y otras realizaciones de la invención se apreciarán y entenderán mejor si se consideran en combinación con la siguiente descripción y las figuras adjuntas. Sin embargo, se ha de entender que la siguiente descripción, aunque indica diversas realizaciones de la invención y numerosos datos específicos de la misma, se da a modo de ilustrativo y no limitante.

Breve descripción de las figuras

Las siguientes figuras forman parte de la presente memoria descriptiva, y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención se puede comprender mejor por referencia a una o más de dichas figuras en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

Fig. 1A-C – Cartografía de un locus de MD principal. (Fig. 1A) El GWA de 49,663 SNP usando 38 casos (astringencias fenotípicas 1 a 4) y 17 controles de corgi galés de Pembroke identificó un locus principal en CFA31 ($p_{\text{genoma}} = 0,18$) y señales más débiles en otros cromosomas usando 10.000 permutaciones en PLINK (38). (Fig. 1B) La región CFA31 de la asociación abarca ~1,5 Mb e incluye *SOD1*. Se muestran los valores de *P* de la cartografía fina con 90 SNP en 63 casos (niveles de astringencias fenotípicas 1-3) y 144 controles de 5 razas (Bóxer, 8/15 [caso/control]; retriever de Chesapeake, 9/48; perro pastor alemán, 4/54; corgi galés de Pembroke, 35/17; y ridgeback de Rodesia, 7/8), así como la asociación de la mutación sin sentido, que fue analizada por separado. (Fig. 1C). Los datos de cartografía fina muestran que un haplotipo de 195 kb que rodea la mutación de *SOD1* está asociado en las 5 razas y que este haplotipo es más antiguo que la mutación de *SOD1*.

Fig. 2A-B - Histopatología de médula espinal. (Fig. 2A) Tinción con azul rápido de luxol y ácido peryódico de Schiff de una sección transversal de médula espinal torácica de un corgi galés de Pembroke de 13 años de vida afectado de MD. La degeneración de la sustancia blanca está representada por las regiones de palidez donde ha habido pérdida de fibras nerviosas. (Fig. 2B) Una sección transversal de médula espinal teñida de manera similar de un retriever labrador de 13 años de vida sano. Cabe señalar que no hay pruebas de la pérdida de fibras nerviosas. La barra en la parte inferior derecha de la microfotografía indica el aumento.

Fig. 3A-I - Tinción inmunohistoquímica con anticuerpo contra SOD1. Secciones representativas de médulas espinales de 3 perros de control asintomáticos homocigotos G/G (Fig. 3A-C), 3 perros de control asintomáticos heterocigotos A/G (Fig. 3D-F) y 3 perros homocigotos A/A con un diagnóstico confirmado de MD (Fig. 3G-I). Las muestras procedían de un ridgeback de Rodesia de 13 años de vida (Fig. 3A), un retriever labrador de 8 años de vida (Fig. 3B), un retriever labrador de 13 años de vida (Fig. 3C), un pastor australiano de 8 años de vida (Fig. 3D), un terrier tibetano de 13 años de vida (Fig. 3E), un pastor alemán de 8 años de vida (Fig. 3F), un ridgeback de Rodesia de 8 años de vida (Fig. 3G), un corgi galés de Pembroke de 13 años de vida (Fig. 3H) y un bóxer de 10 años de vida (Fig. 3I). La barra de la Fig. 3A indica el aumento para todas las secciones transversales de médula espinal.

Fig. 4A-D - Histopatología de músculo esquelético y nervios periféricos en MD avanzada. (Fig. 4A) Las secciones en parafina teñidas con H&S del músculo gastrocnemio de un corgi galés de Pembroke de 13 años de vida afectado de MD mostraron una variabilidad excesiva en el tamaño de las miofibras con grupos grandes y pequeños de fibras atroficas coincidentes con la denervación. (Fig. 4B) A modo comparativo, un músculo gastrocnemio teñido de manera similar de un perro de control de la misma edad. (Fig. 4C) Las secciones

introducidas en resina teñida con azul de toluidina del nervio peroneo del mismo corgi galés de Pembroke mostraron la pérdida sustancial de fibras mielinizadas, fibrosis endoneurial y desmielinización secundaria. (Fig. 4D) A modo comparativo, un nervio peroneo teñido de manera similar de un perro de control de la misma edad. Las barras de la parte inferior derecha de todas las figuras indican el aumento.

5 Fig. 5 - Distribuciones de las edades en el muestreo de los homocigotos A/A del grupo de control de razas afectadas y las edades en la aparición de los signos clínicos en los perros afectados de MD

Descripción detallada de las realizaciones ilustrativas

10 I. La presente invención

La mielopatía degenerativa canina (MDC) es una enfermedad neurológica incapacitante y fatal común en varias razas caninas. La enfermedad es crónica y progresiva, y los únicos "tratamientos" - terapia física y nutrición - tienen una capacidad limitada para retrasar la aparición de la enfermedad. En última instancia, las patas traseras del perro se vuelven inútiles, momento en el que la eutanasia puede ser la única opción. Si la eutanasia se retrasa, la enfermedad ascenderá hasta afectar a las patas delanteras. En general, la progresión de la enfermedad es lenta pero inevitable. Como se ha tratado anteriormente, la etiología de esta enfermedad es desconocida, aunque se considera que la base puede ser genética. Por ello, es de gran importancia para los criadores poder identificar los perros que portan un factor de riesgo genético, para poderse evitar los apareamientos que produzcan cachorros que estén en mayor riesgo de desarrollar la MDC cuando sean mayores. Además, el genotipo de un perro con respecto a un factor de riesgo genético puede ayudar a confirmar o refutar un diagnóstico de MDC en un perro que presente signos clínicos de la enfermedad.

Los inventores han cartografiado el locus de riesgo para la MDC hasta la región de CFA31 en corgis galeses de Pembroke. Dentro de esta región cromosómica, descubrieron una mutación sin sentido (E40K) en el gen de la superóxido dismutasa 1 (SOD1) canina, y observaron que el alelo K es común en otras varias razas. Finalmente, los inventores han demostrado que la homocigosis para el alelo K es un importante factor de riesgo genético para la MDC. Es de gran importancia para los criadores y propietarios poder identificar los animales "en riesgo", así como los animales que puedan transmitir la enfermedad a las generaciones futuras. Los marcadores genéticos para el alelo de alto riesgo facilitarán el diagnóstico de la MDC. Estos marcadores también permitirán a los criadores seleccionar apareamientos que produzcan cachorros con mucho menor riesgo de desarrollar la MDC. Las mutaciones sin sentido en el gen SOD1 humano causan esclerosis lateral amiotrófica (ELA), una enfermedad con muchas similitudes clínicas y patológicas con la MDC. Por lo tanto, los perros con MDC son posibles modelos animales para la enfermedad ELA humana. Los marcadores de DMA pueden ayudar a identificar los perros que son homocigotos para el alelo A y, por lo tanto, se pueden usar como un modelo animal para investigar la mecanismo de la enfermedad subyacente o para evaluar los posibles tratamientos para la ELA o la MDC.

II. Mielopatía degenerativa canina (MDC)

40 La mielopatía degenerativa canina (también conocida como radiculomielopatía degenerativa crónica) es una enfermedad neurológica frecuente en los pastores alemanes, bóxer, ridgeback de Rodesia, retriever de Chesapeake, corgis galeses de Pemroke y Cardigan, y otros perros de pura raza o mestizos. La enfermedad es crónica y progresiva, y puede generar cojera en el animal, y finalmente la muerte.

45 La enfermedad normalmente se manifiesta entre los siete y catorce años de vida, y afecta inicialmente a las patas traseras, causando debilidad y pérdida muscular, así como falta de coordinación. Esto provoca un efecto asombroso que pueda parecerse a la artritis. El perro puede arrastrar una o ambas patas traseras al caminar. Este arrastre puede desgastar las uñas de una pata. Con el tiempo, la afección puede conducir a la parálisis extendida de las patas traseras. A medida que la enfermedad va progresando, el animal comienza a tener considerables dificultades para caminar y, finalmente, las patas traseras se vuelven inútiles, momento en que la eutanasia puede ser la única opción. Si la eutanasia se retrasa, los signos clínicos progresarán hasta afectar a las patas delanteras. En general, la progresión de la enfermedad es lenta. El animal podría quedar lisiado en unos cuantos meses, o los miembros de las razas más pequeñas puede que sobrevivan hasta 3 años, por lo que los propietarios pueden retrasar la eutanasia, debido a la facilidad de portar a los perros de menor tamaño.

55 Se han de excluir las causas conocidas de la disfunción de la médula espinal antes de aceptar el diagnóstico de mielopatía degenerativa. La enfermedad del disco cervical (protrusión o ruptura) puede causar contusiones y compresión de la médula espinal con todos los signos de mielopatía degenerativa. La mielopatía degenerativa canina solo se puede diagnosticar por histopatología de la médula espinal. Las lesiones demuestran la pérdida axonal y de mielina reemplazada por gliosis en todos los funículos de la médula espinal, más grave en la parte dorsal de los funículos laterales de la mitad de la médula espinal torácica caudal.

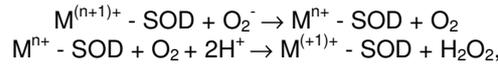
60 Se trata de una afección crónica incurable. Sin embargo, puede que sea posible mantener temporalmente la calidad de vida del perro a través de un programa adecuado de ejercicio y nutrición. No existen tratamientos de eficacia probada para alterar la progresión de la mielopatía degenerativa. Se recomienda el ejercicio para mantener la capacidad del perro para caminar, y la fisioterapia puede prolongar el período de tiempo que el perro sigue teniendo

movilidad y aumentar el tiempo de supervivencia. La hidroterapia canina (natación) puede ser más útil que caminar. Aunque no está aprobado por la Administración de Alimentos y Fármacos (AAF), hay quien cree que el ácido aminocaproico (AEAC) y la n-acetilcisteína (NAC) pueden retardar la progresión.

5 **III. Superóxido dismutasa**

El enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación del superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Como tal, se trata de una importante defensa antioxidante en casi todas las células expuestas al oxígeno. La dismutación catalizada por SOD del superóxido se puede escribir con los siguientes semirreacciones:

10



15

donde M = Cu (n = 1); Mn (n = 2); Fe (n = 2); Ni (n = 2). En esta reacción, el estado de oxidación del catión metálico oscila entre n y n + 1.

Las SOD antes se conocían como varias metaloproteínas con función desconocida (por ejemplo, CuZnSOD se conocía como eritrocupreína). Existen varias formas comunes de SOD, cofactorizadas con cobre y cinc, o manganeso, hierro o níquel.

20

Las mitocondrias del hígado de pollo (y casi todas las demás) y muchas bacterias (tales como *E. coli*) contienen una forma con manganeso (Mn-SOD). Los ligandos de los iones de manganeso son 3 cadenas laterales de histidina, una cadena lateral de aspartato y una molécula de agua o ligando hidroxilo dependiendo del estado de oxidación del Mn (respectivamente II y III). *E. coli* y muchas otras bacterias también contienen una forma de la enzima con hierro (Fe-SOD); algunas bacterias contienen Fe-SOD, otras, Mn-SOD, y algunas contienen ambas. Los sitios activos de las Mn y Fe superóxido dismutasas contienen el mismo tipo de cadenas laterales de aminoácidos. En los seres humanos, hay tres formas de superóxido dismutasa. SOD1 se encuentra en el citoplasma, SOD2, en las mitocondrias, y SOD3 es extracelular. La primera es un dímero (consiste en dos unidades), mientras que las otras son tetrameros (cuatro subunidades). SOD1 y SOD3 contienen cobre y cinc, mientras que SOD2 tiene manganeso en su centro reactivo. Los genes se encuentran en los cromosomas humanos 21, 6 y 4, respectivamente (21q22.1, 6q25.3 y 4p15.3-p15.1). Hay disponible un ensayo de placa de microtitulación de SOD.

25

30

A. Función de SOD1

35

Los citosoles de casi todas las células eucariotas contienen una enzima SOD con cobre y cinc (Cu-Zn-SOD). La enzima Cu-Zn es un homodímero de peso molecular 32.500. Las dos subunidades están unidas principalmente por interacciones hidrófobas y electrostáticas. Los ligandos de cobre y cinc son cadenas laterales de histidina.

40

En resumen, la SOD compite dañando las reacciones del superóxido, protegiendo así a la célula de la toxicidad del superóxido. La reacción del superóxido con los no radicales es de espín prohibido. En los sistemas biológicos, esto significa que sus principales reacciones son consigo mismo (dismutación) o con otro radical biológico tal como el óxido nítrico (NO). El radical anión superóxido (O_2^-) se dismuta espontáneamente en O_2 y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) con bastante rapidez ($\sim 10^5 M^{-1}s^{-1}$ a pH 7). La SOD es biológicamente necesaria, porque el superóxido reacciona todavía más rápido con ciertas dianas tales como el radical NO, lo que forma peroxinitrito. Del mismo modo, la velocidad de dismutación es de segundo orden con respecto a la concentración inicial de superóxido. Por lo tanto, la semivida del superóxido, aunque es muy corta a altas concentraciones (por ejemplo, 0,05 segundos a 0,1 mM), en realidad, es bastante larga a bajas concentraciones (por ejemplo, 14 horas a 0,1 nM). Por el contrario, la reacción del superóxido con SOD es de primer orden con respecto a la concentración de superóxido. Por otra parte, el superóxido tiene el número de renovación más rápida (velocidad de reacción con su sustrato) de cualquier enzima conocida ($\sim 10^9 M^{-1}s^{-1}$), estando dicha reacción solo limitada por la frecuencia de colisión entre sí y el superóxido. Es decir, la velocidad de reacción está "limitada por la difusión".

45

50

B. SOD1 en la enfermedad

55

Las mutaciones de SOD1 se han relacionado con la esclerosis lateral amiotrófica familiar (ELA, una forma de enfermedad de las neuronas motoras). Los otros dos tipos no se han relacionado con ninguna de las enfermedades humanas, sin embargo, en ratones, la inactivación de SOD2 provoca letalidad perinatal, y la inactivación de SOD1 genera carcinoma hepatocelular. Las mutaciones de SOD1 pueden causar ELA familiar mediante un mecanismo que actualmente no se comprende, pero no debido a la pérdida de la actividad enzimática. La sobreexpresión de SOD1 se ha relacionado con el síndrome de Down. Antes de este trabajo, la SOD1 canina no se ha relacionado con ningún estado patológico en particular.

60

C. Proteína SOD1 canina y estructura de ADNc

65

Secuencia de codificación de ADNc canino de tipo silvestre

atggagatgaaggccgtgtgcgtgtgaaaggccaggcccccgggggagggcaccatccacttcgtgcagaagggaagtg
 ggccctgtgtggtatcaggaaaccattacagggctgactgaaggcgagcatggattccacgtccatcagtttggagataatacacaaggo
 tgtactagtgcaggctcctcactttaatcctctgtccaaaaaacatgggtgggcccaaaagatcaagaaggagcaltgttggagaacctgggcaat
 gtgactgctggcaaggatggcgtggcca.tgtgtocatagaagattctctgattgcactctcaggagactattccatcattggccgcacca
 tgggtgtccacgagaaacgagatgacttgggcaaaagggtgacaatgaagaaagtacacagacaggaaacgccgggagtcgtttggctt
 gtgggtgcatigggatgcccaagtaa (SEC ID N° 6)

Secuencia de codificación de ADNc canino variante:

atggagatgaaggccgtgtgcgtgtgaaaggccaggcccccgggggagggcaccatccacttcgtgcagaagggaagtggccctgt
 tgtgtatcaggaaaccattacagggctgactgaaggcgagcatggattccacgtccatcagtttggagataatacacaaggctgtacta
 gtgcaggctcctcactttaatcctctgtccaaaaaacatgggtgggcccaaaagatcaagaaggagcaltgttggagacctgggcaatgtgact
 gotggcaaggatggcgtggccattgtgtccatagaagattctctgattgcactctcaggagactattccatcattggccgcaccatgggt

gtccacgagaaacgagatgacttgggcaaaagggtgacaatgaagaaaglacacagacaggaaacgccgggagtcgtttggcttgggt
 gtcattgggatgcccaagtaa (SEC ID N° 7)

5

Secuencia de aminoácidos de tipo silvestre predicha:

MEMKAVCVLKGQGPVEGTIHFVQKGS GPVVVSGTITGLTEGEHGFHVHQFGDNTQG
 CTSAGPHFNPLSKKHGGPKDQERHVGDLGNVTAGKDGVAIVSIEDSLIALSGDYSIIG
 RTMVVHEKRDDLKGDNEESTQTGNAGSRLACGVIGIAK* (SEC ID N° 8)

10

Secuencia de aminoácidos variante predicha:

MEMKAVCVLKGQGPVEGTIHFVQKGS GPVVVSGTITGLTKGEHGFHVHQFGDNTQG
 CTSAGPHFNPLSKKHGGPKDQERHVGDLGNVTAGKDGVAIVSIEDSLIALSGDYSIIG
 RTMVVHEKRDDLKGDNEESTQTGNAGSRLACGVIGIAK* (SEC ID N° 9)

15 **IV. Exploración genética de SOD1 canina**

Dado que la variante genética se encuentra en una región de codificación del gen SOD1 y afecta a la proteína
 codificada, la presencia del polimorfismo E40K se puede determinar a partir de bien la secuencia de la proteína
 SOD1, de la secuencia del ácido nucleico SOD1 o de un marcador genético que se encuentra en desequilibrio de
 20 unión con el polimorfismo E40K. Como resultado de ello, se puede emplear varias metodologías diferentes.

A. Ácidos nucleicos

Ciertas realizaciones de la presente divulgación se refieren al análisis de ácidos nucleicos, incluyendo el uso de
 25 cebadores de amplificación, sondas de oligonucleótidos y otros elementos de ácido nucleico implicados en el
 análisis de transcripciones de ARNm, ADNc o ADN genómico. La expresión "ácido nucleico" es muy conocida en la
 técnica. Un "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere, en general, a una molécula (es
 decir, una cadena) de ADN o ARN compuesta, en parte, por bases de nucleótidos. Las nucleobases incluyen, por
 ejemplo, bases de purina o pirimidina de origen natural encontradas en el ADN (por ejemplo, una adenina "A", una
 30 guanina "G", una timina "T" o una citosina "C") o ARN (por ejemplo, una A, una G, un uracilo "U" o una C). La
 expresión "ácido nucleico" engloba los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido", cada uno como un subgénero de
 la expresión "ácido nucleico. "El término "oligonucleótido" se refiere a una molécula de entre aproximadamente 3 y
 aproximadamente 100 nucleobases de longitud. El término "polinucleótido" se refiere a al menos una molécula de
 más de aproximadamente 100 nucleobases de longitud. Un "gen" se refiere a la secuencia de codificación de un

producto génico, así como a intrones y al promotor del producto génico.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos de la divulgación comprenden o son complementarios a todos o a 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1.000, 1.100, 1.165, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500 o más nucleótidos contiguos, o cualquier intervalo derivable en los mismos, de la secuencia de SOD1 canina ya sea con una G o una A en la posición 118 de la secuencia de ADNc de la SOD1 canina. El experto en la materia sabe cómo diseñar y usar cebadores y sondas para la hibridación y amplificación, incluyendo los límites de homología necesarios para implantar cebadores y sondas.

Estas definiciones se refieren, en general, a una molécula monocatenaria, pero, en realizaciones específicas, también engloban una cadena adicional que es parcial, sustancial o totalmente complementaria a la molécula monocatenaria. Por lo tanto, un ácido nucleico puede englobar una molécula bicatenaria o una molécula tricatenaria que comprenda una o más cadenas complementarias o "complemento/s" de una determinada secuencia que comprende una molécula. Como se usa en el presente documento, un ácido nucleico monocatenario se puede indicar con el prefijo "mc", un ácido nucleico bicatenario, mediante el prefijo "bc" y un ácido nucleico tricatenario, con el prefijo "tc".

En aspectos particulares, un ácido nucleico codifica una proteína, un polipéptido o un péptido. En ciertas realizaciones, la presente divulgación se refiere a nuevas composiciones que comprenden al menos una molécula proteica. Como se usa en el presente documento, una "molécula proteica", "composición proteica", "compuesto proteico", "cadena proteica" o "material proteico" se refiere, en general, pero sin limitación, a una proteína de más de aproximadamente 200 aminoácidos o la secuencia endógena de longitud completa traducida de un gen; un polipéptido de más de aproximadamente 100 aminoácidos y/o un péptido de aproximadamente 3 a aproximadamente 100 aminoácidos. Todos los términos "proteicos" descritos anteriormente se pueden usar de manera intercambiable en el presente documento.

1. Preparación de ácidos nucleicos

Es posible crear un ácido nucleico mediante cualquier técnica conocida por el experto habitual en la materia, tal como, por ejemplo, síntesis química, producción enzimática o producción biológica. Los ejemplos no limitantes de ácido nucleico sintético (por ejemplo, un oligonucleótido sintético), incluyen un ácido nucleico creado por síntesis química *in vitro* usando la química de fosfotriéster, fosfito o fosforamidita, y técnicas en fase sólida tales como las descritas en la patente europea 266.032, o por medio de productos intermedios de desoxinucleósido-H-fosfonatos según lo descrito por Froehler *et al.*, 1986 y la patente de EE.UU. N° 5.705.629, cada una incorporada en el presente documento por referencia. En los métodos de la presente divulgación, se pueden usar uno o más oligonucleótidos. Se han desvelado varios mecanismos diferentes de síntesis de oligonucleótidos en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 4.659.774, 4.816.571, 5.141.813, 5.264.566, 4.959.463, 5.428.148, 5.554.744, 5.574.146, 5.602.244.

Un ejemplo no limitante de un ácido nucleico producido enzimáticamente incluye aquel producido por enzimas en reacciones de amplificación tales como PCR™ (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 4.683.202 y 4.682.195) o la síntesis de un oligonucleótido descrita en la patente de EE.UU. N° 5.645.897. Un ejemplo no limitante de un ácido nucleico producido biológicamente incluye un ácido nucleico recombinante producido (es decir, reproducido) en una célula viva, tal como un vector de ADN recombinante replicado en bacterias (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.* 2001).

2. Purificación de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos se pueden purificar sobre geles de poliacrilamida, gradientes de centrifugación de cloruro de cesio, columnas de cromatografía o mediante cualquier otro medio conocido por el experto habitual en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 2001). En algunos aspectos, un ácido nucleico es un ácido nucleico farmacológicamente aceptable. Las composiciones farmacológicamente aceptables son conocidas por los expertos en la materia, y se describen en el presente documento.

En ciertos aspectos, la presente divulgación se refiere a un ácido nucleico que es un ácido nucleico aislado. Como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico aislado" se refiere a una molécula de ácido nucleico (por ejemplo, una molécula de ARN o ADN) que se ha aislado libre de, o está, de otro modo, libre de, la mayor parte de los ácidos nucleicos genómicos y transcritos totales de una o más células. En ciertas realizaciones, "ácido nucleico aislado" se refiere a un ácido nucleico que se ha aislado libre de, o está, de otro modo, libre de, la mayor parte de los componentes celulares o los componentes de reacción *in vitro* tales como, por ejemplo, macromoléculas tales como lípidos o proteínas, pequeñas moléculas biológicas, y similares.

3. Segmentos de ácido nucleico

En ciertas realizaciones, el ácido nucleico es un segmento de ácido nucleico. Como se usa en el presente documento, la expresión "segmento de ácido nucleico" son fragmentos de un ácido nucleico tales como, para un ejemplo no limitante, los que codifican solo parte de un locus del gen o una secuencia génica. Por lo tanto, un "segmento de ácido nucleico" puede comprender cualquier parte de una secuencia de genes, incluyendo de aproximadamente 2 nucleótidos al gen de longitud completa incluyendo las regiones promotoras hasta la señal de poliadenilación y cualquier longitud que incluya toda la región codificante.

Se pueden diseñar varios segmentos de ácido nucleico basándose en una secuencia de ácido nucleico concreta, y pueden ser de cualquier longitud. Mediante la asignación de valores numéricos a una secuencia, por ejemplo, el primer resto es 1, el segundo resto es 2, etc., se puede crear un algoritmo que define a todos los segmentos de ácido nucleico:

$$n \text{ a } n + y$$

donde n es un número entero de 1 al último número de la secuencia e y es la longitud del segmento de ácido nucleico menos uno, donde n + y no superan al último número de la secuencia. Así pues, para un 10-mero, los segmentos de ácido nucleico corresponden a las bases 1 a 10, 2 a 11, 3 a 12 y así sucesivamente. Para un 15-mero, los segmentos de ácido nucleico corresponden a las bases 1 a 15, 2 a 16, 3 a 17 y así sucesivamente. Para un 20-mero, los segmentos nucleicos corresponden a las bases 1 a 20, 2 a 21, 3 a 22 y así sucesivamente. En ciertas realizaciones, el segmento de ácido nucleico puede ser una sonda o un cebador. Como se usa en el presente documento, una "sonda" se refiere, en general, a un ácido nucleico usado en un método de detección o una composición. Como se usa en el presente documento, un "cebador" se refiere, en general, a un ácido nucleico usado en un método de extensión o amplificación, o una composición.

4. Complementos de ácido nucleico

La presente divulgación también engloba un ácido nucleico que es complementario a un ácido nucleico. Un ácido nucleico es "complemento/s" de o es "complementario" a otro ácido nucleico cuando es capaz de realizar un apareamiento de bases con otro ácido nucleico de acuerdo con las reglas de complementariedad de unión convencionales de Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen inversas. Como se usa en el presente documento, "otro ácido nucleico" se puede referir a una molécula separada o una secuencia separada espacial de la misma molécula. En realizaciones preferidas, un complemento es una sonda de hibridación o un cebador de amplificación para la detección de un polimorfismo de ácido nucleico.

Como se usa en el presente documento, el término "complementario" o "complemento" también se refiere a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleobases consecutivas o nucleobases semiconsecutivas (por ejemplo, uno o más restos de nucleobases no están presentes en la molécula) capaces de hibridarse con otra cadena o dúplex de ácido nucleico, incluso si una cantidad inferior al total de las nucleobases no realizan apareamiento de bases con una nucleobase homóloga. Sin embargo, en algunas realizaciones de diagnóstico o detección, se prefieren los ácidos nucleicos totalmente complementarios.

5. Detección y evaluación de ácidos nucleicos

Los expertos en la materia reconocerán fácilmente que las moléculas de ácido nucleico pueden ser moléculas bicatenarias y que la referencia a un determinado sitio situado en una cadena se refiere, también, al sitio correspondiente de una cadena complementaria. Por lo tanto, al definir un sitio polimórfico, la referencia a una adenina, una timina (uridina), una citosina o una guanina en un determinado sitio de la cadena (sentido o codificante) de signo positivo de una molécula de ácido nucleico también pretende incluir la timina (uridina), adenina, guanina o citosina (respectivamente) en el sitio correspondiente de una cadena (antisentido o no codificante) de signo negativo de una cadena complementaria de una molécula de ácido nucleico. Por lo tanto, se puede hacer referencia a cualquiera de las cadenas y seguir comprendiendo el mismo sitio polimórfico, y se puede diseñar un oligonucleótido para que se hibride con cualquiera de las cadenas. En todo el texto, en la identificación de un sitio polimórfico, se hace referencia a la cadena sentido, solo para mayor claridad.

Por lo general, la mezcla de ácido nucleico se aísla de una muestra biológica tomada del individuo, tal como una muestra de sangre o una muestra de tejido, usando técnicas convencionales tales como las desveladas en Jones (1963). Las muestras de tejidos adecuadas incluyen sangre entera, semen, saliva, lágrimas, orina, materia fecal, sudor, mucosa bucal, piel y cabello. La mezcla de ácido nucleico puede estar compuesta de ADN genómico, ARNm, o ADNc y, en los dos últimos casos, la muestra biológica se debe obtener de un órgano en el que se exprese el gen SOD1. Además, el experto en la materia entenderá que los preparados de ARNm o ADNc no se usarán para detectar polimorfismos localizados en intrones ni en regiones 5' y 3' no transcritas. Si se aísla un fragmento de gen SOD1, debe contener e/los sitio/s polimórfico/s que se van a genotipar. En los métodos de genotipado usados en la presente divulgación, la identidad de un nucleótido (o par de

nucleótidos) en un sitio polimórfico se puede determinar mediante la amplificación de una o varias regiones diana que contengan el/los sitio/s polimórfico/s directamente de una o ambas copias del gen SOD1 presente en el individuo y la secuencia de la una o más regiones amplificadas determinada mediante métodos convencionales. El experto en la materia apreciará fácilmente que solo se detectará un nucleótido en un sitio polimórfico en los individuos que sean homocigotos en ese sitio, mientras que se detectarán dos nucleótidos diferentes si el individuo es heterocigoto para ese sitio. El polimorfismo se puede identificar directamente, lo que se conoce como identificación de tipo positivo, o por inferencia, denominada identificación de tipo negativo. Por ejemplo, cuando se sabe que un SNP es guanina y citosina en una población de referencia, se puede determinar positivamente que un sitio es bien guanina o citosina para un individuo homocigoto en ese sitio, o tanto guanina como citosina, si el individuo es heterocigoto en ese sitio. Como alternativa, se puede determinar negativamente que el sitio no es guanina (y, por tanto, citosina/citosina) o no es citosina (y, por tanto, guanina/guanina).

La una o varias regiones diana se pueden amplificar usando cualquier método de amplificación dirigida por oligonucleótido, incluyendo, pero sin limitación, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (patente de EE.UU. Nº 4.965.188), la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Barany *et al.*, 1991; WO90/01069) y el ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA) (Landegren *et al.*, 1988). Los oligonucleótidos útiles como cebadores o sondas en dichos métodos se deberían hibridar específicamente a una región del ácido nucleico que contenga o sea adyacente al sitio polimórfico. Por lo general, los oligonucleótidos tienen entre 10 y 35 nucleótidos de longitud y, preferentemente, entre 15 y 30 nucleótidos de longitud. Lo más preferentemente, los oligonucleótidos tienen de 20 a 25 nucleótidos de longitud. La longitud exacta del oligonucleótido dependerá de muchos factores que son considerados y puestos en práctica habitualmente por el experto en la materia.

Se pueden usar otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico conocidos para amplificar la región diana incluyendo los sistemas de amplificación basados en la transcripción (patente de EE.UU. Nº 5.130.238; EP 329.822; Patentes de EE.UU. Nº 5.169.766, WO89/06700) y métodos isotérmicos (Walker *et al.*, 1992).

También se puede ensayar un polimorfismo en la región diana antes o después de la amplificación usando uno de varios métodos basados en la hibridación conocidos en la técnica. Por lo general, en la realización de dichos métodos, se utilizan los oligonucleótidos específicos de alelo. Los oligonucleótidos específicos de alelo se pueden usar como pares de sondas marcadas de forma diferente, mostrando un miembro del par una coincidencia perfecta con una variante de una secuencia diana, y mostrando el otro miembro una coincidencia perfecta con una variante diferente. En algunas realizaciones, se puede detectar a la vez más de un sitio polimórfico usando un conjunto de oligonucleótidos o pares de oligonucleótidos específicos de alelo.

La hibridación de un oligonucleótido específico de alelo a un polinucleótido diana se puede realizar con ambas entidades en solución, o dicha hibridación se puede realizar cuando bien el oligonucleótido o el polinucleótido diana esté covalentemente o no covalentemente fijado a un soporte sólido. La unión puede estar mediada, por ejemplo, por interacciones anticuerpo-antígeno, poli-L-Lys, estreptavidina o avidina-biotina, puentes de sal, interacciones hidrófobas, enlaces químicos, horneado de reticulación por UV, etc. Los oligonucleótidos específicos de alelo se pueden sintetizar directamente sobre el soporte sólido o unirse al soporte sólido tras la síntesis. Los soportes sólidos adecuados para su uso en los métodos de detección de la invención incluyen sustratos hechos de silicio, vidrio, plástico, papel y similares, que se pueden formar, por ejemplo, en pocillos (como en placas de 96 pocillos), portaobjetos, láminas, membranas, fibras, chips, placas y perlas. El soporte sólido se puede tratar, recubrir o derivatizar para facilitar la inmovilización del oligonucleótido específico de alelo o del ácido nucleico diana.

El genotipo para uno o más sitios polimórficos en el gen de un individuo también se puede determinar por hibridación de una o ambas copias del gen, o un fragmento del mismo, a matrices y submatrices de ácido nucleico tal como se describe en el documento WO 95/11995. Las matrices contendrían una batería de oligonucleótidos específicos de alelo que representan cada uno de los sitios polimórficos que se va a incluir en el genotipo o haplotipo.

La identidad de los polimorfismos también se puede determinar usando una técnica de detección de desapareamientos, incluyendo, pero sin limitación, el método de protección de ARNasa usando ribosondas (Winter *et al.*, 1985; Meyers *et al.*, 1985) y proteínas que reconocen desapareamientos de nucleótidos tales como la proteína mutS de *E. coli* (Modrich, 1991). Como alternativa, los alelos variantes se pueden identificar mediante el análisis del polimorfismo en las configuraciones de una sola cadena (SSCP) (Orita *et al.*, 1989; Humphries, *et al.*, 1996) o electroforesis en gradiente de gel desnaturante (DGGE) (Wartell *et al.*, 1990; Sheffield *et al.*, 1989).

También se puede usar un método de extensión de cebadores mediada por polimerasa para identificar el/los polimorfismo/s. Varios de dichos métodos se han descrito en la literatura científica y de patentes. Los cebadores extendidos que contienen un polimorfismo se pueden detectar por espectrometría de masas como se describe en la patente de EE.UU. Nº 5.605.798. Otro método de extensión de cebadores es la PCR específica de alelo (Ruano *et al.*, 1989; Ruano *et al.*, 1991; WO 93/22456; Turki *et al.*, 1995).

a. Hibridación

El uso de una sonda o un cebador de entre 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 nucleótidos, preferentemente de entre 17 y 100 nucleótidos de longitud, o en algunos aspectos de la divulgación, de hasta 1-2 kilobases o más de longitud, permite la formación de una molécula dúplex que es tanto estable como selectiva. En general, se prefieren las moléculas que tengan secuencias complementarias en tramos contiguos superiores a 20 bases de longitud para aumentar la estabilidad y/o la selectividad de las moléculas híbridadas obtenidas. En general, se preferirá diseñar moléculas de ácido nucleico para la hibridación que tengan una o más secuencias complementarias de 20 a 30 nucleótidos, o incluso más largas si se desea. Dichos fragmentos se pueden preparar fácilmente, por ejemplo, sintetizando directamente el fragmento mediante medios químicos o introduciendo secuencias seleccionadas en vectores recombinantes para la producción recombinante.

Por consiguiente, las secuencias de nucleótidos de la divulgación se pueden usar por su capacidad para formar selectivamente moléculas dúplex con tramos complementarios de ADN y/o ARN o para proporcionar cebadores para la amplificación de ADN o ARN de muestras. Dependiendo de la aplicación prevista, se podría desear emplear condiciones variables de hibridación para alcanzar grados variables de selectividad de la sonda o de los cebadores por la secuencia diana.

Para las aplicaciones que requieren una alta selectividad, normalmente, se deseará emplear condiciones de rigurosidad relativamente alta para formar los híbridos. Por ejemplo, las condiciones de salinidad relativamente baja y/o temperatura alta, tales como las proporcionadas por NaCl aproximadamente 0,02 M a aproximadamente 0,10 M a temperaturas de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C. Dichas condiciones de alta rigurosidad toleran poco, si es que toleran algo, el desapareamiento entre la sonda o los cebadores y el molde o la cadena diana, y serían particularmente adecuadas para aislar genes específicos o para detectar un polimorfismo específico. En general, se aprecia que las condiciones se pueden volver más rigurosas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida. Por ejemplo, en condiciones muy rigurosas, se puede llevar a cabo la hibridación a ADN unido al filtro en NaHPO₄ 0,5 M, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7 %, EDTA 1 mM a 65 °C y lavado en 0,1 x SSC/SDS al 0,1 % a 68 °C (Ausubel *et al.*, 1989).

Las condiciones se pueden volver menos rigurosas aumentando la concentración de sal y/o disminuyendo la temperatura. Por ejemplo, se podría proporcionar una condición de rigurosidad media mediante NaCl aproximadamente 0,1 a 0,25 M a temperaturas de aproximadamente 37 °C a aproximadamente 55 °C, mientras que se podría proporcionar una condición de baja rigurosidad mediante sal aproximadamente 0,15 M a aproximadamente 0,9 M, a temperaturas que varían de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 55 °C. En condiciones de baja rigurosidad, tales como condiciones moderadamente rigurosas, se podría llevar a cabo el lavado, por ejemplo, en 0,2 x SSC/SDS al 0,1 % a 42 °C (Ausubel *et al.*, 1989). Las condiciones de hibridación se pueden manipular fácilmente dependiendo de los resultados deseados.

En otras realizaciones, la hibridación se puede realizar en condiciones de, por ejemplo, Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, ditiotritol 1,0 mM, a temperaturas entre aproximadamente 20 °C a aproximadamente 37 °C. Otras condiciones de hibridación utilizadas podrían incluir Tris-HCl aproximadamente 10 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, a temperaturas que varían de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 72 °C.

En ciertas realizaciones, será ventajoso emplear ácidos nucleicos de secuencias definidas de la presente invención en combinación con un medio apropiado, tal como un marcador, para determinar la hibridación. En la técnica, se conoce una amplia variedad de medios indicadores apropiados, incluyendo ligandos fluorescentes, radiactivos, enzimáticos u otros ligandos, tales como avidina/biotina, que son capaces de ser detectados. En realizaciones preferidas, se puede desear emplear un marcador fluorescente o una etiqueta enzimática tal como ureasa, fosfatasa alcalina o peroxidasa, en lugar de reactivos radiactivos u otros reactivos ambientalmente no deseados. En el caso de las etiquetas enzimáticas, se sabe que se pueden emplear sustratos indicadores colorimétricos para proporcionar un medio de detección que sea visible o detectable espectrofotométricamente, con el fin de identificar la hibridación específica con muestras que contengan ácidos nucleicos complementarios. En otros aspectos, puede haber un sitio de escisión de nucleasa en particular, pudiéndose determinar la detección de una determinada secuencia de nucleótidos por la presencia o ausencia de la escisión del ácido nucleico.

En general, se prevé que las sondas o los cebadores descritos en el presente documento sean útiles como reactivos en la hibridación en solución, como en PCR, para la detección de la expresión o del genotipo de los genes correspondientes, así como en realizaciones que empleen una fase sólida. En realizaciones que implican una fase sólida, el ADN (o ARN) de ensayo es adsorbido o fijado de otro modo a una matriz o superficie seleccionada. Este ácido nucleico monocatenario fijado se somete luego a hibridación con sondas seleccionadas en las condiciones deseadas. Las condiciones seleccionadas dependerán de las circunstancias particulares (dependiendo, por ejemplo, del contenido de G + C, tipo de ácido nucleico diana, fuente de ácido nucleico, tamaño de sonda de hibridación, etc.). La optimización de las condiciones de hibridación para la aplicación particular de interés es bien conocida por los expertos en la materia. Después del lavado de las moléculas hibridadas para eliminar las moléculas de sonda unidas inespecíficamente, se detecta y/o se cuantifica la hibridación, determinando la cantidad de marcador unido. Los métodos de hibridación en fase sólida representativos se desvelan en las patentes de EE.UU. N° 5.843.663,

5.900.481 y 5.919.626. Otros métodos de hibridación que se pueden usar en la práctica de la presente invención se describen en las patentes de EE.UU. N° 5.849.481, 5.849.486 y 5.851.772. Las partes pertinentes de éstas y otras referencias identificadas en el presente apartado de la memoria descriptiva.

5 b. Amplificación de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos usados como molde para la amplificación se pueden aislar de células, tejidos u otras muestras de acuerdo con metodologías convencionales (Sambrook *et al.*, 2001). En ciertas realizaciones, el análisis se realiza en homogeneizados de células enteras o tejidos, o en muestras de fluidos biológicos con o sin purificación sustancial del ácido nucleico molde. El ácido nucleico puede ser ADN genómico o ARN de célula entera o fraccionada. Cuando se usa ARN, se puede desear convertir primero el ARN en un ADN complementario.

Se entiende que el término "cebador", como se usa en el presente documento, abarca cualquier ácido nucleico que sea capaz de cebar la síntesis de un ácido nucleico naciente en un proceso dependiente del molde. Por lo general, los cebadores son oligonucleótidos de diez a veinte y/o treinta pares de bases de longitud, pero se pueden emplear secuencias más largas. Los cebadores se pueden proporcionar en forma de doble cadena y/o de una sola cadena, aunque se prefiere la forma de una sola cadena.

Los pares de cebadores diseñados para hibridarse selectivamente a los ácidos nucleicos correspondientes al locus del gen SOD1, variantes y fragmentos del mismo, se ponen en contacto con el ácido nucleico molde en condiciones que permitan la hibridación selectiva. Dependiendo de la aplicación deseada, se pueden seleccionar condiciones de hibridación de alta rigurosidad que solo permitan la hibridación con secuencias que sean completamente complementarias a los cebadores. En otras realizaciones, la hibridación puede tener lugar a una rigurosidad reducida para permitir la amplificación de ácidos nucleicos que contengan uno o más desapareamientos con las secuencias de cebadores. Una vez hibridado, el complejo molde-cebador se pone en contacto con una o más enzimas que faciliten la síntesis de ácido nucleico dependiente del molde. Se realizan múltiples series de amplificación, también conocidas como "ciclos", hasta que se produce una cantidad suficiente de producto de amplificación.

El producto de amplificación se puede detectar, analizar o cuantificar. En ciertas aplicaciones, la detección se puede realizar por medios visuales. En ciertas aplicaciones, la detección puede implicar la identificación indirecta del producto a través de quimioluminiscencia, gammagrafía radiactiva del radiomarcador incorporado o de la etiqueta fluorescente o incluso a través de un sistema usando señales de impulsos eléctricos y/o térmicos (tecnología Affymax; Bellus, 1994).

Hay disponibles una serie de procesos dependientes del molde para amplificar las secuencias de oligonucleótidos presentes en una muestra de molde dada. Uno de los métodos de amplificación mejor conocidos es la reacción en cadena de la polimerasa (denominada PCR™) que se describe en detalle en las patentes de EE.UU. N° 4.683.195, 4.683.202 y 4.800.159, y en Innis *et al.*, 1988.

Otro método para la amplificación es la reacción en cadena de la ligasa ("LCR"), desvelada en la solicitud europea N° 320308, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad. La patente de EE.UU. N° 4.883.750 describe un método similar a la LCR para la unión de pares de sondas a una secuencia diana. También se puede usar un método basado en la PCR™ y el ensayo de la ligasa de oligonucleótidos (OLA) (descrito en más detalle a continuación), desvelado en la patente de EE.UU. N° 5.912.148.

Los métodos alternativos para la amplificación de secuencias de ácido nucleico diana que se pueden usar en la práctica de la presente invención se desvelan en las patentes de EE.UU. N° 5.843.650, 5.846.709, 5.846.783, 5.849.546, 5.849.497, 5.849.547, 5.858.652, 5.866.366, 5.916.776, 5.922.574, 5.928.905, 5.928.906, 5.932.451, 5.935.825, 5.939.291 y 5.942.391, solicitud de RU N° 2 202 328, y en la Solicitud PCT PCT/US89/01025. Como método de amplificación, en la presente divulgación, también se puede usar la Q β replicasa, descrita en la solicitud PCT PCT/US87/00880.

En la amplificación de ácidos nucleicos de la presente divulgación, también puede ser útil un método de amplificación isotérmica en el que se usen endonucleasas de restricción y ligasas para realizar la amplificación de moléculas diana que contienen nucleótidos 5'-[α -tio]-trifosfatos en una cadena de un sitio de restricción (Walker *et al.*, 1992). La amplificación por desplazamiento de cadena (SDA), desvelada en la patente de EE.UU. N° 5.916.779, es otro método para llevar a cabo la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos que implica múltiples series de desplazamiento de cadena y síntesis, es decir, traducción de mellas.

Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico incluyen los sistemas de amplificación basados en la transcripción (TAS), incluyendo la amplificación basada en secuencias de ácido nucleico (NASBA) y 3SR (Kwoh *et al.*, 1989; solicitud PCT WO 88/10315, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad). La solicitud europea 329 822 desvela un procedimiento de amplificación de ácido nucleico que implica sintetizar cíclicamente ARN monocatenario ("ARNmc"), ADNmc y ADN bicatenario (ADNbc), que se puede usar de acuerdo con la presente divulgación.

La solicitud PCT WO 89/06700 desvela un esquema de amplificación de secuencias de ácido nucleico basado en la hibridación de una región de promotor/secuencia de cebador a un ADN monocatenario ("ADNmc") diana, seguida de la transcripción de muchas copias de ARN de la secuencia. Este esquema no es cíclico, es decir, no se producen nuevos moldes a partir de las transcripciones de ARN resultantes. Otros métodos de amplificación incluyen "RACE" y "PCR unilateral" (Frohman, 1990; Ohara *et al.*, 1989).

c. Detección de ácidos nucleicos

Tras cualquier amplificación, puede ser deseable separar el producto de la amplificación del molde y/o del cebador en exceso. En una realización, los productos de la amplificación se separan mediante agarosa, agarosa-acrilamida o electroforesis en gel de poli-acrilamida usando métodos convencionales (Sambrook *et al.*, 2001). Los productos de la amplificación separados se pueden cortar y eluir del gel para su posterior manipulación. Usando geles de agarosa de bajo punto de fusión, se puede retirar la banda separada calentando el gel, seguido de la extracción del ácido nucleico.

La separación de los ácidos nucleicos también se puede efectuar mediante columnas de centrifugación y/o técnicas cromatográficas conocidas en la técnica. Hay muchos tipos de cromatografías que se pueden usar en la práctica de la presente invención, incluyendo la cromatografía de adsorción, partición, intercambio iónico, hidroxipatita, tamiz molecular, fase inversa, columna, papel, capa fina y gas, así como la HPLC.

En ciertas realizaciones, los productos de la amplificación se visualizan, con o sin separación. Un método de visualización típico implica la tinción de un gel con bromuro de etidio y la visualización de las bandas bajo luz UV. Como alternativa, si los productos de la amplificación están marcados integralmente con nucleótidos radiomarcados o marcados fluorométricamente, los productos de la amplificación separados se pueden exponer a una película de rayos X o visualizarse bajo los espectros de excitación apropiados.

En una realización, tras la separación de los productos de la amplificación, se pone en contacto una sonda de ácido nucleico marcada con la secuencia del marcador amplificada. Preferentemente, la sonda se conjuga a un cromóforo, pero se puede radiomarcarse. En otra realización, la sonda se conjuga a una pareja de unión, tal como un anticuerpo o biotina, u otra pareja de unión que porte un resto detectable.

En realizaciones particulares, la detección se realiza mediante transferencia Southern, y la hibridación, con una sonda marcada. Las técnicas implicadas en la transferencia Southern son bien conocidas por los expertos en la materia (véase Sambrook *et al.*, 2001). Un ejemplo de lo anterior se describe en la patente de EE.UU. N° 5.279.721, incorporada por referencia en el presente documento, que desvela un aparato y un método para la electroforesis y transferencia automática de ácidos nucleicos. El aparato permite la electroforesis y transferencia sin manipulación externa del gel, y es ideal para llevar a cabo los métodos de acuerdo con la presente divulgación.

Otros métodos de detección de ácido nucleico que se pueden usar en la práctica de la presente invención se desvelan en las patentes de EE.UU. N° 5.840.873; 5.843.640; 5.843.651; 5.846.708; 5.846.717; 5.846.726; 5.846.729; 5.849.487; 5.853.990; 5.853.992; 5.853.993; 5.856.092; 5.861.244; 5.863.732; 5.863.753; 5.866.331; 5.905.024; 5.910.407; 5.912.124; 5.912.145; 5.919.630; 5.925.517; 5.928.862; 5.928.869; 5.929.227; 5.932.413 y 5.935.791.

d. Otros ensayos

Se pueden usar otros métodos para la exploración genética, por ejemplo, para detectar mutaciones en muestras de ADN genómico, ADNc y/o ARN. Los métodos usados para detectar mutaciones puntuales incluyen la electroforesis en gel de gradiente desnaturizante (DGGE), análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), métodos de escisión química o enzimática, secuenciación directa de regiones diana amplificadas mediante PCRTM (véase lo anterior), análisis del polimorfismo en la configuración de una sola cadena (SSCP) y otros métodos bien conocidos en la técnica.

Un método de reconocimiento de mutaciones puntuales se basa en la escisión por ARNasa de desapareamientos de pares de bases en heterodúplex de ARN/ADN o ARN/ARN. Como se usa en el presente documento, el término "desapareamiento" se define como una región de uno o más nucleótidos no apareados o apareados erróneamente en una molécula de ARN/ARN, ARN/ADN o ADN/ADN bicatenaria. Esta definición incluye tanto los desapareamientos debidos a mutaciones de inserción/delección, como las mutaciones puntuales de una o varias bases.

La patente de EE.UU. N° 4.946.773 describe un ensayo de escisión de desapareamientos de ARNasa A que implica la hibridación de muestras de ensayo de ADN o ARN monocatenario a una sonda de ARN y el posterior tratamiento de los dúplex de ácido nucleico con ARNasa A. Para la detección de los desapareamientos, los productos monocatenarios del tratamiento con ARNasa A, separados por electroforesis según su tamaño, se comparan con dúplex de control tratados de manera similar. Las muestras que contienen fragmentos más pequeños (productos de escisión) que no se observan en el dúplex de control se califican como positivas.

Otros investigadores han descrito el uso de ARNasa I en ensayos de desapareamientos. El uso de ARNasa I para la detección de desapareamientos se describe en la literatura de Promega Biotech. Promega comercializa un kit que contiene ARNasa I que escinde tres de los cuatro desapareamientos conocidos. Otros han descrito el uso de la proteína MutS u otras enzimas de reparación de ADN para la detección de los desapareamientos monocatenarios.

Los métodos alternativos para la detección de mutaciones de delección, inserción o sustitución que se pueden usar en la práctica de la presente divulgación se desvelan en las patentes de EE.UU. Nº 5.849.483, 5.851.770, 5.866.337, 5.925.525 y 5.928.870.

e. Ejemplos específicos de métodos de reconocimiento de polimorfismo en ácido nucleico

Las mutaciones espontáneas que surgen en el transcurso de la evolución de los genomas de los organismos no se suelen transmitir de inmediato por todos los miembros de la especie, creándose así alelos polimórficos que coexisten en las poblaciones de especies. A menudo, los polimorfismos son la causa de enfermedades genéticas. Se han identificado varias clases de polimorfismos. Por ejemplo, los polimorfismos de repetición en tándem de número variable (VNTR) surgen de las duplicaciones en tándem espontáneas de motivos repetidos di- o trinucleotídicos de nucleótidos. Si dichas variaciones alteran las longitudes de los fragmentos de ADN generados por escisión con endonucleasas de restricción, las variaciones se denominan polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Los RFLP se han usado ampliamente en análisis genéticos en seres humanos y animales.

Otra clase de polimorfismos se genera por la sustitución de un solo nucleótido. Dichos polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) pueden generar cambios en un sitio de endonucleasa de restricción. Por lo tanto, los SNP, a veces, son detectables mediante el análisis de la longitud de los fragmentos de restricción. Los SNP son las variaciones genéticas más comunes, y ocurren una vez cada 100 a 300 bases, y se ha encontrado que varias mutaciones de SNP afectan a un solo nucleótido en un gen que codifica la proteína de una manera suficiente para causar realmente una enfermedad genética. Los ejemplos de enfermedades por SNP son hemofilia, anemia de células falciformes, hemocromatosis hereditaria, enfermedad de Alzheimer de inicio tardío etc.

Se han desarrollado varios métodos para detectar polimorfismos, y algunos ejemplos se enumeran a continuación. La referencia de Kwok y Chen (2003) y Kwok (2001) proporcionan una visión general de algunos de estos métodos; las dos referencias se incorporan específicamente por referencia.

Los SNP relativos a SOD1 se pueden caracterizar mediante el uso de cualquiera de estos métodos o modificaciones adecuadas de los mismos. Dichos métodos incluyen la secuenciación directa o indirecta del sitio, el uso de enzimas de restricción donde los respectivos alelos del sitio crean o destruyen un sitio de restricción, el uso de sondas de hibridación específicas de alelo, el uso de anticuerpos que son específicos para las proteínas codificadas por los diferentes alelos del polimorfismo, o cualquier otra interpretación bioquímica.

i. Secuenciación de ADN

El método más comúnmente usado de caracterización de un polimorfismo es la secuenciación directa de ADN del locus genético que flanquea e incluye el polimorfismo. Dicho análisis se puede realizar usando bien el "método de terminación de cadena mediado por didesoxi", también conocido como el "Método de Sanger" (Sanger *et al.*, 1975) o el "método de degradación química", también conocido como "método de Maxam-Gilbert" (Maxam *et al.*, 1977). Se puede utilizar la secuenciación en combinación con tecnologías de amplificación específica de secuencia genómica, tales como la reacción en cadena de la polimerasa, para facilitar la recuperación de los genes deseados (Mullis *et al.*, 1986; solicitud de patente europea 50.424; solicitud de patente europea 84.796, solicitud de patente europea 258.017, solicitud de patente europea 237.362; solicitud de patente europea 201.184; las patentes de EE.UU. Nº 4.683.202; 4.582.788; y 4.683.194).

ii. Resistencia a la exonucleasa

Otros métodos que se pueden emplear para determinar la identidad de un nucleótido presente en un sitio polimórfico utilizan un derivado de nucleótido resistente a exonucleasa especializada (patente de EE.UU. Nº 4.656.127). Un cebador complementario a una secuencia alélica inmediatamente 3' con respecto al sitio polimórfico se hibrida con el ADN bajo investigación. Si el sitio polimórfico del ADN contiene un nucleótido que es complementario al derivado de nucleótido resistente al exonucleótido particular presente, entonces ese derivado se incorporará mediante una polimerasa en el extremo del cebador hibridado. Dicha incorporación vuelve al cebador resistente a la escisión de la exonucleasa y, por lo tanto, permite su detección. Como se conoce la identidad del derivado resistente al exonucleótido, se puede determinar el nucleótido específico presente en el sitio polimórfico del ADN.

iii. Métodos de microsecuenciación

Se han descrito otros varios procedimientos de incorporación de nucleótidos guiada por cebador para ensayar los sitios polimórficos en el ADN (Komher *et al.*, 1989; Sokolov, 1990; Syvanen 1990; Kuppuswamy *et al.*, 1991; Prezant

et al., 1992; Ugozzoli *et al.*, 1992; Nyren *et al.*, 1993). Estos métodos se basan en la incorporación de desoxinucleótidos marcados para diferenciar entre bases en un sitio polimórfico. Como la señal es proporcional al número de desoxinucleótidos incorporados, los polimorfismos que se producen en series del mismo nucleótido producen una señal que es proporcional a la longitud de la serie (Syvanen *et al.*, 1990).

iv. Extensión en solución

La patente francesa 2.650.840 y la solicitud PCT WO91/02087 describen un método basado en solución para determinar la identidad del nucleótido de un sitio polimórfico. De acuerdo con estos métodos, se usa un cebador complementario a secuencias alélicas inmediatamente 3' con respecto a un sitio polimórfico. La identidad del nucleótido de ese sitio se determina usando derivados de didesoxinucleótidos marcados que se incorporan en el extremo del cebador si es complementario al nucleótido del sitio polimórfico.

v. Análisis genético o extensión en fase sólida

La solicitud PCT WO92/15712 describe un método que usa mezclas de terminadores marcados y un cebador que es complementario a la secuencia 3' con respecto a un sitio polimórfico. El terminador marcado que se incorpora es complementario al nucleótido presente en el sitio polimórfico de la molécula diana que se está evaluando y, por tanto, identificando. En el presente documento, el cebador o la molécula diana se inmoviliza en una fase sólida.

vi. Ensayo de ligación de oligonucleótido (OLA)

Se trata de otro método de fase sólida que usa una metodología diferente (Landegren *et al.*, 1988). Se usan dos oligonucleótidos, capaces de hibridarse a secuencias contiguas de una sola cadena de un ADN diana. Uno de estos oligonucleótidos está biotilado, mientras que el otro está marcado de forma detectable. Si se encuentra la secuencia complementaria exacta en una molécula diana, los oligonucleótidos se hibridarán de manera que sus extremos sean contiguos, creando un sustrato de ligación. La ligación permite la recuperación del oligonucleótido marcado usando avidina. También se han descrito otros ensayos de detección de ácidos nucleico, basados en este método, combinados con PCR (Nickerson *et al.*, 1990). En el presente documento, se usa la PCR para realizar la amplificación exponencial de ADN diana, que luego se detecta usando el OLA.

vii. Análisis genético mediado por ligasa/polimerasa

La patente de EE.UU. N° 5.952.174 describe un método que también implica dos cebadores capaces de hibridarse a secuencias contiguas de la molécula diana. El producto hibridado se forma sobre un soporte sólido al que se inmoviliza la diana. En este caso, se produce la hibridación de modo que los cebadores están separados entre sí por un espacio de un solo nucleótido. La incubación de este producto hibridado en presencia de una polimerasa, una ligasa y una mezcla de nucleósidos trifosfato que contiene al menos un desoxinucleósido trifosfato permite la ligación de cualquier par de oligonucleótidos hibridados contiguos. La adición de una ligasa genera dos hechos requeridos para generar una señal, extensión y ligación. Esto proporciona una especificidad mayor y un "ruido" inferior a los de los métodos que usan bien la extensión o la ligación solas y, a diferencia de los ensayos basados en la polimerasa, este método aumenta la especificidad de la etapa de la polimerasa, combinándola con una segunda hibridación y una etapa de ligación para una señal que se va a unir a la fase sólida.

viii. Reacciones de escisión invasivas

Las reacciones de escisión invasivas se pueden usar para evaluar el ADN celular en cuanto a un determinado polimorfismo. Una tecnología denominada INVADER[®] emplea dichas reacciones (por ejemplo, de Arruda *et al.*, 2002; Stevens *et al.*, 2003). En general, hay tres moléculas de ácido nucleico: 1) un oligonucleótido cadena arriba del sitio diana ("oligo cadena arriba"); 2) una sonda de oligonucleótido que cubre el sitio diana ("sonda"); y 3) un ADN monocatenario con el sitio diana ("diana"). El oligo cadena arriba y la sonda no se superponen pero contienen secuencias contiguas. La sonda contiene un fluoróforo donante, tal como fluoresceína, y un colorante aceptor, tal como Dabcilo. El nucleótido del extremo terminal 3' del oligo cadena arriba se solapa ("invade") el primer par de bases de un dúplex sonda-diana. A continuación, la sonda es escindida por una nucleasa 5' específica de la estructura, causando la separación del par fluoróforo/inactivador, lo que aumenta la cantidad de fluorescencia que se puede detectar. Véase Lu *et al.* (2004). En algunos casos, el ensayo se realiza en una superficie sólida o en un formato de matriz.

ix. Otros métodos para detectar SNP

A continuación, se presentan otros varios métodos específicos para la detección e identificación de polimorfismos, y que se pueden usar como tales o con modificaciones adecuadas en combinación con polimorfismos de identificación del gen SOD1 en la presente invención. También se describen algunos otros métodos en el sitio web de SNP del NCBI DE la página web www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP.

En una realización particular, se pueden determinar los haplotipos extendidos en cualquier locus dado de una población, lo que permite identificar con exactitud qué SNP serán redundantes y cuales serán esenciales en estudios de asociación. Estos últimos se denominan "SNP de etiqueta haplotipo (htSNP)", marcadores que capturan los haplotipos de un gen o una región de desequilibrio de unión. Véase Jonson *et al.* (2001) y Ke y Cardon (2003), cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia, para métodos ilustrativos.

El ensayo VDA utiliza amplificación por PCR de segmentos genómicos mediante métodos de PCR larga usando reactivos TaKaRa LA Taq y otras condiciones de reacción convencionales. La amplificación larga puede amplificar tamaños de ADN de aproximadamente 2.000-12.000 pb. La hibridación de los productos a la matriz de detector variante (VDA) se puede realizar mediante un centro de rastreo de alto rendimiento Affymetrix y analizarse con programas informáticos.

Un método denominado ensayo en chip usa la amplificación por PCR de segmentos genómicos mediante protocolos de PCR convencional o larga. Los productos de hibridación se analizan mediante VDA, Halushka *et al.*, 1999, incorporada en el presente documento por referencia. En general, los SNP se clasifican como "ciertos" o "probables" basándose en el análisis por ordenador de los patrones de hibridación. En comparación con los métodos de detección alternativos tales como la secuenciación de nucleótidos, los SNP "ciertos" se han confirmado el 100 % de las veces; y los SNP "probables" se han confirmado el 73 % de las veces mediante este método.

Otros métodos incluyen simplemente la amplificación por PCR seguida de la digestión con la enzima de restricción relevante. Otros incluso suponen la secuenciación de los productos de PCR purificados de regiones genómicas conocidas.

En otro método más, los exones individuales o fragmentos solapantes de los grandes exones se amplifican por PCR. Los cebadores se diseñan a partir de secuencias publicadas o de bases de datos, y la amplificación por PCR del ADN genómico se realiza usando las siguientes condiciones: 200 ng de molde de ADN, 0,5 μ M de cada cebador, 80 μ M de cada uno de dCTP, dATP, dTTP y dGTP, formamida al 5 %, $MgCl_2$ 1,5 mM, 0,5 U de Taq polimerasa y 0,1 volumen de tampón de la Taq. Se realizan ciclos térmicos y los productos de PCR resultantes se analizan mediante análisis por PCR-polimorfismo de configuración monocatenaria (PCR-SSCP), en varias condiciones, por ejemplo, gel de poli(acrilamida al 5 o 10 % con urea al 15 %, con o sin glicerol al 5 %. La electroforesis se realiza durante la noche. Los productos de PCR que muestran cambios de movilidad se vuelven a amplificar y se secuencian para identificar la variación de los nucleótidos.

En un método denominado CGAP-GAI (DEMIGLACE), se cargan en la memoria datos de secuencia y alineamientos (de un fichero PHRAP.ace), puntuaciones de calidad para las lecturas de bases de secuencias (de los ficheros de calidad PHRED), información de distancias (de PHYLIP dnadist y programas vecinos) y datos de lecturas de bases (de PHRED-d' switch). Las secuencias se alinean y se examinan para cada trozo vertical ("corte") del ensamblaje resultante por discrepancia. Cualquiera de dichos cortes se considera un candidato a SNP (DEMIGLACE). DEMIGLACE usa un cierto número de filtros para eliminar los cortes que probablemente no representen verdaderos polimorfismos. Estos incluyen filtros que: (i) excluyen secuencias de cualquier corte dado de la consideración de SNP donde la puntuación de la calidad de la secuencia adyacente baja al 40 % o más; (ii) excluye lecturas en las que la amplitud del pico está por debajo del percentil quince de todas las lecturas de bases para ese tipo de nucleótido; (iii) descalifica las regiones de una secuencia que tienen un número alto de discrepancias con el consenso para excluirlas de los cálculos de los SNP; (iv) elimina de la consideración cualquier lectura de base con una lectura alternativa en la que el pico ascienda hasta el 25 % o más del área del pico leído; (v) excluye variaciones que solo suceden en una dirección de la lectura. Las puntuaciones de calidad PHRED se convirtieron en valores de probabilidad de error para cada nucleótido del corte. Se usan métodos bayesianos convencionales para calcular la probabilidad posterior de que haya evidencia de heterogeneidad de nucleótidos en una ubicación dada.

En un método denominado CU-RDF (RESEQ), se realiza la amplificación por PCR a partir del ADN aislado de sangre usando cebadores específicos para cada SNP, y tras los protocolos de limpieza típicos para eliminar los cebadores no usados y los nucleótidos libres, la secuenciación directa usando los mismos cebadores o anidados.

En un método denominado DEBNICK (MÉTODO-B), se realiza un análisis comparativo de secuencias EST agrupadas y se confirma mediante secuenciación de ADN basada en fluorescencia. En un método relacionado, denominado DEBNICK (MÉTODO-C), se realiza un análisis comparativo de secuencias EST agrupadas con calidad phred >20 en el sitio del desapareamiento, calidad phred media ≥ 20 sobre 5 bases en los flancos 5' y 3' del SNP, sin desapareamientos en 5 bases 5' y 3' del SNP, realizándose al menos dos casos de cada alelo y confirmando mediante el examen de los rastros.

En un método identificado por ERO (RESEQ), se diseñan nuevos conjuntos de cebadores para STS publicadas electrónicamente, y se usan para amplificar ADN de 10 cepas distintas de ratones. A continuación, se purifica el producto de amplificación de cada cepa mediante gel y se secuencian usando una técnica convencional de didesoxi de secuenciación en ciclo con terminadores marcados con ^{33}P . Todas las reacciones de ddATP terminadas se cargan entonces en carriles adyacentes de un gel de secuenciación seguidos por todas las reacciones de ddGTP y así sucesivamente. Los SNP se identifican mediante barrido visual de las radiografías.

En otro método identificado como ERO (RESEQ-HT), se diseñan nuevos conjuntos de cebadores para secuencias de ADN murinas publicadas electrónicamente, y se usan para amplificar ADN de 10 cepas distintas de ratones. El producto de amplificación de cada cepa se prepara para la secuenciación mediante tratamiento con exonucleasa I y fosfatasa alcalina de gamba. La secuenciación se realiza usando un kit ABI Prism Big Dye Terminator Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer) y las muestras de secuencia se procesan en un analizador de ADN 3700 (96 Capillary Sequencer).

FGU-CBT (SCA2-SNP) identifica un método donde la región que contiene el SNP se amplificó por PCR usando los cebadores SAC2-FP3 y SCA2-RP3. Se amplifican aproximadamente 100 ng de ADN genómico en un volumen de reacción de 50 µl que contiene una concentración final de Tris 5 mM, KCl 25 mM, MgCl₂ 0,75 mM, gelatina al 0,05% 20 pmol de cada cebador y 0,5 U de ADN polimerasa Taq. Las muestras se desnaturalizan, se hibridan y se extienden, y el producto de PCR se purifica de una banda cortada de un gel de agarosa usando, por ejemplo, el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen) y se secuencia usando química de terminación con colorante en un secuenciador automatizado de ADN ABI Prism 377 con los cebadores de la PCR.

En un método identificado como JBLACK (SEQ/RESTRICT), se realizan dos reacciones de PCR independientes con ADN genómico. Los productos de la primera reacción se analizan mediante secuenciación, indicando un sitio de restricción único FspI. La mutación se confirma en el producto de la segunda reacción de PCR mediante digestión con Fsp I.

En un método descrito como KWOK(1), se identifican SNP comparando datos de secuencias genómicas de alta calidad de cuatro individuos seleccionados al azar mediante secuenciación directa de ADN de los productos de PCR con química de terminación con colorante (véase Kwok *et al.*, 1996). En un método relacionado identificado como KWOK (2) los SNP se identifican comparando datos de secuencias genómicas de alta calidad de clones de insertos largos solapantes tales como cromosomas bacterianos artificiales (BAC) o cromosomas artificiales basados en P1 (PAC). Se desarrolla entonces una STS que contiene este SNP y se confirma la existencia del SNP en varias poblaciones mediante secuenciación de ADN combinado (véase Tallon-Miller *et al.*, 1998). En otro método similar denominado KWOK(3) los SNP se identifican comparando datos de secuencias genómicas de alta calidad de clones de insertos largos solapantes de BAC o PAC. Los SNP encontrados mediante esta metodología representan variaciones en la secuencia de ADN entre los dos cromosomas donante, pero todavía no se han determinado las frecuencias alélicas de la población general. En el método KWOK(5), los SNP se identifican comparando datos de secuencias genómicas de alta calidad de una muestra de ADN homocigoto y una o más muestras de ADN combinado mediante secuenciación directa del ADN de los productos de PCR con química de terminación con colorante. Las STS usadas se desarrollan a partir de datos de secuencias encontradas en bases de datos disponibles de forma pública. En concreto, estas STS se amplifican mediante PCR contra una mola hidatiforme completa (CHM) que ha demostrado ser homocigótica en todos los locus y un combinación de muestras de ADN de precursores CEPH (véase Kwok *et al.*, 1994).

En otro método de este tipo, KWOK (OverlapSnpDetectionWithPolyBayes), los SNP se descubren mediante análisis automatizado por ordenador de regiones solapantes de secuencias de clones genómicos humanos de insertos largos. Para la adquisición de datos, las secuencias de los clones se obtienen directamente de centros de secuenciación a gran escala. Esto es necesario porque la secuencias de calidad base no están presentes/disponibles a lo largo del GenBank. El procesamiento de datos en bruto implica el análisis de la uniformidad de las secuencias de los clones y la información acompañante de calidad base. A las secuencias finalizadas ("base perfecta", tasa de error inferior a 1 en 10.000 pb) sin secuencias de calidad base asociadas se les asigna un valor de calidad base uniforme de 40 (tasa de error 1 en 10.000 pb). Las secuencias borrador sin valores de calidad base se rechazan. Las secuencias procesadas se introducen en una base de datos local. También se almacena una versión de cada secuencia con repeticiones humanas enmascaradas conocidas. El enmascaramiento de las repeticiones se realiza con el programa "MASKERAID". Detección del solapamiento: los solapamientos putativos se detectan con el programa "WUBLAST". Se siguen varias etapas de filtración para eliminar los resultados de detección del solapamiento falso, es decir, similitudes entre un par de secuencias de clon que surgen debido a la duplicación de secuencias en contra del verdadero solapamiento. La longitud total del solapamiento, el porcentaje total de similitud, el número de diferencias de secuencia entre nucleótidos con "desapareamientos de alta calidad" de valor alto de calidad base. Los resultados también se comparan con los resultados de la cartografía de los fragmentos de restricción de clones genómicos en el Centro de Secuenciación del Genoma de la Universidad de Washington, informes de los terminadores sobre solapamientos, y los resultados del esfuerzo de construcción de secuencias cóntigo en el NCBI. Detección de SNP: se analizan pares que se solapan de secuencias de clones para sitios candidatos a SNP con el software de detección de SNP "POLYBAYES". Las diferencias de secuencia entre los pares de secuencias se puntúan para la probabilidad de que representen verdaderas variaciones de secuencia en oposición con errores de secuenciación. Este proceso requiere la presencia de valores de calidad de base para ambas secuencias. Se extraen los candidatos con puntuación alta. La búsqueda se restringe a variaciones de pares de bases individuales de tipo sustitución. La puntuación de confianza del SNP candidato se calcula con el software PLYBAYES.

En el método identificado por KWOK (ensayo TaqMan), se usa el ensayo TaqMan para determinar los genotipos de 90 individuos al azar. En el método identificado por KYUGEN(Q1), se combinan las muestras de ADN de las

poblaciones indicadas y se analizan mediante PLACE-SSCP. Las alturas de los picos de cada alelo en el análisis combinado se corrigen por las del heterocigoto, y se usan posteriormente para calcular las frecuencias alélicas. Las frecuencias alélicas superiores al 10 % se cuantifican de forma fiable mediante este método. La frecuencia alélica = 0 (cero) significa que el alelo se encontró entre individuos, pero que no se ve el pico correspondiente en la combinación examinada. La frecuencia alélica = 0-0,1 indica que los alelos menores se detectan en la combinación, pero los picos son demasiado bajos para cuantificarse de forma fiable.

En otro método más identificado como KYUGEN (método 1), los productos de PCR se marcan después con colorantes fluorescentes y se analizan mediante un sistema de electroforesis capilar automatizado en condiciones de SSCP (PLACE-SSPC). Los ADN de cuatro o más individuos se analizan con o sin los ADN combinados (combinación japonesa y combinación de precursores CEPH) en una serie de experimentos. Los alelos se identifican mediante examen visual. Se secuencian los ADN individuales con genotipos diferentes y se identifican los SNP. Se estiman las frecuencias alélicas a partir de las alturas de los picos en las muestras combinadas tras corregir el sesgo de la señal usando la altura de los picos en heterocigotos. Para la PCR, se etiquetan los cebadores para que tengan 5'-ATT o 5'-GTT en sus extremos para el marcaje posterior de ambas cadenas. Las muestras de ADN (10 ng/ul) se amplifican en muestras de reacción que contienen el tampón (Tris-HCl 10 mM, pH 8,3 o 9,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 2,0 mM) 0,25 μM de cada cebador, 200 μM de cada dNTP y 0,025 unidades/ul de la ADN polimerasa Taq previamente mezclada con un anticuerpo anti-Taq. Las dos cadenas de los productos de PCR se marcan diferencialmente con nucleótidos modificados con R1110 y R6G mediante una reacción de intercambio del fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I. Se detiene la reacción añadiendo EDTA, y los nucleótidos no incorporados se desfosforilan añadiendo fosfatas alcalina de intestino de ternera. Para el SSCP: se añade una alícuota de productos de PCR marcados con fluorescencia y marcadores internos marcados con TAMRA a formamida desionizada, y se desnaturaliza. Se realiza una electroforesis en un capilar usando un analizador genético ABI Prism 310 Genetic Analyzer. Se usan los programas Genscan (P-E Biosystems) para la recogida de datos y el procesamiento de datos. Se somete el ADN de individuos (dos a once) incluyendo los que muestran genotipos diferentes en SSCP a secuenciación directa usando química de Big-Dye Terminator, en secuenciadores ABI Prism 310. Los diagramas de secuencias múltiples obtenidos del ABI Prism 310 se procesan y alinean mediante Phred/Phrap, y se ven usando un visor Consed. Los SNP se identifican mediante el software PolyPhred y examen visual.

En otro método más identificado como KYUGEN (Método 2), se buscan individuos con diferentes genotipos mediante HPLC desnaturalizante (DHPLC) o PLACE-SSCP (Inazuka *et al.*, 1997) y se determinan sus secuencias para identificar SNP. La PCR se realiza con cebadores marcados con 5'-ATT o 5'-GTT en sus extremos para el marcaje posterior de ambas cadenas. El análisis por DHPLC se lleva a cabo usando el sistema de análisis de fragmentos de DNA WAVE (Transgenomic). Los productos de PCR se inyectan en una columna DANSep, y se separan en condiciones determinadas usando el programa WAVEMarker (Transgenomic). Las dos cadenas de los productos de PCR que están marcadas diferencialmente con nucleótidos modificados con R110 y R6G mediante una reacción de intercambio del fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I. Se detiene la reacción añadiendo EDTA, y se desfosforilan los nucleótidos no incorporados añadiendo fosfatas alcalina de intestino de ternera. Se realiza SSCP seguida por electroforesis en un capilar usando un analizador ABI Prism 310 Genetic Analyzer. Software Genscan (P-E Biosystems). Se somete el ADN de los individuos incluyendo los que mostraron genotipos diferentes en DHPLC o SSCP a secuenciación directa usando química de big-dye terminator, en secuenciadores ABI Prism 310. Se procesan los diagramas de secuencias múltiples obtenidos del ABI Prism 310 y se alinean mediante Phred/Phrap y se ven usando un visor Consed. Se identifican los SNP mediante el software PolyPhred y examen visual. Se procesan los datos de los cromatogramas de secuencias EST en Unigene con PHRED. Para identificar los posibles SNP, se describen desapareamientos de bases individuales a partir de alineamientos de múltiples secuencias producidos mediante los programas PHRAP, BRO y POA para cada grupo Unigene. BRO corrigió las posibles orientaciones de EST erróneas, mientras que POA identificó y analizó estructuras de alineamiento no lineales indicadoras de mezcla de genes/quimeras que podrían producir SNP falsos. Se usa la inferencia bayesiana para sopesar la evidencia del polimorfismo verdadero frente a errores de secuencia, alineamientos incorrectos o ambigüedades, grupos incorrectos o secuencias EST químicas, evaluando datos tales como altura de cromatogramas en bruto, agudeza, solapamiento y espaciamiento; tasas de errores de secuenciación; sensibilidad del contexto; origen de la librería de ADNc, etc.

En el método identificado como MARSHFIELD (Método B), se identifican secuencias de ADN humanas solapantes que contienen polimorfismos putativos de inserción/delección a través de búsquedas en bases de datos públicas. Los cebadores de PCR que flanquean cada sitio polimórfico se seleccionan a partir de secuencias consenso. Los cebadores se usan para amplificar ADN genómico humano individual o combinado. Se resuelven los productos de PCR resultantes en un gel de poliacrilamida desnaturalizante y se usa un PhosphorImager para estimar las frecuencias alélicas de las combinaciones de ADN.

f. Desequilibrio de unión

Los polimorfismos en desequilibrio de unión con otro polimorfismo en el que la identificación de un polimorfismo predice la identidad del polimorfismo ligado. El "desequilibrio de unión" ("DU" como se usa en el presente documento, aunque también se conoce como "LED" en la técnica) se refiere a una situación en la que una

determinada combinación de alelos (es decir, una forma variante de un gen dado) o polimorfismos en dos locus aparece con más frecuencia de lo que cabría esperar por azar. "Significativo" como se usa con respecto al desequilibrio de unión, determinado por el experto en la materia, se contempla como un valor estadístico p o α que puede ser 0,25 o 0,1 y puede ser 0,1, 0,05, 0,001, 0,00001 o menor. El polimorfismo de la posición 40 de la proteína SOD1 se puede determinar mediante la evaluación de la secuencia de ácido nucleico de un polimorfismo en desequilibrio de unión con el residuo 40 del polimorfismo. La invención se puede implantar de esta manera con respecto a uno o más polimorfismos para permitir el análisis de haplotipos. "Haplotipo" se usa de acuerdo con su significado normal y corriente para el experto en la materia. Se refiere a un genotipo colectivo de dos o más alelos o polimorfismos a lo largo de uno de los cromosomas homólogos.

B. Evaluación de proteínas

Como alternativa, la variación polimórfica se puede determinar mediante cualquier método que detecte una variación de aminoácidos. Para ello, la invención no se debe limitar a ningún método en particular. Por ejemplo, se puede obtener una muestra de tejido o fluido de un individuo y determinar el aminoácido de la posición 40 de la proteína SOD1. Dicha detección puede ser mediante varios métodos incluyendo ensayos basados en anticuerpos, (transferencias Western, ELISA) o se podría usar un análisis de los aminoácidos (cromatografía líquida de alta presión o espectroscopia de masas) que detectaría si la proteína tiene Arg o Gly.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a composiciones que comprenden al menos una molécula proteica, tal como una proteína SOD1 o una proteína que se une a la proteína SOD1, tal como un anticuerpo. Como se usa en el presente documento, una "molécula proteica", "composición proteica", "compuesto proteico", "cadena proteica" o "material proteico" se refiere, en general, pero sin limitación, a una proteína de más de aproximadamente 200 aminoácidos o la secuencia endógena de longitud completa traducida de un gen; un polipéptido de más de aproximadamente 100 aminoácidos; y/o un péptido de aproximadamente 3 a aproximadamente 100 aminoácidos. En el presente documento, todos los términos "proteicos" descritos anteriormente se pueden usar de manera intercambiable.

Las composiciones proteicas se pueden preparar mediante cualquier técnica conocida por los expertos en la materia, incluyendo la expresión de proteínas, polipéptidos o péptidos a través de técnicas de biología molecular convencionales, el aislamiento de compuestos proteicos de fuentes naturales o la síntesis química de materiales proteicos. Las secuencias de nucleótidos y proteínas, polipéptidos y péptidos para varios genes se han descrito anteriormente, y pueden encontrarse en bases de datos informatizadas conocidas por los expertos habituales en la materia. Una de dichas bases de datos es la del GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica y las bases de datos GenPept (estando la página Web en ncbi.nlm.nih.gov/). Las regiones de codificación de estos genes conocidos se pueden amplificar y/o expresar usando las técnicas desveladas en el presente documento o como conocerían los expertos habituales en la materia. Como alternativa, hay diversos preparados comerciales de proteínas, polipéptidos y péptidos que son conocidos por los expertos en la materia.

1. Purificación de proteínas

Se puede desear purificar SOD1 de una muestra o purificar una proteína que se une a SOD1, tal como un anticuerpo. Dichas técnicas se emplean ampliamente, y la invención no pretende quedar limitada con respecto a la purificación de proteínas. Las técnicas de purificación de proteínas son muy conocidas por los expertos en la materia. Estas técnicas implican, en un nivel, el fraccionamiento bruto del medio celular en fracciones polipeptídicas y no polipeptídicas. Tras separar el polipéptido de otras proteínas, el polipéptido de interés se puede purificar más usando técnicas cromatográficas y electroforéticas para lograr la purificación parcial o completa (o purificación hasta la homogeneidad). Los métodos analíticos particularmente adecuados para la preparación de un péptido puro son la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de exclusión; la electroforesis en gel de poliacrilamida; el enfoque isoeléctrico. Un método particularmente eficaz de purificación de péptidos es la cromatografía líquida rápida de proteínas o incluso HPLC.

Ciertos aspectos de la presente invención se pueden referir a la purificación y, en realizaciones particulares, la purificación sustancial, de una proteína o un péptido codificado. La expresión "proteína o péptido purificado" como se usa en el presente documento, pretende referirse a una composición, aislable de otros componentes, en la que la proteína o el péptido se purifica en cualquier grado relativo hasta su estado obtenible de manera natural. Una proteína o un péptido purificado, por lo tanto, también se refiere a una proteína o un péptido, libre del entorno en el que puede producirse de manera natural.

En general, "purificada" se referirá a una composición proteica o peptídica que se ha sometido a fraccionamiento para eliminar otros diversos componentes, y cuya composición conserva sustancialmente su actividad biológica expresada. Cuando se usa la expresión "sustancialmente purificada", esta designación se referirá a una composición en la que la proteína o el péptido forma el componente principal de la composición, tal como que constituye aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 % o más de las proteínas de la composición.

Los expertos en la materia conocerán varios métodos para cuantificar el grado de purificación de la proteína o del péptido a la luz de la presente divulgación. Estos incluyen, por ejemplo, determinar la actividad específica de una fracción activa o evaluar la cantidad de polipéptidos de una fracción por análisis SDS/PAGE. Un método preferido para evaluar la pureza de una fracción es calcular la actividad específica de la fracción, para compararla con la actividad específica del extracto inicial y calcular así el grado de pureza, evaluado en el presente documento por un "número de veces de purificación". Como es evidente, las unidades reales usadas para representar la cantidad de actividad dependen de la técnica de ensayo seleccionada en particular para seguir la purificación y de si la proteína o el péptido expresado presentan una actividad detectable.

Los expertos en la materia conocerán varias técnicas adecuadas para su uso en la purificación de proteínas. Estas incluyen, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, PEG, anticuerpos y similares o por desnaturalización térmica seguida de centrifugación; etapas de cromatografía tales como intercambio iónico, filtración en gel, fase inversa, cromatografía de hidroxilapatita y de afinidad; enfoque isoelectrico; electroforesis en gel; y combinaciones de estas y otras técnicas. Como se conoce en general en la técnica, se cree que el orden de realización de las diversas etapas de purificación se puede cambiar, o que ciertas etapas se pueden omitir, sin dejar de producir un método adecuado para la preparación de una proteína o un péptido sustancialmente purificado.

No existe la necesidad general de que la proteína o el péptido se tengan que proporcionar siempre en su estado más purificado. De hecho, se contempla que los productos menos sustancialmente purificados tendrán utilidad en ciertas realizaciones. La purificación parcial se puede realizar usando menos etapas de purificación en combinación, o utilizando diferentes formas del mismo esquema de purificación general. Por ejemplo, se aprecia que una cromatografía en columna de intercambio catiónico realizada utilizando un aparato de HPLC generalmente dará como resultado una mayor purificación que la misma técnica utilizando un sistema de cromatografía de baja presión. Los métodos que presentan un menor grado de purificación relativa pueden tener ventajas en la recuperación total del producto proteico, o en el mantenimiento de la actividad de una proteína expresada.

Se sabe que la migración de un polipéptido puede variar, a veces significativamente, con diferentes condiciones de SDS/PAGE (Capaldi *et al.*, 1977). Por lo tanto, se apreciará que en diferentes condiciones de electroforesis, los pesos moleculares aparentes de los productos de expresión purificados o parcialmente purificados pueden variar.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se caracteriza por una separación muy rápida con extraordinaria resolución de los picos. Esto se logra mediante el uso de partículas muy finas y alta presión para mantener un caudal adecuado. La separación se puede realizar en cuestión de minutos o como máximo en una hora. Además, solo se necesita un volumen muy pequeño de la muestra, porque las partículas son tan pequeñas y están tan apretadas que el volumen de hueco es una fracción muy baja del volumen del lecho. Además, la concentración de la muestra no necesita ser muy alta, porque las bandas son tan estrechas que hay muy poca dilución de la muestra.

La cromatografía en gel o la cromatografía de tamiz molecular es un tipo especial de cromatografía de reparto que se basa en el tamaño molecular. La teoría en la que se basa la cromatografía en gel es que la columna, que se prepara con pequeñas partículas de una sustancia inerte que contiene poros pequeños, separa las moléculas más grandes de las moléculas más pequeñas a medida que pasan a través o alrededor de los poros, dependiendo de su tamaño. Siempre que el material del que están hechas las partículas no adsorba las moléculas, el único factor determinante del flujo es el tamaño. Por lo tanto, las moléculas se eluyen de la columna en tamaño decreciente, siempre que la forma sea relativamente constante. La cromatografía en gel es insuperable para separar moléculas de diferente tamaño, porque la separación es independiente del resto de factores tales como el pH, la fuerza iónica, la temperatura, etc. Además, casi no hay adsorción, hay una menor dispersión de zona y el volumen de elución se relaciona de manera sencilla con el peso molecular.

La cromatografía de afinidad es un procedimiento cromatográfico que se basa en la afinidad específica entre una sustancia que se va a aislar y una molécula a la que se puede unir específicamente. Se trata de una interacción de tipo receptor-ligando. El material de la columna se sintetiza mediante acoplamiento covalente de una de las parejas de unión a una matriz insoluble. El material de la columna es entonces capaz de adsorber específicamente la sustancia de la solución. La elución se produce al cambiar las condiciones a aquellas en las que la unión no se producirá (por ejemplo, modificar el pH, la fuerza iónica y la temperatura).

Un tipo particular de cromatografía de afinidad útil en la purificación de compuestos que contienen hidratos de carbono es la cromatografía de afinidad por la lectina. Las lectinas son una clase de sustancias que se unen a varios polisacáridos y glucoproteínas. En general, las lectinas se acoplan a agarosa mediante bromuro de cianógeno. La conconavalina A acoplada a sefarosa fue el primer material de este tipo por usar, y se ha usado ampliamente en el aislamiento de polisacáridos y glucoproteínas distintos de las lectinas que incluyen lectina de lenteja, aglutinina de germen de trigo, que ha sido útil en la purificación de residuos de *N*-acetil-glucosaminilo y lectina de *Helix pomatia*. Las propias lectinas se purifican usando cromatografía de afinidad con ligandos de hidratos de carbono. La lactosa se ha usado para purificar lectinas a partir de semilla de ricino y cacahuetes; la maltosa ha sido útil en la extracción de lectinas de lentejas y judía común; la *N*-acetil-D-galactosamina se usa para la purificación de las lectinas de la soja; el *N*-acetil-glucosaminilo se une a lectinas de germen de trigo; la D-galactosamina se ha usado en la obtención de lectinas de almejas y la L-fucosa se unirá a las lectinas de loto.

La matriz debería ser una sustancia que, por sí misma, no adsorbiera las moléculas en ningún grado significativo y que tuviera una amplia selección de estabilidad química, física y térmica. El ligando se debería acoplar de una manera tal que no afecte a sus propiedades de unión. El ligando también debería proporcionar una unión relativamente firme, y se debería poder eluir la sustancia sin destruir la muestra ni el ligando. Una de las formas más comunes de cromatografía de afinidad es la cromatografía de inmutafinidad. A continuación, se describe la generación de anticuerpos que sería adecuada para su uso de acuerdo con la presente invención.

2. Anticuerpos

Otra realización de la presente divulgación son anticuerpos, en algunos casos, un anticuerpo monoclonal humano inmunorreactivo con la secuencia de polipéptido de la SOD1 canina. Se entiende que los anticuerpos se pueden usar para detectar la SOD1, particularmente una SOD1 producto de un determinado polimorfismo. Se contempla que los anticuerpos particularmente útiles en el contexto de la presente invención son aquellos que unen diferencialmente una proteína SOD1 bien con un resto E o K y la posición 40 para distinguir entre las dos poblaciones.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" pretende referirse, en sentido amplio, a cualquier agente de unión inmunológico tal como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. En general, se prefieren IgG y/o IgM, debido a que son los anticuerpos más comunes en la situación fisiológica y porque son los más fáciles de crear en un entorno de laboratorio.

El término "anticuerpo" se usa para referirse a cualquier molécula de tipo anticuerpo que tenga una región de unión al antígeno, e incluye fragmentos de anticuerpo tales como Fab', Fab, F(ab')₂, anticuerpos de dominio único (DAB), Fv, scFv (Fv monocatenario), y similares. Las técnicas para preparar y usar diversas construcciones basadas en anticuerpos y fragmentos son muy conocidas en la materia. Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos también se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow *et al.*, 1988).

a. Generación de anticuerpos

En ciertas realizaciones, la presente divulgación incluye anticuerpos. Por ejemplo, se puede usar la totalidad o una parte de un anticuerpo monoclonal para determinar el aminoácido de la posición 389. Como se detalla anteriormente, además de los anticuerpos generados contra proteínas de longitud completa, también se pueden generar anticuerpos en respuesta a construcciones menores que comprendan regiones centrales epitópicas, incluyendo epítomos de tipo silvestre y mutantes. Las técnicas para preparar y usar diversas construcciones basadas en anticuerpos y fragmentos son bien conocidas en la materia. Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos también son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, 1988).

Se reconoce que los anticuerpos monoclonales (mAb) tienen ciertas ventajas, por ejemplo, reproducibilidad y producción a gran escala y, en general, se prefiere su uso. Así pues, la divulgación proporciona anticuerpos monoclonales de origen humano, murino, de mono, rata, hámster, conejo e incluso de pollo.

En general, los métodos de generación de anticuerpos monoclonales (mAb) comienzan a lo largo de las mismas líneas que los de preparación de anticuerpos policlonales. En resumen, se puede preparar un anticuerpo policlonal mediante la inmunización de un animal con una composición de polipéptido inmunogénico de acuerdo con la presente divulgación y la recogida de antisueros de ese animal inmunizado. Como alternativa, en algunas realizaciones de la presente invención, se recoge suero de personas que puedan haber estado expuestas a un determinado antígeno. La exposición a un determinado antígeno se puede producir en un entorno de trabajo, de manera que las personas se hayan expuesto ocupacionalmente a un determinado antígeno y hayan desarrollado anticuerpos policlonales contra un péptido, un polipéptido o una proteína. En algunas realizaciones de la divulgación, el suero policlonal de personas expuestas en un entorno laboral se usa para identificar regiones antigénicas en la toxina gelonina mediante el uso de métodos de inmunodetección.

Se puede usar una amplia selección de especies animales para la producción de antisueros. Por lo general, el animal usado para la producción de antisueros es un conejo, un ratón, una rata, un hámster, una cobaya o una cabra. Debido al volumen relativamente alto de sangre de los conejos, un conejo es una elección preferida para la producción de anticuerpos policlonales.

Como es bien conocido en la técnica, una composición dada puede variar en su inmunogenicidad. A menudo, es necesario, por tanto, estimular el sistema inmune del hospedador, como se puede lograr acoplando un inmunógeno de péptido o polipéptido a un vehículo. Los vehículos ilustrativos y preferidos son la hemocianina de lapa californiana (KLH) y la albúmina de suero bovino (BSA). También se pueden usar como vehículos otras albúminas tales como ovoalbúmina, albúmina de suero de ratón o albúmina de suero de conejo. Los medios para conjugar un polipéptido a un vehículo proteico son bien conocidos en la técnica, e incluyen glutaraldehído, éster de *m*-maleimidobenzoil-*N*-hidroxisuccinimida, carbodiimida y bencidina bis-biazotizada.

Como también es bien sabido en la técnica, se puede aumentar la inmunogenicidad de una composición inmunógena particular mediante el uso de estimulantes inespecíficos de la respuesta inmune, conocidos como adyuvantes. Los adyuvantes moleculares adecuados incluyen todos los compuestos inmunoestimulantes aceptables, tales como citoquinas, toxinas o composiciones sintéticas.

Los adyuvantes que se pueden usar incluyen IL-1, IL-2, IL-4, IL-7, IL-12, γ -interferón, GMCSF, BCG, hidróxido de aluminio, compuestos de MDP tales como thur-MDP y nor-MDP, CGP (MTP-PE), lípido A, y monofosforil lípido A (MPL). También se contempla RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, MPL, dimicolato de trehalosa (TDM) y esqueleto de la pared celular (CWS) en una emulsión de escualeno al 2 %/Tween 80. Se pueden usar incluso antígenos del MHC. Los adyuvantes ilustrativos que se prefieren a menudo incluyen el adyuvante completo de Freund (un estimulante no específico de la respuesta inmune que contiene *Mycobacterium tuberculosis* muerta), adyuvantes incompletos de Freund y adyuvante de hidróxido de aluminio.

Además de los adyuvantes, se puede desear la administración conjunta de modificadores de la respuesta biológica (BRM), que han demostrado regular positivamente la inmunidad de los linfocitos T o regular negativamente la actividad de células supresoras. Dichos BRM incluyen, pero sin limitación, cimetidina (CIM; 1.200 mg/d) (Smith/Kline, PA); ciclofosfamida a baja dosis (CYP; 300 mg/m²) (Johnson/Mead, NJ), citoquinas tales como γ -interferón, IL-2 o IL-12 o genes que codifican proteínas implicadas en funciones auxiliares inmunes, tales como B-7.

La cantidad de composición inmunogénica usada en la producción de anticuerpos policlonales varía dependiendo de la naturaleza del inmunógeno, así como del animal usado para la inmunización. Se puede usar varias vías para administrar el inmunógeno (subcutánea, intramuscular, intradérmica, intravenosa e intraperitoneal). La producción de anticuerpos policlonales se puede monitorizar mediante el muestreo de sangre del animal inmunizado en varios puntos posteriores a la inmunización.

También se puede administrar una segunda inyección de refuerzo. El proceso de refuerzo y titulación se repite hasta alcanzarse un título adecuado. Cuando se obtiene un nivel deseado de inmunogenicidad, el animal inmunizado se puede sangrar, y aislarse y almacenarse el suero, y/o se puede usar el animal para generar mAb.

Los mAb se pueden preparar fácilmente mediante el uso de técnicas bien conocidas, tales como las ilustradas en la patente de EE.UU. Nº 4.196.265. Por lo general, esta técnica implica la inmunización de un animal adecuado con una composición inmunogénica seleccionada, por ejemplo, un polipéptido, péptido o dominio purificado o parcialmente purificado, bien una composición de tipo silvestre o mutante. La composición inmunizante se administra de una manera eficaz para estimular las células productoras de anticuerpos.

Los mAb se pueden purificar adicionalmente, si se desea, usando filtración, centrifugación y diversos métodos cromatográficos tales como HPLC o cromatografía de afinidad. Los fragmentos de los anticuerpos monoclonales de la invención se pueden obtener a partir de los anticuerpos monoclonales producidos de este modo mediante métodos que incluyen digestión con enzimas tales como pepsina o papaína y/o mediante la escisión de enlaces disulfuro por reducción química. Como alternativa, los fragmentos de anticuerpos monoclonales englobados por la presente invención se pueden sintetizar usando un sintetizador de péptidos automatizado.

También se contempla la posibilidad de usar una metodología de clonación molecular para generar mAb. Para ello, se preparan librerías combinatorias de fagémidos de inmunoglobulina a partir de ARN aislado del bazo del animal inmunizado, y se seleccionan los fagémidos que expresan anticuerpos apropiados por selección usando células que expresan el antígeno y células de control. Las ventajas de esta metodología frente a las técnicas de hibridoma convencionales son que se pueden producir aproximadamente 10⁴ veces más anticuerpos y seleccionarlos en una sola serie, y que se generan nuevas especificidades mediante la combinación de la cadena H y L que aumenta todavía más la posibilidad de encontrar anticuerpos apropiados.

b. Métodos de inmunodetección

Como se ha tratado, en algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere a métodos de inmunodetección para la unión, purificación, eliminando, determinación y/o detección de otra manera de componentes biológicos, tales como regiones antigénicas de polipéptidos y péptidos. Los métodos de inmunodetección de la presente divulgación se pueden usar para identificar regiones antigénicas de un péptido, polipéptido o proteína que tenga implicaciones terapéuticas, en particular, en la reducción de la inmunogenicidad o la antigenicidad del péptido, polipéptido o proteína en un sujeto diana.

Los métodos de inmunodetección incluyen ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoradiométrico, fluoroinmunoensayo, ensayo quimioluminiscente, ensayo bioluminiscente y transferencia Western, aunque hay otros varios que son bien conocidos por los expertos. Las etapas de diversos métodos de inmunodetección útiles se han descrito en la literatura científica, tal como, por ejemplo, Doolittle *et al.*, 1999; Gulbis *et al.*, 1993; De Jager *et al.*, 1993; y Nakamura *et al.*, 1987.

En general, los métodos de inmunounión incluyen la obtención de una muestra sospechosa de contener una proteína, un polipéptido y/o un péptido, y la puesta en contacto de la muestra con un primer anticuerpo, monoclonal o policlonal, de acuerdo con la presente invención, como puede ser el caso, en condiciones eficaces para permitir la formación de inmunocomplejos.

5 Estos métodos incluyen métodos para purificar una proteína, un polipéptido y/o un péptido de un orgánulo, una célula, un tejido o muestras de organismo. En estos casos, el anticuerpo elimina el componente antigénico de proteína, polipéptido y/o péptido de una muestra. El anticuerpo se unirá preferentemente a un soporte sólido, tal como en forma de una matriz de columna, y la muestra sospechosa de contener el componente antigénico de proteína, polipéptido y/o péptido se aplicará al anticuerpo inmovilizado. Los componentes no deseados se lavarán de la columna, dejando el antígeno inmunocomplejado al anticuerpo inmovilizado que se vaya a eluir.

10 Los métodos de inmunounión también incluyen métodos para detectar y cuantificar la cantidad de un componente de antígeno en una muestra, y detectar y cuantificar cualquier complejo inmune formado durante el proceso de unión. En el presente documento, se obtendría una muestra sospechosa de contener un antígeno o dominio antigénico, y se pondría en contacto la muestra con un anticuerpo contra el antígeno o dominio antigénico, para luego detectar y cuantificar la cantidad de complejos inmunes formados en las condiciones específicas.

15 En términos de detección de antígenos, la muestra biológica analizada puede ser cualquier muestra sospechosa de contener un antígeno o dominio antigénico, tal como, por ejemplo, una sección de tejido o una muestra, un extracto de tejido homogeneizado, una célula, un orgánulo, formas separadas y/o purificadas de cualquiera de las composiciones anteriores que contienen antígeno, o incluso cualquier fluido biológico que entre en contacto con la célula o el tejido, incluyendo sangre y/o suero.

20 La puesta en contacto de la muestra biológica seleccionada con el anticuerpo en condiciones eficaces y durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de complejos inmunes (complejos inmunes primarios) es generalmente cuestión de añadir simplemente la composición de anticuerpo a la muestra e incubar la mezcla durante un período de tiempo lo suficientemente largo para que los anticuerpos formen complejos inmunes con, es decir, para unirse a, cualquiera de los antígenos presentes. Tras ello, la composición de anticuerpo-muestra, tal como una sección de tejido, placa de ELISA, transferencia de puntos o transferencia Western, en general, se lavará para eliminar cualquier especie de anticuerpo unido inespecíficamente, permitiendo la detección de solo aquellos anticuerpos unidos específicamente dentro de los complejos inmunes primarios.

25 En general, la detección de la formación de inmunocomplejos es muy conocida en la técnica y se puede realizar a través de la aplicación de numerosas metodologías. Estas metodologías se basan generalmente en la detección de una etiqueta o marcador, tal como cualquier marcador radiactivo, fluorescente, biológico y enzimático. Las patentes de EE.UU. relativas al uso de dichos marcadores incluyen 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149 y 4.366.241. Por supuesto, se pueden encontrar ventajas adicionales mediante el uso de un ligando de unión secundario tal como un segundo anticuerpo y/o una disposición de unión de ligando de biotina/avidina, como se conoce en la técnica.

30 El anticuerpo empleado en la detección puede estar él mismo unido a un marcador detectable, en el que, por tanto, se podría detectar simplemente este marcador, permitiendo de ese modo la determinación de la cantidad de los complejos inmunes primarios en la composición. Como alternativa, el primer anticuerpo que se une dentro de los complejos inmunes primarios se puede detectar por medio de un segundo ligando de unión que tiene afinidad de unión por el anticuerpo. En estos casos, el segundo ligando de unión puede unirse a un marcador detectable. El segundo ligando de unión suele ser en sí mismo un anticuerpo, que, por lo tanto, se puede denominar anticuerpo "secundario". Los complejos inmunes primarios se ponen en contacto con el ligando de unión secundario, marcado, o anticuerpo, en condiciones eficaces y durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de complejos inmunes secundarios. Entonces, en general, los complejos inmunes secundarios se lavan para eliminar cualquier anticuerpo o ligando secundario marcado unido inespecíficamente, detectándose luego el marcador restante en los complejos inmunes secundarios.

35 Otros métodos incluyen la detección de complejos inmunes primarios mediante una metodología de dos etapas. Se usa un segundo ligando de unión, tal como un anticuerpo, que tenga afinidad de unión por el anticuerpo para formar complejos inmunes secundarios, como se ha descrito anteriormente. Tras lavar, se ponen en contacto los complejos inmunes secundarios con un tercer ligando de unión o anticuerpo que tenga afinidad de unión por el segundo anticuerpo, de nuevo en condiciones eficaces y durante un período de tiempo suficiente para permitir la formación de complejos inmunes (complejos inmunes terciarios). El tercer ligando o anticuerpo se une a un marcador detectable, permitiendo la detección de los complejos inmunes terciarios así formados. Este sistema puede proporcionar la amplificación de la señal si así se desea.

40 Un método de inmunodetección diseñado por Charles Cantor usa dos anticuerpos diferentes. Se usa un anticuerpo monoclonal o policlonal biotinilado de una primera etapa para detectar el/los antígeno/s diana, y se usa un anticuerpo de una segunda etapa para detectar la biotina unida a la biotina complejada. En ese método, la muestra que se va a ensayar se incuba primero en una solución que contiene el anticuerpo de la primera etapa. Si el

antígeno diana está presente, alguno de los anticuerpos se une al antígeno para formar un complejo de anticuerpo/antígeno biotinilado. Luego se amplifica el complejo de anticuerpo/antígeno por incubación en soluciones sucesivas de estreptavidina (o avidina), ADN biotinilado y/o ADN biotinilado complementario, añadiendo en cada etapa sitios de biotina adicionales al complejo anticuerpo/antígeno. Las etapas de amplificación se repiten hasta que se logra un nivel adecuado de amplificación, momento en el que la muestra se incuba en una solución que contiene el anticuerpo de la segunda etapa contra biotina. Este anticuerpo de la segunda etapa se marca, por ejemplo, con una enzima que se pueda usar para detectar la presencia del complejo de anticuerpo/antígeno por histoenzimología usando un sustrato cromógeno. Con la amplificación adecuada, se puede producir un conjugado que sea visible a nivel macroscópico.

Otro método conocido de inmunodetección aprovecha la metodología de inmuno-PCR (reacción en cadena de la polimerasa). El método de PCR es similar al método Cantor hasta la incubación con el ADN biotinilado, sin embargo, en lugar de usar múltiples series de estreptavidina y la incubación de ADN biotinilado, el complejo de ADN/biotina/estreptavidina/anticuerpo se lava con un tampón a pH bajo o muy salino que libera el anticuerpo. La solución de lavado resultante se usa entonces para llevar a cabo una reacción de PCR con cebadores adecuados y con controles apropiados. Al menos en teoría, la enorme capacidad de amplificación y especificidad de la PCR se pueden usar para detectar una sola molécula de antígeno.

i. ELISA

Como se ha detallado anteriormente, los inmunoensayos, en su sentido más simple y directo, son ensayos de unión. Ciertos inmunoensayos preferidos son los diversos tipos de ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) y/o radioinmunoensayos (RIA) conocidos en la técnica. La detección inmunohistoquímica usando secciones de tejido también es particularmente útil. Sin embargo, se apreciará fácilmente que la detección no se limita a dichas técnicas, pudiéndose usar también transferencia Western, transferencia de puntos, análisis de FACS y/o similares.

En un ejemplo de ELISA, los anticuerpos se inmovilizan sobre una superficie seleccionada que presenta afinidad por una proteína, tal como un pocillo de una placa de microtitulación de poliestireno. A continuación, se añade una composición de ensayo sospechosa de contener el antígeno, tal como una muestra clínica, a los pocillos. Después de la unión y/o el lavado para eliminar los complejos inmunes unidos inespecíficamente, se puede detectar el antígeno unido. La detección se consigue generalmente mediante la adición de otro anticuerpo que está unido a un marcador detectable. Este tipo de ELISA es un "ELISA de tipo sándwich" simple. La detección también se puede realizar mediante la adición de un segundo anticuerpo, seguida de la adición de un tercer anticuerpo que tenga afinidad de unión por el segundo anticuerpo, estando el tercer anticuerpo ligado a un marcador detectable. El ELISA se puede basar en la unión diferencial de un anticuerpo con una proteína con Arg389 frente a Gly389.

En otro ejemplo de ELISA, las muestras sospechosas de contener el antígeno se inmovilizan sobre la superficie de un pocillo y/o luego se ponen en contacto con anticuerpos. Tras la unión y/o el lavado para eliminar los complejos inmunes unidos inespecíficamente, se detectan los anti-anticuerpos unidos. Cuando los anticuerpos iniciales están unidos a un marcador detectable, los complejos inmunes se pueden detectar directamente. Una vez más, los complejos inmunes se pueden detectar usando un segundo anticuerpo que tenga afinidad de unión por el primer anticuerpo, estando el segundo anticuerpo unido a un marcador detectable.

Otro ELISA en el que se inmovilizan los antígenos implica el uso de la competencia de los anticuerpos en la detección. En este ELISA, se añaden anticuerpos marcados contra un antígeno a los pocillos, se permite la unión, y/o se detectan por medio de su marcador. Luego, se determina la cantidad de un antígeno en una muestra desconocida mediante la mezcla de la muestra con los anticuerpos marcados contra el antígeno durante la incubación con los pocillos recubiertos. La presencia de un antígeno en la muestra actúa para reducir la cantidad de anticuerpo contra el antígeno disponible para la unión al pocillo y, por lo tanto, reduce la señal final. Esto también es apropiado para la detección de anticuerpos contra un antígeno en una muestra desconocida, donde los anticuerpos no marcados se unen a los pocillos recubiertos con el antígeno, y también reduce la cantidad de antígeno disponible para unirse a los anticuerpos marcados.

Independientemente del formato empleado, el ELISA tiene ciertas características en común, tales como el recubrimiento, la incubación y la unión, el lavado para eliminar las especies unidas inespecíficamente y la detección de los complejos inmunes unidos. Dichas características se describen a continuación.

En el recubrimiento de una placa bien con un antígeno o un anticuerpo, en general, se incubarán los pocillos de la placa con una solución de antígeno o anticuerpo, bien durante la noche o durante un período determinado de horas. A continuación, se lavarán los pocillos de la placa para eliminar el material adsorbido de manera incompleta. Luego se "recubre" cualquier superficie disponible restante de los pocillos con una proteína inespecífica que es antigénicamente neutra con respecto al antisuero de ensayo. Estas incluyen albúmina de suero bovino (BSA), caseína o soluciones de leche en polvo. El recubrimiento permite el bloqueo de sitios de adsorción inespecíficos sobre la superficie de inmovilización y reduce así el fondo causado por la unión inespecífica de antisuero sobre la superficie.

5 En los ELISA, probablemente es más habitual usar un medio de detección secundario o terciario en lugar de un procedimiento directo. Por lo tanto, tras unir una proteína o un anticuerpo al pocillo, recubrir con un material no reactivo para reducir el fondo y lavar para eliminar el material no unido, se pone en contacto la superficie de inmovilización con la muestra biológica que se va a ensayar en condiciones eficaces para permitir la formación del complejo inmune (anticuerpo-antígeno). La detección del complejo inmune requiere entonces un anticuerpo o ligando de unión secundario marcado, y un anticuerpo o ligando de unión secundario en combinación con un anticuerpo terciario marcado o un tercer ligando de unión.

10 "En condiciones eficaces para permitir la formación de complejos inmunes (antígeno/anticuerpo)" significa que las condiciones incluyen preferentemente la dilución de los antígenos y/o anticuerpos con soluciones tales como BSA, globulina γ bovina (BGG) o solución salina tamponada con fosfato (PBS)/Tween. Estos agentes añadidos también tienden a ayudar en la reducción del fondo inespecífico.

15 Las condiciones "adecuadas" también significan que la incubación es a una temperatura o durante un período de tiempo suficiente para permitir la unión eficaz. Las etapas de incubación son normalmente de aproximadamente 1 a 2 a 4 horas aproximadamente, a temperaturas preferentemente del orden de 25 °C a 27 °C, o pueden ser durante una noche a aproximadamente 4 °C.

20 Después de todas las etapas de incubación de un ELISA, se lava la superficie de contacto para eliminar el material no complejo. Un ejemplo de procedimiento de lavado incluye lavar con una solución tal como PBS/Tween, o un tampón de borato. Tras la formación de complejos inmunes específicos entre la muestra de ensayo y el material unido originalmente, y el posterior lavado, se puede determinar la aparición de incluso pequeñas cantidades de complejos inmunes.

25 Para proporcionar un medio de detección, el segundo o tercer anticuerpo tendrá un marcador asociado para permitir la detección. Este puede ser una enzima, que generará coloración tras la incubación con un sustrato cromogénico apropiado. Así pues, por ejemplo, se deseará poner en contacto o incubar el primer y segundo complejo inmune con un anticuerpo conjugado con ureasa, glucosa oxidasa, fosfatasa alcalina o hidrógeno peroxidasa durante un período de tiempo y en condiciones que favorezcan el desarrollo de la formación de más complejos inmunes (por ejemplo, la incubación durante 2 horas a temperatura ambiente en una solución que contenga PBS tal como PBS-Tween).

30 Después de la incubación con el anticuerpo marcado, y el posterior lavado para eliminar el material no unido, se cuantifica la cantidad de marcador, por ejemplo, mediante la incubación con un sustrato cromogénico tal como urea o púrpura de bromocresol, o ácido 2,2'-azino-di-(3-etil-benzotiazolina-6-sulfónico (ABTS) o H₂O₂, en el caso de peroxidasa como marcador enzimático. Luego se realiza la cuantificación midiendo el grado de color generado, por ejemplo, usando un espectrofotómetro de espectro visible.

ii. Inmunohistoquímica

40 Los anticuerpos de la presente divulgación también se pueden usar en combinación con bloques de tejido incluidos en parafina recién congelados y/o fijados en formalina preparados para el estudio mediante inmunohistoquímica (IHC). Por ejemplo, la inmunohistoquímica se puede utilizar para caracterizar la fortalina o para evaluar la cantidad de fortalina en una célula. El método de preparación de bloques de tejido de estas muestras de partículas se ha usado con éxito en estudios de IHC previos de diversos factores de pronóstico, y/o es muy conocido por los expertos en la materia (Brown *et al.*, 1990; Abbondanzo *et al.*, 1990; Allred *et al.*, 1990).

45 En resumen, se pueden preparar secciones congeladas mediante la rehidratación de 50 mg de tejido "pulverizado" congelado a temperatura ambiente en solución salina tamponada con fosfato (PBS) en pequeñas cápsulas de plástico; la aglomeración de las partículas por centrifugación; la resuspensión en un medio de incorporación viscoso (OCT); la inversión de la cápsula y/o la repetición de la aglomeración por centrifugación; la congelación de forma instantánea en isopentano a -70 °C; el corte de la cápsula de plástico y/o la retirada del cilindro de tejido congelado; la fijación del cilindro de tejido en una boquilla de criostato micrótopa; y/o el corte de 25-50 secciones en serie.

50 Las secciones permanentes se pueden preparar mediante un método similar que implica la rehidratación de la muestra de 50 mg en un tubo de microcentrifugación de plástico; la aglomeración; la resuspensión en formalina al 10 % durante 4 horas de fijación; el lavado/la aglomeración; la resuspensión en agar al 2,5 % caliente; la aglomeración; el enfriamiento en agua con hielo para endurecer el agar; la retirada del bloque de tejido/agar del tubo; la infiltración y/o la incorporación del bloque en parafina; y/o el corte de hasta 50 secciones permanentes en serie.

60 V. Ejemplos

65 Los siguientes ejemplos se incluyen para ilustrar adicionalmente diversos aspectos de la invención. Los expertos en la materia apreciarán que las técnicas desveladas en los ejemplos que figuran a continuación representan técnicas y/o composiciones descubiertas por el inventor para que funcionen bien en la práctica de la invención y, por lo tanto, cabe considerar que constituyen modos preferidos para su práctica.

Ejemplo 1: Materiales y métodos

Fuentes de muestras de ADN canino. Las muestras de ADN individuales de perros normales y afectados por MD se obtuvieron del Centro de Información de Salud Canina (CHIC), Repositorio de ADN (www.caninehealthinfo.org/) y de colecciones de ADN de la Universidad de Missouri, el Instituto Broad de Harvard y el Instituto Tecnológico de Massachusetts y la Universidad de Pensilvania. El grupo de control de otras razas consistía en 2 individuos seleccionados al azar y sin relación de entre 60 razas de perros, en las que la MD rara vez, o nunca, se ha detectado.

Diagnóstico de MD. Los casos de MD se encontraron en perros de propiedad privada que fueron enviados a uno de los colegios de medicina veterinaria participantes. Dependiendo de la disponibilidad de los tejidos y de la información clínica, se hicieron diagnósticos de MD basándose en 4 grupos de criterios de diferente rigurosidad. Los inventores consideraron la confirmación de MD por histopatología como el criterio más riguroso para el diagnóstico de MD (nivel de rigurosidad 1); sin embargo, no se disponía de las médulas espinales de todos los perros del estudio. Los diagnósticos de MD en los niveles de rigurosidad 2 y 3 se basaron en la presencia de signos clínicos típicos y en la ausencia de una lesión de compresión detectable por resonancia magnética (nivel 2) o mielografía (nivel 3). Los diagnósticos menos rigurosos (nivel 4) se basaron únicamente en los signos clínicos, que incluían paresia de la neurona motora superior progresiva y ataxia propioceptiva general.

Cartografía de asociación. Se realizó un análisis GWA usando el "Panel de Platino" de matriz de Affymetrix Canine Genome 2.0, que contiene 49.663 marcadores de SNP en 38 casos (clasificación diagnóstica: puntuación 1 $n = 21$, 2 $n = 5$, 3 $n = 2$, 4 $n = 10$) y 17 controles. Los genotipos de SNP se obtuvieron siguiendo el protocolo de la matriz 500K humana, pero con un volumen de hibridación inferior para permitir una menor superficie de la matriz canina como se describe en otro lugar (Karlsson *et al.*, 2007). La información detallada sobre las matrices está disponible en www.broad.mit.edu/node/456. Se evaluó la cartografía GWA de casos y controles usando PLINK (Purcell *et al.*, 2007), seguido de la identificación de una región de homocigosis en los individuos afectados basándose en los genotipos de SNP. Se realizó una cartografía fina usando ensayos de MassARRAY (Sequenom) para 63 SNP de 207 muestras de 5 razas como se ha descrito previamente (Karlsson *et al.*, 2007). El análisis del haplotipo se realizó con Haploview (Barrett *et al.*, 2005). Las fuentes de muestras usadas para la cartografía fina se identifican en la Fig. 1C.

Resecuenciación y genotipado. Se volvieron a secuenciar los exones 2 a 5 de *SOD1* canino después de la amplificación por PCR de ADN genómico de perros afectados de MD y normales. Se diseñaron cebadores de oligonucleótido a partir de secuencias que flanqueaban estos exones desde la acumulación 2.1 de la secuencia de referencia del genoma canino (www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid_9615). Dado que el exón 1 de *SOD1* no está representado en la acumulación 2.1, los inventores usaron RT-PCR para amplificar los segmentos de ARN que contenían el exón 1 del ARN total extraído de sangre de los perros afectados de MD y normales con thePAXgeneBloodRNAKit (Qiagen). Los cebadores de RT-PCR se diseñaron a partir de la secuencia de consenso producida a partir de una alineación de todos los marcadores de secuencias expresadas que contenían el exón 1 caninas del GenBank. Se secuenciaron amplicones de PCR y RT-PCR purificados con un analizador de ADN 3730x1 de Applied Biosystems. Algunas de las muestras de ADN canino se genotiparon en el locus *SOD1:c.118G>A* por pirosecuenciación con un pirosecuenciador PSQ 96.

Los cebadores de PCR fueron 5'-biotinil-AGTGGGCTGTTGTGGTATCA con CTCCAACTGATGGACGTGGAAT, y se usó AATCCATGCTCGCCTT para el cebador de secuenciación. Se compararon las distribuciones de los genotipos de las muestras afectadas y de control usando tablas de contingencia de 2 x 2, en las que los genotipos A/G y G/G se agruparon bajo el supuesto de herencia autosómica recesiva. Se usó un ensayo de discriminación alélica TaqMan[®] para determinar el genotipo de otras muestras de ADN canino. Las secuencias de los cebadores de PCR para este ensayo fueron GTGGGCTGTTGTGGTATCA con CAAACTGATGGACGTGGAATCC, y las secuencias de sonda marcadas con fluorescente en competición fueron VIC-CTCGCCTTTAGTCAGC (mutante) y FAM-CGCCTTCAGTCAGC. Se usó el ensayo exacto de Fisher de 1 cola para analizar la independencia de las clases genotípicas entre las muestras de casos y controles.

Pruebas de histopatología, inmunohistopatología y electrodiagnóstico. Se usaron los procedimientos convencionales para las pruebas de histopatología, inmunohistopatología y electrodiagnóstico. Se codificaron las muestras usadas para la inmunohistoquímica de *SOD1*, y se obtuvieron micrografías de las neuronas motoras de la médula espinal de una manera enmascarada. Un segundo evaluador enmascarado clasificó las neuronas en las micrografías de acuerdo con la presencia y la aparición de inclusiones positivas en *SOD1* basándose en las siguientes categorías: agrupaciones de tinción oscura bien definidas, agrupaciones de tinción clara bien definidas, regiones de tinción clara mal definidas, y ausencia de tinción o tinción clara difusa similar a la tinción de fondo. Se examinaron de 6 a 9 secciones de cada médula.

Ejemplo 2: Resultados

Cartografía del locus de MD e identificación de una mutación sin sentido de *SOD1*. Se realizó la cartografía de asociación amplia del genoma (GWA) de la MD con 38 casos y 17 controles de más de 6 años de vida (edad media

= 9,4 años) de la raza corgi galés de Pembroke usando la matriz Affymetrix Canine Genome 2.0. La asociación más potente se detectó en CFA31 ($p_{bruto} = 1 \times 10^{-5}$; $p_{genoma} = 0,18$), con señales más débiles en otros 4 cromosomas, que sugieren modificadores o subestructura de población (Fig. 1A.). Dentro de la región CFA31 asociada, todos los perros afectados eran homocigotos para un haplotipo común de 28,91 a 29,67 Mb (CanFam2.0), que contiene 3 genes: *SOD1*, *TIAM1* y *SFRS15*. Las similitudes clínicas entre la MD y ELA hicieron de *SOD1* un gen candidato viable. La resecuenciación de *SOD1* de perros normales y perros afectados de MD reveló una transición de G a A en el exón 2 que predice una mutación sin sentido E40K. Se genotiparon las 55 muestras de ADN de corgi para el polimorfismo *SOD1*:c118G>A. El total de las 38 muestras de los corgis afectados resultaron ser homocigóticas para el alelo A, mientras que el grupo de control asintomático de 17 muestras consistió en 10 homocigotos A/A, 6 heterocigotos A/G y homocigoto 1 G/G.

Para verificar la localización de la mutación de MD, los inventores cartografiaron bien 90 SNP en una región de 1,9 Mb de 29,04 a 30,97 Mb en 5 razas, que segregaban para MD (Fig. 1B). Los perros afectados de las 5 razas comparten un haplotipo de 5 SNP (máximo de 195 kB de tamaño), que contiene la mutación E40K (Fig. 1C). Este haplotipo también está presente en los perros que no tienen la mutación. Ningún otro SNP o haplotipo de la región es compartido a la vez en todas las razas y concordante con la herencia recesiva. Por lo tanto, la proporción significativa de homocigotos A/A mutantes entre los controles y la presencia de la mutación E40K en un haplotipo ancestral todavía presente en la población pueden explicar la GWA relativamente débil para esta región. Sin embargo, los datos genéticos presentados vinculan con solidez la mutación E40K con la enfermedad.

El genotipado adicional confirma una asociación entre la MD y la homocigosis para la mutación sin sentido de *SOD1*. Se genotiparon los corgis galeses de Pembroke usados para la GWA, más 64 corgis galeses de Pembroke más y 418 representantes de otras 4 razas, para el polimorfismo *SOD1*:c118G>A. En todas las razas, 100 de las muestras eran de perros diagnosticados de MD; sin embargo, estos diagnósticos no se basaron en criterios igualmente rigurosos (véase Métodos). La Tabla 1 muestra la distribución de los genotipos para los 537 representantes de las 5 razas por clase de diagnóstico. Se detectaron asociaciones significativas entre el fenotipo MD y la homocigosis para el alelo A al analizar conjuntamente los 5 razas afectadas ($P = 2.93E-19$) y al analizar individualmente cada raza (Tabla 1). La frecuencia del alelo A en un grupo de control independiente "de otras razas", que consistía en muestras de razas de perros en las que la MD rara vez es diagnosticada, fue significativamente inferior a la de los controles de las razas afectadas (Tabla 1). Los 4 perros del estudio que fueron clasificados como afectados, pero que no eran homocigotos A/A, fueron diagnosticados usando los criterios menos rigurosos y pueden ser fenocopias.

Tabla 1 – Asociaciones entre el fenotipo MD y la homocigosis

Raza	MD Rigurosidad 1	MD Rigurosidades 1 y 2	MD Rigurosidades 1 y 3	MD Rigurosidades 1 y 4	Controles de razas afectadas	Control es de otras razas
	AA/AG/GG	AA/AG/GG	AA/AG/GG	AA/AG/GG	AA/AG/GG	AA/AG/GG
Bóxer	9/0/0*	10/0/0*	12/0/0*	22/0/0**	86/57/14	-
Retriever de Chesapeake	7/0/0**	9/0/0**	9/0/0**	10/0/0**	7/25/21	-
Pastor alemán	2/0/0*	4/0/0**	4/0/0**	4/0/1**	7/30/84	-
Corgi galés de Pembroke	25/0/0**	30/0/0**	35/0/0**	50/1/1**	44/14/9	-
Ridgeback de Rodesia	3/0/0*	6/0/0**	6/0/0**	10/1/0**	4/15/21	-
Todos los perros afectados	46/0/0***	59/0/0***	66/0/0***	96/2/2***	148/141/148	0/5/115* **

* - Diferente de los controles específicos de la raza a $P < 0,01$

** - Diferente de los controles específicos de la raza a $P < 0,001$

*** - Diferente a todos los controles de razas afectadas a $P < 0,00001$

Rigurosidad 1 de MD = confirmada histopatológicamente

Rigurosidad 2 de MD = presunto diagnóstico por MRI

Rigurosidad 3 de MD = presunto diagnóstico por mielografía

Rigurosidad 4 de MD = signos clínicos sugerentes para un presunto diagnóstico

Los perros con MD presentan síntomas y lesiones histopatológicas e inmunohistopatológicas similares a las de los pacientes con ELA. El diagnóstico de MD se confirmó por examen histopatológico de secciones de médula espinal de 46 perros. Los perros afectados tenían lesiones en la parte posterior y lateral de la columna (Fig. 2A-B). Se examinaron por inmunohistopatología las neuronas de la médula espinal supervivientes de 7 perros afectados de MD y 10 perros de control asintomáticos de edad similar. Los 7 perros afectados de MD eran homocigotos A/A, y todos contenían inclusiones citoplasmáticas, que, al tñirlas con anticuerpos anti-SOD1, aparecieron como agrupaciones oscuras bien definidas. Por el contrario, no se encontró tinción o se encontró tinción clara difusa

similar a la tinción de fondo en las células de las médulas espinales de los 5 perros de control con el genotipo G/G y en 3 de los 5 controles heterocigotos A/G. Se observaron niveles intermedios de tinción citoplasmática con anticuerpos anti-SOD1 en las médulas espinales de los 2 perros de control heterocigotos restantes (Fig. 3A-I).

5 Aunque la mayoría de los perros con MD son sacrificados en una fase temprana de la enfermedad, cuando la patología de las neuronas motoras superiores predomina, los propietarios de algunos perros del estudio decidieron mantener a sus perros con vida hasta que la enfermedad estuvo más avanzada. Los perros con MD avanzada mostraron signos clínicos de la enfermedad de las neuronas motoras inferiores, incluyendo tetraparesia flácida ascendente, atrofia muscular generalizada e hiporreflexia en todas las extremidades. Un Corgi galés de Pembroke afectado de MD fue sacrificado 48 meses después de la aparición de los signos clínicos debido a las dificultades para tragar, lo que sugiere que la enfermedad puede progresar a signos bulbares. En la etapa temprana de la enfermedad, no se detectó ninguna actividad espontánea por electromiografía (EMG) y las velocidades de conducción nerviosa se encontraban dentro de los límites normales. En la etapa tardía de la enfermedad, la EMG reveló actividad espontánea multifocal en la musculatura apendicular distal. Los potenciales de fibrilación y las ondas agudas fueron las formas de onda más comunes registradas. En comparación con los intervalos de referencia específicos de los perros (Walker *et al.*, 1979), los potenciales de acción muscular del compuesto (ondas M) registrados en los nervios tibial y cubital mostraron la dispersión temporal y reducciones de amplitudes, y las velocidades de conducción nerviosa motora se redujeron (datos no mostrados). Las muestras de músculo de los perros con MD avanzada mostraron una variabilidad excesiva en el tamaño de las miofibras con grupos grandes y pequeños de fibras atroficas típicas de la denervación (Fig. 4A). Las muestras de nervios periféricos de estos perros mostraron pérdida de fibras nerviosas, como se indica por la degeneración axonal, fibrosis endoneurial, numerosas fibras finamente mielinizadas de manera inadecuada y desmielinización secundaria (Fig. 4C).

25 **Penetrancia incompleta relacionada con la edad.** Muchos de los 148 homocigotos A/A del grupo de control de "razas afectadas" tenían una edad en el momento del muestreo inferior a la edad típica de aparición de los signos clínicos de la MD (Fig. 5). Algunos de estos perros pueden desarrollar MD cuando se hagan mayores. No obstante, el número considerable de homocigotos A/A entre los controles de razas afectadas de más edad que presentaban signos no clínicos de MD (Fig. 5) indica que la penetrancia entre homocigotos A/A es incompleta, posiblemente debido a los locus modificadores, factores ambientales y/o porque los homocigotos A/A mueren por otras causas antes de que los signos clínicos se hagan evidentes.

35 Para determinar si el alelo A de *SOD1* se da en otras razas además de en las 5 razas sometidas a los primeros experimentos de la presente invención, se genotiparon más de 6.600 muestras de ADN canino seleccionadas de una colección de más de 60.000 muestras de ADN mantenida en la Universidad de Missouri (Tabla 2). El alelo A se detectó en 57 de 147 razas. Entre las razas en las que se detectó el alelo A, las frecuencias del alelo variaron del 90 % en el fox terrier de pelo duro al 1 % en perros labradores.

Tabla 2 - Frecuencias del alelo de SOD1 asociado a la MDC en diversas razas de perros

Raza	TOTAL	Normal	Portador	En riesgo	Frecuencia alélica (%)
Fox Terrier – pelo duro	39	1	6	32	90
Corgi galés de Pembroke	626	28	173	425	81
Bóxer	711	84	240	387	71
Híbrido/raza mestiza	44	18	5	21	53
Cavalier King Charles Spaniel	11	1	9	1	50
Pastor holandés	1	0	1	0	50
Perro de agua americano	47	15	21	11	46
Retriever de Chesapeake	553	188	235	130	45
Boyero de Berna	38	14	17	7	41
Perro esquimal americano	10	3	6	1	40
Doguillo	13	6	4	3	38
Kerry Blue Terrier	153	70	54	29	37
Perro de Canaán	113	51	50	12	33
Ridgeback de Rodesia	514	237	218	59	33
Corgi galés de Cardigan	79	36	35	8	32
Pastor alemán	445	247	112	86	32
Terrier tibetano	43	23	15	5	29
Perro de San Huberto	32	16	14	2	28
Terrier galés	52	29	18	5	27
Bulldog francés	33	21	9	3	23
Kuvasz	60	39	16	5	22

ES 2 529 465 T3

Chow Chow	22	14	7	1	20
Crestado chino	30	19	11	0	18
Setter irlandés	31	21	9	1	18
Terrier australiano	3	2	1	0	17
Airedale Terrier	30	21	9	0	15
Dálmata	33	32	1	0	15
Sealyham Terrier	30	21	9	0	15
Pomerania	29	22	6	1	14
Jack Russell Terrier	27	21	5	1	13
Mastín (mastín inglés)	31	24	6	1	13
Retriever de Nueva Escocia	32	25	6	1	13
Pastor australiano	34	27	6	1	12
Pastor belga	4	3	1	0	12
Collie	29	22	7	0	12
Springer Spaniel inglés	72	56	14	2	12
Montaña de los Pirineos	26	21	4	1	12
Collie de la frontera	28	25	1	2	9
Pastor de Shetland	29	24	5	0	9
Shih Tzu	8	3	4	1	9
Terrier irlandés de manto suave color trigo	29	24	5	0	9
Cotón de Tuléar	30	26	4	0	7
Harrier	28	24	4	0	7
Pastor inglés	27	24	3	0	6
Pastor finlandés	31	27	4	0	6
Caniche	77	70	5	2	6
Stafford inglés	33	31	0	2	6
Pastor ganadero australiano	46	41	5	0	5
Beagle	31	28	3	0	5
Clumber Spaniel	33	30	3	0	5
Terrier irlandés	30	27	3	0	5
Pinscher alemán	30	28	2	0	3
Lobero irlandés	31	29	2	0	3
Spitz finlandés	32	31	1	0	2
Keeshond	29	28	1	0	2
Rottweiler	26	25	1	0	2
Labrador retriever	59	58	1	0	1
Lebrel afgano	1	1	0	0	0
Akita	33	33	0	0	0
Husky de Alasca	1	1	0	0	0
Malamute de Alasca	36	36	0	0	0
Bulldog americano	31	31	0	0	0
Foxhound americano	1	1	0	0	0
Staffordshire Terrier americano	6	6	0	0	0
Basenji	33	33	0	0	0
Basset Hound	28	28	0	0	0
Collie barbudo	29	29	0	0	0
Beauceron	2	2	0	0	0
Bedlington Terrier	29	29	0	0	0
Pastor belga malinois	4	4	0	0	0
Bichón Frisé	9	9	0	0	0
Border Terrier	30	30	0	0	0
Borzoi	2	2	0	0	0

ES 2 529 465 T3

Boston Terrier	6	6	0	0	0
Boyero de Flandes	45	45	0	0	0
Pastor de Brie	6	6	0	0	0
Spaniel bretón	31	31	0	0	0
Bull Terrier	1	1	0	0	0
Cairn Terrier	15	15	0	0	0
Shar Pei chino	26	26	0	0	0
Chinook	26	26	0	0	0
Cocker Spaniel (americano)	28	28	0	0	0
Retriever de pelo rizado	30	30	0	0	0
Perro tejón	44	44	0	0	0
Dandie Dinmont Terrier	31	31	0	0	0
Dóberman	31	31	0	0	0
Dogo de Burdeos	6	6	0	0	0
Cocker Spaniel inglés	28	28	0	0	0
Foxhound inglés	1	1	0	0	0
Setter inglés	27	27	0	0	0
Spaniel de campo	30	30	0	0	0
Retriever de pelo liso	30	30	0	0	0
Fox Terrier de pelo liso	12	12	0	0	0
Braco alemán de pelo corto	29	29	0	0	0
Schnauzer gigante	32	32	0	0	0
Golden Retriever	74	72	0	2	3
Setter escocés	31	31	0	0	0
Gran danés	27	27	0	0	0
Gran boyero suizo	36	36	0	0	0
Bichón habanero	11	11	0	0	0
Podenco ibicenco	31	31	0	0	0
Pastor islandés	30	30	0	0	0
Setter irlandés rojo y blanco	13	13	0	0	0
Spaniel de agua irlandés	28	28	0	0	0
Lebrel italiano	31	31	0	0	0
Spaniel japonés	2	2	0	0	0
Leonberger	31	31	0	0	0
Lhasa Apso	17	17	0	0	0
Pequeño perro león	33	33	0	0	0
Manchester Terrier (Toy y estándar)	30	30	0	0	0
Bull Terrier (miniatura)	32	32	0	0	0
Pinscher miniatura	0	0	0	0	0
Schnauzer miniatura	3	3	0	0	0
Mastín napolitano	12	12	0	0	0
Terranova	25	25	0	0	0
Lundehund	1	1	0	0	0
Terrier de Norwich	2	2	0	0	0
Antiguo pastor inglés	34	34	0	0	0
Otterhound	29	29	0	0	0
Papillón	1	1	0	0	0
Grifón vandeano basset pequeño	32	32	0	0	0
Parson Russell Terrier	2	2	0	0	0
Podenco faraónico	30	30	0	0	0
Pointer	28	28	0	0	0
Perro de agua portugués	33	33	0	0	0

Pastor del pirineo	29	29	0	0	0
San Bernardo	27	27	0	0	0
Saluki	2	2	0	0	0
Samoyedo	30	30	0	0	0
Schipperke	28	28	0	0	0
Lebrel escocés	36	36	0	0	0
Terrier escocés	27	27	0	0	0
Shiba Inu	8	8	0	0	0
Husky siberiano	54	54	0	0	0
Spinone Italiano	2	2	0	0	0
Schnauzer estándar	25	25	0	0	0
Sussex Spaniel	28	28	0	0	0
Valhund sueco	3	3	0	0	0
Mastín tibetano	10	10	0	0	0
Spaniel tibetano	2	2	0	0	0
Toy Fox Terrier	2	2	0	0	0
Vizsla	28	28	0	0	0
Braco de Weimar	29	29	0	0	0
Springer Spaniel galés	32	32	0	0	0
West Highland White Terrier	3	3	0	0	0
Whippet	39	39	0	0	0
Grifón Korthals	5	5	0	0	0
Totales	6.631	3.989	1.412	1.230	

Ejemplo 3: Discusión

- 5 Hasta ahora, el alelo A asociado a MD se ha detectado en 57 razas de perros diferentes. La presencia de amplia propagación del alelo A en muchas razas de perros sin relación indica que el alelo A es anterior al desarrollo de las diferentes razas de perros. Esto indica que es probable que el alelo A se dé en cierta medida en la mayoría o en todas las razas de perros. Por lo tanto, los ensayos de genotipado de *SOD1* son aplicables a todas las razas de perros y a los perros mestizos.
- 10 *SOD1* funciona como un homodímero que convierte los radicales superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular. Los sitios activos de cada subunidad contienen un ión de cobre y un ión de cinc dentro de un barril β anti-paralelo de ocho hebras (Tainer *et al.*, 1982). La posición del aminoácido 40 se encuentra dentro de un bucle de conexión entre las hebras β 3 y 4 (Green *et al.*, 2002), lo que sirve como conexión de llave griega corta entre los dos conjuntos de hebras β que componen el barril β (hebras 1, 2, 3 y 6 y hebras 4, 5, 7 y 8) (Boissinot *et al.*, 1997). La
- 15 posición del aminoácido 40 del *SOD1* humano se encuentra dentro de una región que contiene un grupo de mutaciones sin sentido que se asocian con la ELA humana (Deng *et al.*, 1993; Valentine *et al.*, 2005; Sandelin *et al.*, 2007), incluyendo E40G en una posición ortóloga a la mutación E40K canina (Sandelin *et al.*, 2007). Se cree que las mutaciones adyacentes G41S y G41D causan ELA desestabilizando tanto el monómero *SOD1* como la superficie de contacto de dimerización (Lindberg *et al.*, 2005). La mutación E40G humana y muchas otras mutaciones de *SOD1*
- 20 asociadas a la ELA reducen la carga negativa neta del producto proteico predicho (Sandelin *et al.*, 2007; Shaw *et al.*, 2007). Estas isoformas de *SOD1* pueden ser propensas a la formación de agregados de *SOD1* tóxicos debido a la reducción de las fuerzas de Coulomb de repulsión, o debido a una mayor interacción con las superficies de las membranas aniónicas (Sandelin *et al.*, 2007; Shaw *et al.*, 2007). Por lo tanto, la reducción de la carga negativa neta para *SOD1* canino causada por la mutación E40K puede ser relevante. Un glutamato en una posición
- 25 correspondiente a la posición del aminoácido 40 en el *SOD1* canino se conserva en 19 de 20 mamíferos identificados en una consulta Blastp de las secuencias de proteínas no redundantes en la base de datos NCBI (Tabla 3). La excepción es el *SOD1* equino que, como el alelo mutante canino, tiene una lisina en la posición del aminoácido 40. Los inventores volvieron a secuenciar el exón 2 de *SOD1* de cinco caballos no relacionados y confirmaron que los caballos tienen comúnmente una lisina en esta posición (datos no mostrados). Esta inusual
- 30 lisina puede ser tolerada debido a la mejora de las sustituciones de aminoácidos en otras partes del *SOD1* equino.

Organismo	Secuencia	SEC ID N°:
Perro (alelo de tipo silvestre)		10
Rata	FVQKGSG-PVVVSGTITGLT GG GEHGFHVHQFGDNTQGCTSAG	11
Cobaya	FVQKGSG-PVVVSGTITGLT GG GEHGFHVHQFGDNTQGCTSAG	12
Ratón	FVQKGSG-PVVVSGTITGLT GG GEHGFHVHQFGDNTQGCTSAG	13
Conejo	FVQKGSG-PVVVSGTITGLT GG GEHGFHVHQFGDNTQGCTSAG	14
Mono Rhesus	FVQKGSG-PVVVSGTITGLT GG GEHGFHVHQFGDNTQGCTSAG	15
Gibón común	FVQKGSG-PVVVSGTITGLT GG GEHGFHVHQFGDNTQGCTSAG	16
Ciervo común	FVQKGSG-PVVVSGTITGLT GG GEHGFHVHQFGDNTQGCTSAG	17
Ganado	FVQKGSG-PVVVSGTITGLT GG GEHGFHVHQFGDNTQGCTSAG	18
Oveja	FVQKGSG-PVVVSGTITGLT GG GEHGFHVHQFGDNTQGCTSAG	19
Macaco cangrejero	FVQKGSG-PVVVSGTITGLT GG GEHGFHVHQFGDNTQGCTSAG	20
Yak doméstico	FVQKGSG-PVVVSGTITGLT GG GEHGFHVHQFGDNTQGCTSAG	21
Cabra	FVQKGSG-PVVVSGTITGLT GG GEHGFHVHQFGDNTQGCTSAG	22
Cerdo	FVQKGSG-PVVVSGTITGLT GG GEHGFHVHQFGDNTQGCTSAG	23
Tití de orejas blancas	FVQKGSG-PVVVSGTITGLT GG GEHGFHVHQFGDNTQGCTSAG	24
Capuchino marrón	FVQKGSG-PVVVSGTITGLT GG GEHGFHVHQFGDNTQGCTSAG	25
Colicorto gris	FVQKGSG-PVVVSGTITGLT GG GEHGFHVHQFGDNTQGCTSAG	26
Ser humano	FVQKGSG-PVVVSGTITGLT GG GEHGFHVHQFGDNTQGCTSAG	27
Orangután	FVQKGSG-PVVVSGTITGLT GG GEHGFHVHQFGDNTQGCTSAG	28
Caballo	FVQKGSG-PVVVSGTITGLT GG GEHGFHVHQFGDNTQGCTSAG	29
Perro (alelo mutante)	FVQKGSG-PVVVSGTITGLT GG GEHGFHVHQFGDNTQGCTSAG	30

5 La médula espinal torácica de todos los perros afectados de MD resultó tener regiones bilaterales de esclerosis de sustancia blanca más prominente en la parte dorsal del funículo lateral hacia la zona de entrada de la raíz dorsal. Quedaban unos cuantos axones en la sustancia blanca afectada. Las zonas escleróticas se tiñeron más oscuras con GFAP que la sustancia blanca de alrededor. Se produjo un aumento leve del número de microglías en el tejido afectado. Las secciones longitudinales de los nervios tenían un reducido diámetro axonal y muchas vainas de axón aparecían colapsadas. Las muestras musculares examinadas consistían principalmente en grasa, y las fibras musculares que quedaban eran atroficas y algo angulares. No se observaron inclusiones en el microscopio de luz.

10 Sin embargo, los inventores encontraron que muchas neuronas de la médula espinal supervivientes de los perros afectados acumulaban inclusiones citoplasmáticas que se tiñeron enormemente con los anticuerpos anti-SOD1; mientras que, solo se encontró una tinción de SOD1 ligera y difusa en la médula espinal de los perros de control de la misma edad. Los hallazgos encontrados con el microscopio de luz en la médula espinal de los perros afectados, así como los signos clínicos fueron comparables a la forma de aparición de las neuronas motoras superiores de la

15 ELA. Por otra parte, las inclusiones en la médula espinal de estos perros fueron similares a las encontradas en pacientes de ELA con mutaciones *SOD1* y en modelos de roedores h*SOD1*^m transgénicos.

20 La MD parece ser una enfermedad autosómica recesiva incompletamente penetrante; mientras que, la mayoría de las mutaciones de *SOD1* humanas causan formas dominantes de ELA. Sin embargo, la variante de *SOD1* N90A se asocia con una forma hereditaria recesiva de ELA en algunas familias, y una forma hereditaria dominante de ELA en otras (Andersen *et al.*, 1996). Entre las familias segregantes de la forma dominante de ELA, los pacientes con dos copias del *SOD1* mutante generalmente tienen una edad mucho menor en el inicio de la enfermedad que los pacientes que heredan una sola copia (Hayward *et al.*, 1998; Marucci *et al.*, 2007). Además, los ratones h*SOD1*^m con mayor número de copias del transgén presentan la enfermedad con inicio más temprano; y la enfermedad se

25 presenta mucho antes en ratones h*SOD1*^m homocigotos que heterocigotos (Jonsson *et al.*, 2006). En estos ejemplos, la aparición de los signos clínicos fue inversamente proporcional al número de copias del *SOD1* mutante. Con la MD canina, la edad de inicio para los heterocigotos *SOD1*:c.118G>A puede superar la expectativa de vida normal canina. En este caso, el modo de herencia parecería ser recesivo, incluso si la patogénesis implica una ganancia de función.

30

El descubrimiento de que la mutación sin sentido E40K es un importante factor de riesgo genético subyacente a la MD canina debería permitir a los criadores de perros usar la reproducción basada en marcadores para evitar la producción de futuras generaciones de perros en riesgo de desarrollar MD. Sin embargo, los perros afectados nacidos antes de contar con un ensayo de marcadores de MD continuarán desarrollando los signos clínicos. Por lo tanto, se tardará al menos una década en conseguir que la reproducción basada en marcadores pueda reducir sustancialmente la incidencia de esta enfermedad de aparición tardía. Mientras tanto, miles de perros afectados de propiedad privada seguirán sufriendo MD. Se espera que las futuras investigaciones realizadas en los perros afectados permitan comprender mejor los procesos patológicos subyacentes tanto a la MD canina como a la ELA humana y, en última instancia, den lugar a intervenciones terapéuticas que beneficien tanto a pacientes humanos como a caninos. A este sentido, se ha encontrado una amplia variedad de posibles agentes terapéuticos para influir en la edad de inicio y/o la velocidad de progresión de la enfermedad en modelos murinos hSOD1^m. Sin embargo, estos agentes rara vez han generado buenos resultados en los ensayos clínicos realizados en seres humanos (Benatar, 2007; Orrell *et al.*, 2007). En comparación con el modelo murino hSOD1^m, los perros con MD son más similares a los seres humanos en tamaño, en la estructura del sistema nervioso y en la duración de la enfermedad. Además, es poco probable que posean los niveles tan altos de expresión de SOD1 producidos por muchos de los modelos murinos hSOD1^m. Por lo tanto, los resultados de los ensayos clínicos realizados con perros afectados de MD pueden predecir mejor el éxito de las intervenciones terapéuticas para el tratamiento de ELA.

Todas las composiciones y los métodos desvelados y/o reivindicados en el presente documento se pueden realizar y ejecutar sin la necesidad de experimentación a la luz de la presente divulgación. Aunque las composiciones y los métodos desvelados se han descrito en términos de realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la materia que es posible aplicar variaciones a las composiciones y a los métodos, así como a las etapas o a la secuencia de etapas de los métodos descritos en el presente documento. Más concretamente, será evidente que ciertos agentes que están tanto química como fisiológicamente relacionados se pueden sustituir con los agentes descritos en el presente documento, obteniéndose los mismos resultados o resultados similares.

VI. Referencias

En el presente documento, se desvelan las siguientes referencias, en la medida en que proporcionen ejemplos de procedimientos u otros datos complementarios a los expuestos en el presente documento.

Patente de EE.UU. Nº 3.817.837
 Patente de EE.UU. Nº 3.850.752
 Patente de EE.UU. Nº 3.939.350
 Patente de EE.UU. Nº 3.996.345
 Patente de EE.UU. Nº 4.196.265
 Patente de EE.UU. Nº 4.275.149
 Patente de EE.UU. Nº 4.277.437
 Patente de EE.UU. Nº 4.366.241
 Patente de EE.UU. Nº 4.582.788
 Patente de EE.UU. Nº 4.656.127
 Patente de EE.UU. Nº 4.659.774
 Patente de EE.UU. Nº 4.682.195
 Patente de EE.UU. Nº 4.683.194
 Patente de EE.UU. Nº 4.683.195
 Patente de EE.UU. Nº 4.683.202
 Patente de EE.UU. Nº 4.800.159
 Patente de EE.UU. Nº 4.816.571
 Patente de EE.UU. Nº 4.883.750
 Patente de EE.UU. Nº 4.946.773
 Patente de EE.UU. Nº 4.959.463
 Patente de EE.UU. Nº 4.965.188
 Patente de EE.UU. Nº 5.130.238
 Patente de EE.UU. Nº 5.141.813
 Patente de EE.UU. Nº 5.169.766
 Patente de EE.UU. Nº 5.264.566
 Patente de EE.UU. Nº 5.279.721
 Patente de EE.UU. Nº 5.428.148
 Patente de EE.UU. Nº 5.554.744
 Patente de EE.UU. Nº 5.574.146
 Patente de EE.UU. Nº 5.602.244
 Patente de EE.UU. Nº 5.605.798
 Patente de EE.UU. Nº 5.645.897
 Patente de EE.UU. Nº 5.705.629
 Patente de EE.UU. Nº 5.840.873
 Patente de EE.UU. Nº 5.843.640

Patente de EE.UU. Nº 5.843.651
 Patente de EE.UU. Nº 5.846.708
 Patente de EE.UU. Nº 5.846.717
 Patente de EE.UU. Nº 5.846.726
 5 Patente de EE.UU. Nº 5.846.729
 Patente de EE.UU. Nº 5.849.487
 Patente de EE.UU. Nº 5.853.990
 Patente de EE.UU. Nº 5.853.992
 Patente de EE.UU. Nº 5.853.993
 10 Patente de EE.UU. Nº 5.856.092
 Patente de EE.UU. Nº 5.861.244
 Patente de EE.UU. Nº 5.863.732
 Patente de EE.UU. Nº 5.863.753
 Patente de EE.UU. Nº 5.866.331
 15 Patente de EE.UU. Nº 5.905.024
 Patente de EE.UU. Nº 5.910.407
 Patente de EE.UU. Nº 5.912.124
 Patente de EE.UU. Nº 5.912.145
 Patente de EE.UU. Nº 5.919.630
 20 Patente de EE.UU. Nº 5.925.517
 Patente de EE.UU. Nº 5.928.862
 Patente de EE.UU. Nº 5.928.869
 Patente de EE.UU. Nº 5.929.227
 Patente de EE.UU. Nº 5.932.413
 25 Patente de EE.UU. Nº 5.935.791
 Patente de EE.UU. Nº 5.843.650
 Patente de EE.UU. Nº 5.843.663
 Patente de EE.UU. Nº 5.846.709
 Patente de EE.UU. Nº 5.846.783
 30 Patente de EE.UU. Nº 5.849.481
 Patente de EE.UU. Nº 5.849.483
 Patente de EE.UU. Nº 5.849.486
 Patente de EE.UU. Nº 5.849.497
 Patente de EE.UU. Nº 5.849.546
 35 Patente de EE.UU. Nº 5.849.547
 Patente de EE.UU. Nº 5.851.770
 Patente de EE.UU. Nº 5.851.772
 Patente de EE.UU. Nº 5.858.652
 Patente de EE.UU. Nº 5.866.337
 40 Patente de EE.UU. Nº 5.866.366
 Patente de EE.UU. Nº 5.900.481
 Patente de EE.UU. Nº 5.912.148
 Patente de EE.UU. Nº 5.916.776
 Patente de EE.UU. Nº 5.916.779
 45 Patente de EE.UU. Nº 5.919.626
 Patente de EE.UU. Nº 5.922.574
 Patente de EE.UU. Nº 5.925.525
 Patente de EE.UU. Nº 5.928.870
 Patente de EE.UU. Nº 5.928.905
 50 Patente de EE.UU. Nº 5.928.906
 Patente de EE.UU. Nº 5.932.451
 Patente de EE.UU. Nº 5.935.825
 Patente de EE.UU. Nº 5.939.291
 Patente de EE.UU. Nº 5.942.391
 55 Patente de EE.UU. Nº 5.952.174
 Abbondanzo *et al.*, *Breast Cancer Res. Treat.*, 16:182(151), 1990.
 Allred *et al.*, *Arch. Surg.*, 125(1):107-113, 1990.
 Andersen *et al.*, *Brain*, 119:1153-1172, 1996.
 Ausubel *et al.*, en: "Current Protocols in Molecular Biology", John, Wiley & Sons, Inc, Nueva York, 1989.
 60 Barany, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 88:189-193, 1991.
 Barrett *et al.*, *Bioinformatics*, 21:263-265, 2005.
 Bellus, *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.*, A31(1): 1355-1376, 1994.
 Benatar, *Neurobiol. Disease*, 26:1-13, 2007.
 Benatar, *Neuromusc. Disorders*, 17:671-672, 2007.
 65 Boissinot *et al.*, *EMBO J.*, 16:2171-2178, 1997.
 Brown *et al.*, *Immunol Ser*, 53:69-82, 1990.

- Capaldi *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 74(2):425-433, 1977.
 de Arruda *et al.*, *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 2(5):487-496, 2002.
 De Jager *et al.*, *Semin. Nucl. Med.*, 23(2):165-179, 1993.
 Deng *et al.*, *Science*, 261:1047-1051, 1993.
 5 Doolittle *et al.*, *Methods Mol. Biol.*, 109:215-237, 1999.
 EP 201.184
 EP 237.362
 EP 258.017
 EP 266.032
 10 EP 329.822
 EP 50.424
 EP 84.796
 Fogh *et al.*, *Neurogenet.*, 8:235-236, 2007.
 Patente francesa 2.650.840
 15 Froehler *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 14(13):5399-5407, 1986.
 Frohman, en: "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, N.Y., 1990.
 Solicitud de Gran Bretaña 2.202.328
 Green *et al.*, *J. Hered.*, 93:119-124, 2002.
 Gulbis y Galand, *Hum. Pathol.*, 24(12):1271-1285, 1993.
 20 Halushka *et al.*, *Nat. Genet.*, 22(3):239-247, 1999.
 Harlow y Lane, en: "Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory", 1988.
 Hayward *et al.*, *J. Med. Genet.*, 35:174, 1998.
 Heiman-Patterson *et al.*, *J. Neurolog. Sci.*, 236:1-7, 2005.
 Humphries *et al.*, en: "Molecular Diagnosis of Genetic Diseases", Elles (Ed.), 321-340, 1996.
 25 Inazuka *et al.*, *Genome Res*, 7(11):1094-1103, 1997.
 Innis *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 85(24):9436-9440, 1988.
 Johnson *et al.*, *Nat. Genet.*, 29(2):233-237, 2001.
 Jones, *Nature*, 199:280-282, 1963.
 Jonsson *et al.*, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 65:1126-1136, 2006.
 30 Karlsson *et al.*, *Nat. Genet.*, 39:1321-1328, 2007.
 Ke y Cardon, *Bioinformatics*, 19(2):287-288, 2003.
 Komher, *et al.*, *Nucl. Acids. Res.* 17:7779-7784, 1989.
 Kuppaswamy *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 88:1143-1147, 1991.
 Kwok *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 86:1173, 1989.
 35 Kwok y Chen, *Curr Issues Mol. Biol.*, abril; 5(2):43-60, 2003.
 Kwok *et al.*, *Genomics*, 23(1):138-144, 1994.
 Kwok *et al.*, *Genomics*, 31(1):123-6, 1996.
 Kwok, *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2:235-258, 2001.
 Landegren *et al.*, *Science* 241:1077-1080, 1988.
 40 Lindberg *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 102:9754-9759, 2005.
 Lu *et al.*, *Biopolymers*, 73:606-613, 2004.
 Marucci *et al.*, *Neuromuscul. Disord.*, 17:673-676, 2007.
 Maxam *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 74:560, 1977.
 Meyers *et al.*, *Science*, 230:1242, 1985.
 45 Modrich, *Ann. Rev. Genet.*, 25:229-253, 1991.
 Mullis *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263-273, 1986.
 Nakamura *et al.*, en: "Handbook of Experimental Immunology" (IV Ed.), Weir *et al.*, (eds). 1:27, Blackwell
 Scientific Publ., Oxford, 1987.
 Nickerson *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 87:8923-8927, 1990.
 50 Nyren *et al.*, 1993).
 Nyren *et al.*, *Anal. Biochem.* 208:171-175, 1993.
 Ohara *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 86:5673-5677, 1989.
 Orrell *et al.*, *N. Eng. J. Med.*, 357:822-823, 2007.
 Solicitud PCT PCT/US87/00880
 55 Solicitud PCT PCT/US89/01025
 Solicitud PCT WO 88/10315
 Solicitud PCT WO 89/06700
 Solicitud PCT WO 89/06700
 Solicitud PCT WO 90/01069
 60 Solicitud PCT WO 91/02087
 Solicitud PCT WO 92/15712
 Solicitud PCT WO 93/22456
 Solicitud PCT WO 95/11995
 Prezant *et al.*, *Hum. Mutat.*, 1:159-164, 1992.
 65 Purcell *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, 81:559-575, 2007.
 Ruano *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 19:6877-6882, 1991.

Ruano *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 17:8392, 1989.
 Sambrook *et al.*, en: "Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press", Cold Spring Harbor, NY, 2001.
 Sandelin, *et al. J. Biol. Chem.*, 282:21230-21236, 2007.
 Sanger *et al.*, *J. Molec. Biol.*, 94:441, 1975.
 5 Shaw *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, 32, 78-85, 2007.
 Sheffield *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 86:232-236, 1989.
 Sokolov, *Nucl. Acids Res.* 18:3671, 1990.
 Stevens *et al.*, *Biotechniques*, 34:198-203, 2003.
 Syvanen *et al.*, *Genomics* 8:684-692, 1990.
 10 Taillon-Miller *et al.*, *Genome Res*, 8(7):748-754, 1998.
 Tainer *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 160:181-217, 1982.
 Turki *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 95:1635-1641, 1995.
 Ugozzoll *et al.*, *GATA* 9:107-112, 1992.
 Valentine *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.*, 74:563-593, 2005.
 15 Walker *et al.*, *Am. J. Vet. Res.* 40:1433-1439, 1979.
 Walker *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 89:392-396, 1992.
 Wartell *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 18:2699-2706, 1990.
 Winter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.*, 82:7575, 1985.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> COATES, JOAN R. LINBLAD-TOH, KERSTIN WADE, CLAIRE JOHNSON, GARY S.
 <120> PREDICCIÓN Y DIAGNÓSTICO DE LA MIELOPATÍA DEGENERATIVA CANINA
 25 <130> UVMO:047WO
 <140> DESCONOCIDO
 <141> 04-02-2009
 30 <150> 61/025.949
 <151> 04-02-2008
 <160> 30
 35 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 94
 40 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 45 <400> 1
 ggaagtgggc ctgttgtggt atcaggaacc attacagggc tgactaaagg cgagcatgga 60
 ttccacgtcc atcagtttgg agataataca caag 94
 50 <210> 2
 <211> 94
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 2
 ggaagtgggc ctgttgtggt atcaggaacc attacagggc tgactaaagg cgagcatgga 60
 60 ttccacgtcc atcagtttgg agataataca caag 94

ES 2 529 465 T3

<210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Cebador sintético
 <400> 3
 10 agtgggcctg ttgtgtatc a 21
 <210> 4
 <211> 23
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 20 <400> 4
 ctccaaactg atggacgtgg aat 23
 <210> 5
 <211> 16
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador sintético
 30 <400> 5
 aatccatgct cgcctt 16
 <210> 6
 <211> 462
 <212> ADN
 <213> *Canis familiaris*
 35
 <400> 6
 40
 atggagatga aggccgtgtg cgtggtgaag ggccagggcc cgggtggaggg caccatccac 60
 ttctgtcaga agggaagtgg gcctgtgtgtg gtatcaggaa ccattacagg gctgactgaa 120
 ggcgagcatg gattccacgt ccatcagttt ggagataata cacaaggctg tactagtgca 180
 ggtcctcact ttaatcctct gtccaaaaaa catggtgggc caaaagatca agagaggcat 240
 gttggagacc tgggcaatgt gactgctggc aaggatggcg tggccattgt gtccatagaa 300
 gattctctga ttgcactctc aggagactat tccatcattg gccgcaccat ggtggtccac 360
 gagaaacgag atgacttggg caaaggtgac aatgaagaaa gtacacagac aggaaacgcc 420
 gggagtcggt tggcttgtgg tgtcattggg atcgccaagt aa 462
 <210> 7
 <211> 462
 <212> ADN
 <213> *Canis familiaris*
 45
 <400> 7

ES 2 529 465 T3

```
atggagatga aggccgtgtg cgtggtgaag ggccagggcc cggaggagg caccatccac      60
ttcgtgcaga agggaaagtgg gctgtgtgtg gtatcaggaa ccattacagg gctgactgaa      120
ggcgagcatg gattccacgt ccatcagttt ggagataata cacaaggctg tactagtgca      180
ggtcctcact ttaatcctct gtccaaaaaa catggtgggc caaaagatca agagaggcat      240
gttgagagacc tgggcaatgt gactgctggc aaggatggcg tggccattgt gtccatagaa      300
gattctctga ttgactctc aggagactat tccatcattg gccgcaccat ggtggtccac      360
gagaaacgag atgacttggg caaaggtgac aatgaagaaa gtacacagac aggaaacgcc      420
gggagtcggt tggcttgtgg tgtcattggg atcgccaagt aa                          462
```

<210> 8

<211> 153

<212> PRT

<213> *Canis familiaris*

<400> 8

5

ES 2 529 465 T3

Met Glu Met Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly Gln Gly Pro Val Glu
 1 5 10 15

Gly Thr Ile His Phe Val Gln Lys Gly Ser Gly Pro Val Val Val Ser
 20 25 30

Gly Thr Ile Thr Gly Leu Thr Glu Gly Glu His Gly Phe His Val His
 35 40 45

Gln Phe Gly Asp Asn Thr Gln Gly Cys Thr Ser Ala Gly Pro His Phe
 50 55 60

Asn Pro Leu Ser Lys Lys His Gly Gly Pro Lys Asp Gln Glu Arg His
 65 70 75 80

Val Gly Asp Leu Gly Asn Val Thr Ala Gly Lys Asp Gly Val Ala Ile
 85 90 95

Val Ser Ile Glu Asp Ser Leu Ile Ala Leu Ser Gly Asp Tyr Ser Ile
 100 105 110

Ile Gly Arg Thr Met Val Val His Glu Lys Arg Asp Asp Leu Gly Lys
 115 120 125

Gly Asp Asn Glu Glu Ser Thr Gln Thr Gly Asn Ala Gly Ser Arg Leu
 130 135 140

Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile Ala Lys
 145 150

- <210> 9
- <211> 153
- <212> PRT
- <213> *Canis familiaris*
- <400> 9

5

ES 2 529 465 T3

Met Glu Met Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly Gln Gly Pro Val Glu
1 5 10 15

Gly Thr Ile His Phe Val Gln Lys Gly Ser Gly Pro Val Val Val Ser
20 25 30

Gly Thr Ile Thr Gly Leu Thr Lys Gly Glu His Gly Phe His Val His
35 40 45

Gln Phe Gly Asp Asn Thr Gln Gly Cys Thr Ser Ala Gly Pro His Phe
50 55 60

Asn Pro Leu Ser Lys Lys His Gly Gly Pro Lys Asp Gln Glu Arg His
65 70 75 80

Val Gly Asp Leu Gly Asn Val Thr Ala Gly Lys Asp Gly Val Ala Ile
85 90 95

Val Ser Ile Glu Asp Ser Leu Ile Ala Leu Ser Gly Asp Tyr Ser Ile
100 105 110

Ile Gly Arg Thr Met Val Val His Glu Lys Arg Asp Asp Leu Gly Lys
115 120 125

Gly Asp Asn Glu Glu Ser Thr Gln Thr Gly Asn Ala Gly Ser Arg Leu
130 135 140

Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile Ala Lys
145 150

<210> 10
<211> 41
<212> PRT
<213> *Canis familiaris*

5

<400> 10

Phe Val Gln Lys Gly Ser Gly Pro Val Val Val Ser Gly Thr Ile Thr
1 5 10 15

Gly Leu Thr Glu Gly Glu His Gly Phe His Val His Gln Phe Gly Asp
20 25 30

Asn Thr Gln Gly Cys Thr Ser Ala Gly
35 40

10

<210> 11
<211> 42
<212> PRT

ES 2 529 465 T3

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 11

Phe Glu Gln Lys Ala Ser Gly Glu Pro Val Val Val Ser Gly Gln Ile
1 5 10 15

Thr Gly Leu Thr Glu Gly Glu His Gly Phe His Val His Gln Tyr Gly
20 25 30

Asp Asn Thr Gln Gly Cys Thr Thr Ala Gly
35 40

5

<210> 12

<211> 42

<212> PRT

<213> *Cavia porcellus*

10

<400> 12

Phe Glu Gln Lys Ala Ser Gly Glu Pro Val Val Val Ser Gly Gln Ile
1 5 10 15

Thr Gly Leu Thr Glu Gly Glu His Gly Phe His Val His Gln Tyr Gly
20 25 30

Asp Asn Thr Gln Gly Cys Thr Thr Ala Gly
35 40

15

<210> 13

<211> 42

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

20

<400> 13

Phe Glu Gln Lys Ala Ser Gly Glu Pro Val Val Leu Ser Gly Gln Ile
1 5 10 15

Thr Gly Leu Thr Glu Gly Gln His Gly Phe His Val His Gln Tyr Gly
20 25 30

Asp Asn Thr Gln Gly Cys Thr Ser Ala Gly
35 40

25

<210> 14

<211> 41

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

30

<400> 14

ES 2 529 465 T3

Phe Glu Gln Lys Gly Thr Gly Pro Val Val Val Lys Gly Arg Ile Thr
 1 5 10 15

Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Glu Phe His Val His Gln Phe Gly Asp
 20 25 30

Asn Arg Gln Gly Cys Thr Ser Ala Gly
 35 40

<210> 15

<211> 42

<212> PRT

<213> *Macaca mulatta*

<400> 15

Phe Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val Trp Gly Ser Ile
 1 5 10 15

Thr Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe His Val His Gln Phe Gly
 20 25 30

Asp Asn Thr Gln Gly Cys Thr Ser Ala Gly
 35 40

<210> 16

<211> 42

<212> PRT

<213> *Gorilla gorilla*

<400> 16

Phe Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val Tyr Gly Arg Ile
 1 5 10 15

Thr Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe His Val His Gln Phe Gly
 20 25 30

Asp Asn Thr Gln Gly Cys Thr Ser Ala Gly
 35 40

<210> 17

<211> 42

<212> PRT

<213> *Cervus elaphus*

<400> 17

Ile Arg Phe Glu Ala Lys Gly Asn Thr Val Val Val Thr Gly Ser Ile

ES 2 529 465 T3

1 5 10 15

Thr Gly Leu Thr Glu Gly Asp His Gly Phe His Val His Gln Phe Gly
20 25 30

Asp Asn Thr Gln Gly Cys Thr Ser Ala Gly
35 40

5
<210> 18
<211> 42
<212> PRT
<213> *Bos taurus*

<400> 18

Ile His Phe Glu Ala Lys Gly Asn Thr Val Val Val Thr Gly Ser Ile
1 5 10 15

Thr Gly Leu Thr Glu Gly Asp His Gly Phe His Val His Gln Phe Gly
20 25 30

10
Asp Asn Thr Gln Gly Cys Thr Ser Ala Gly
35 40

15
<210> 19
<211> 42
<212> PRT
<213> *Ovis aries*

<400> 19

Ile Arg Phe Glu Ala Lys Gly Asp Lys Val Val Val Thr Gly Ser Ile
1 5 10 15

Thr Gly Leu Thr Glu Gly Asp His Gly Phe His Val His Gln Phe Gly
20 25 30

20
Asp Asn Thr Gln Gly Cys Thr Ser Ala Gly
35 40

25
<210> 20
<211> 42
<212> PRT
<213> *Macaca fascicularis*

<400> 20

Phe Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val Trp Gly Ser Ile
1 5 10 15

Thr Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Tyr His Val His Gln Phe Gly

ES 2 529 465 T3

20 25 30

Asp Asn Thr Gln Gly Cys Thr Ser Ala Gly
35 40

5
<210> 21
<211> 42
<212> PRT
<213> *Bos grunniens*

<400> 21

Ile His Phe Glu Ala Lys Gly Asp Thr Val Val Val Thr Gly Ser Ile
1 5 10 15

Thr Gly Leu Thr Glu Gly Asp His Gly Phe His Val His Gln Phe Gly
20 25 30

10
Asp Asn Thr Gln Gly Cys Thr Ser Ala Gly
35 40

15
<210> 22
<211> 42
<212> PRT
<213> *Capra hircus*

<400> 22

Ile His Phe Glu Ala Lys Gly Asp Lys Val Val Val Thr Gly Ser Ile
1 5 10 15

Thr Gly Leu Thr Glu Gly Asp His Gly Phe His Val His Gln Phe Gly
20 25 30

20
Asp Asn Thr Gln Gly Cys Thr Ser Ala Gly
35 40

25
<210> 23
<211> 42
<212> PRT
<213> *Sus scrofa*

<400> 23

Tyr Phe Glu Leu Lys Gly Glu Lys Thr Val Leu Val Thr Gly Thr Ile
1 5 10 15

Lys Gly Leu Ala Glu Gly Asp His Gly Phe His Val His Gln Phe Gly
20 25 30

Asp Asn Thr Gln Gly Cys Thr Ser Ala Gly
35 40

ES 2 529 465 T3

<210> 24
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> *Callithrix jacchus*
 5
 <400> 24
 Phe Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val Trp Gly Ser Ile
 1 5 10 15
 Thr Gly Leu Ala Glu Gly Leu His Gly Phe His Val His Gln Phe Gly
 20 25 30
 Asp Asn Thr Gln Gly Cys Thr Ser Ala Gly
 35 40
 10
 <210> 25
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> *Cebus apella*
 15
 <400> 25
 Phe Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val Trp Gly Ser Ile
 1 5 10 15
 Thr Gly Leu Ala Glu Gly Leu His Gly Phe His Val His Gln Phe Gly
 20 25 30
 Asp Asn Thr Gln Gly Cys Thr Ser Ala Gly
 35 40
 20
 <210> 26
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> *Monodelphis domestica*
 25
 <400> 26
 Phe Glu Gln Lys Gln Val Gly Glu Pro Val Glu Leu Ser Gly Ser Ile
 1 5 10 15
 Lys Gly Leu Ala Glu Gly Asp His Gly Phe His Val His Glu Phe Gly
 20 25 30
 Asp Asn Thr Gln Gly Cys Thr Ser Ala Gly
 35 40
 30
 <210> 27
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 27

ES 2 529 465 T3

Phe Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val Trp Gly Ser Ile
 1 5 10 15

Lys Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe His Val His Glu Phe Gly
 20 25 30

Asp Asn Thr Ala Gly Cys Thr Ser Ala Gly
 35 40

5
 <210> 28
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> *Pongo pygmaeus*

<400> 28

Phe Glu Gln Lys Glu Arg Asn Gly Pro Val Lys Val Trp Gly Ser Ile
 1 5 10 15

Glu Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe His Val His Glu Phe Gly
 20 25 30

Asp Asn Thr Val Gly Cys Thr Ser Ala Gly
 35 40

10
 15
 <210> 29
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> *Equus caballus*

<400> 29

Phe Glu Gln Gln Gln Glu Gly Gly Pro Val Val Leu Lys Gly Phe Ile
 1 5 10 15

Glu Gly Leu Thr Lys Gly Asp His Gly Phe His Val His Glu Phe Gly
 20 25 30

Asp Asn Thr Gln Gly Cys Thr Thr Ala Gly
 35 40

20
 25
 <210> 30
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> *Canis familiaris*

<400> 30

ES 2 529 465 T3

Phe Val Gln Lys Gly Ser Gly Pro Val Val Val Ser Gly Thr Ile Thr
1 5 10 15

Gly Leu Thr Lys Gly Glu His Gly Phe His Val His Gln Phe Gly Asp
20 25 30

Asn Thr Gln Gly Cys Thr Ser Ala Gly
35 40

REIVINDICACIONES

1. Un método de identificación de si un perro tiene o se encuentra en riesgo de desarrollar mielopatía degenerativa, o de tener crías que tengan o se encuentren en riesgo de desarrollar mielopatía degenerativa, que comprende:

- 5
- (a) proporcionar una muestra que contenga ácido nucleico de dicho perro;
 - (b) evaluar la estructura de un gen SOD1 o la transcripción correspondiente al resto de aminoácido 40 del correspondiente polipéptido SOD1 en dicha muestra que contiene ácido nucleico de dicho perro; y
 - (c) identificar si dicho perro (i) tiene o se encuentra en riesgo de desarrollar mielopatía degenerativa cuando se observa un polimorfismo en la región de codificación de SOD1 correspondiente a una sustitución homocigótica de E→K en el resto de aminoácido 40 del correspondiente polipéptido SOD1, en comparación con una transcripción o un gen SOD1 de tipo silvestre de referencia; o (iii) produce descendencia que tiene o se encuentra en riesgo de desarrollar mielopatía degenerativa cuando se observa un polimorfismo en la región de codificación de SOD1 correspondiente a una sustitución heterocigótica de E→K en el resto de aminoácido 40 del correspondiente polipéptido SOD1, en comparación con una transcripción o un gen SOD1 de tipo silvestre de referencia.
- 10
- 15

2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho perro es un bóxer, un corgi galés, un retriever de Chesapeake, un Ridgeback de Rodesia, un pastor alemán, un Kerry Blue Terrier, un setter irlandés, un antiguo pastor inglés, un collie, un caniche estándar, un Fox terrier de pelo duro otra raza, o un híbrido de los mismos.

20

3. El método de la reivindicación 1, en el que la etapa (b) comprende pirosecuenciación, secuenciación de terminación de cadena, digestión de restricción, reacción de la polimerasa específica de alelo, análisis del polimorfismo en la configuración de una sola cadena, análisis genéticos, electroforesis en gel de gradiente de temperatura, reacción en cadena de la ligasa, perfiles de la curva de fusión, ensayo de discriminación alélica TaqMan® o hibridación de micromatrices.

25

4. El método de la reivindicación 1, en el que la muestra que contiene ácido nucleico comprende sangre, tejido bucal, piel, semen o folículos pilosos de dicho perro.

30

5. El método de la reivindicación 1, en el que dicho gen SOD1 de tipo silvestre de referencia comprende SEC ID N° 1.

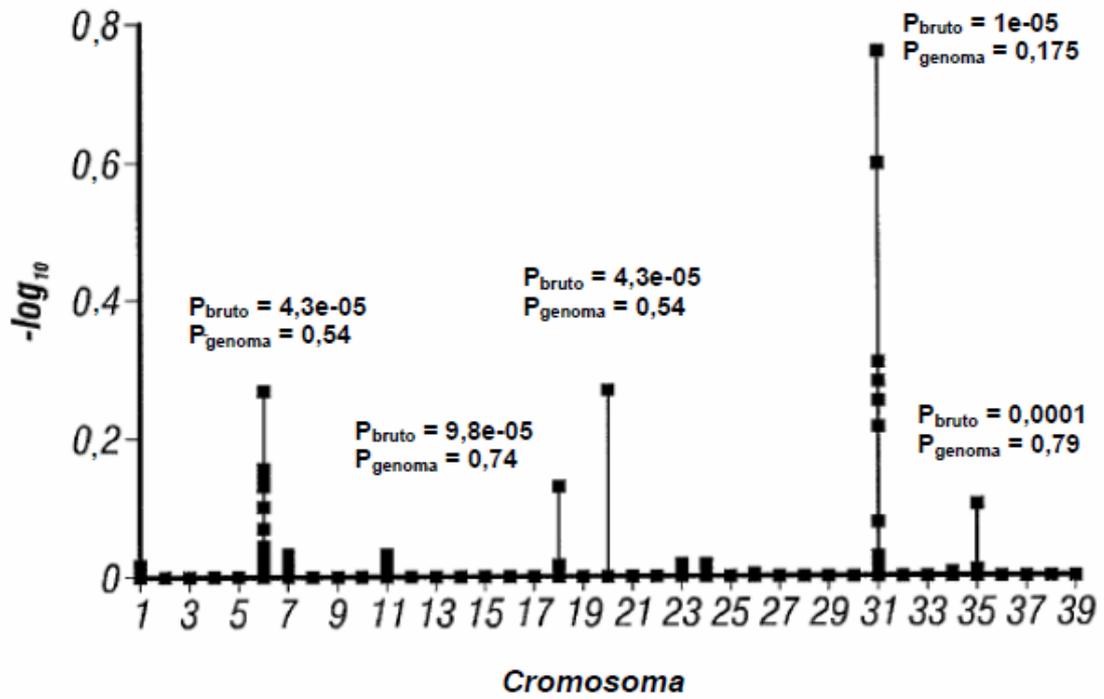


FIG. 1A

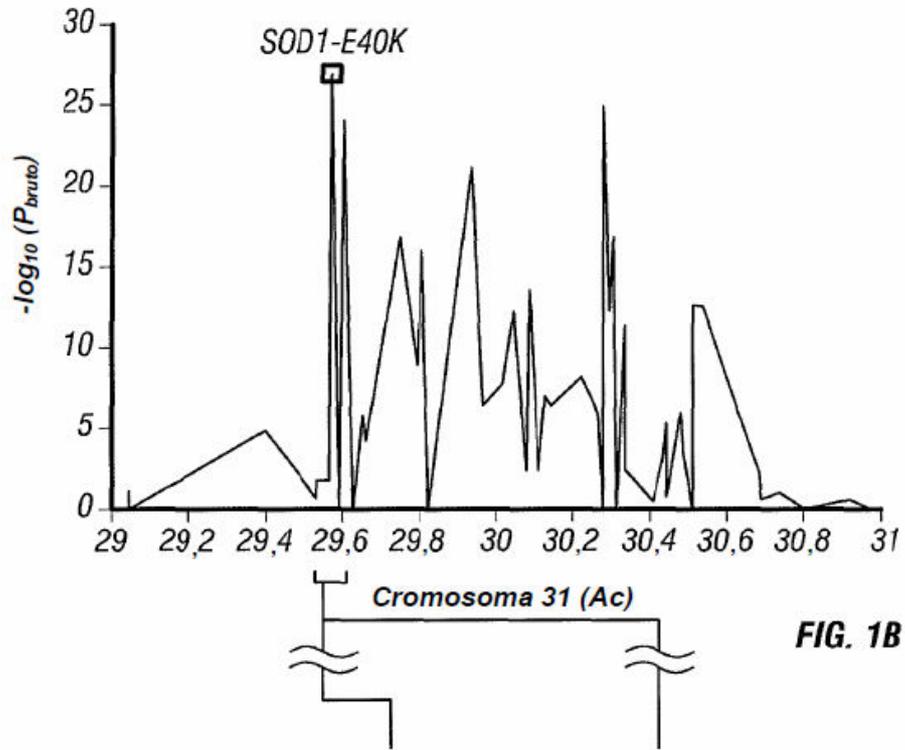


FIG. 1B

CASOS	SOD-1 mut. (%)			SOD-1 haplotipo (%)		
	N	A	G	GTTAC	ACCGT	
<i>Corgi galés de Pembroke</i>	35	100	0	100	0	0
<i>Bóxer</i>	8	100	0	100	0	0
<i>Ridgeback de Rodesia</i>	6	100	0	100	0	0
<i>Retriever de Chesapeake</i>	9	100	0	100	0	0
<i>Pastor alemán</i>	4	100	0	100	0	0

CASOS						
<i>Corgi galés de Pembroke</i>	17	74	26	88	12	0
<i>Bóxer</i>	15	67	33	100	0	0
<i>Ridgeback de Rodesia</i>	10	15	85	95	0	5
<i>Retriever de Chesapeake</i>	48	39	61	71	23	6
<i>Pastor alemán</i>	53	25	75	98	2	0

FIG. 1C

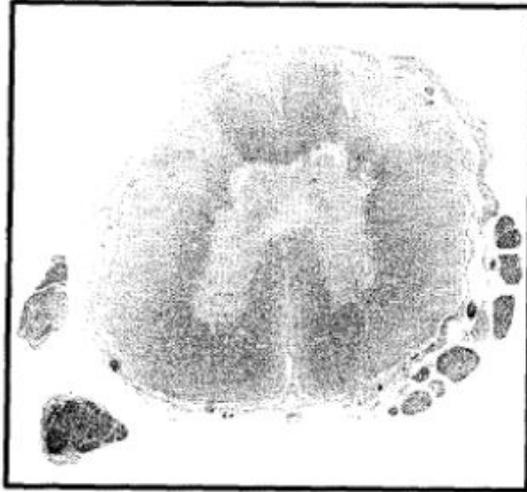


FIG. 2A

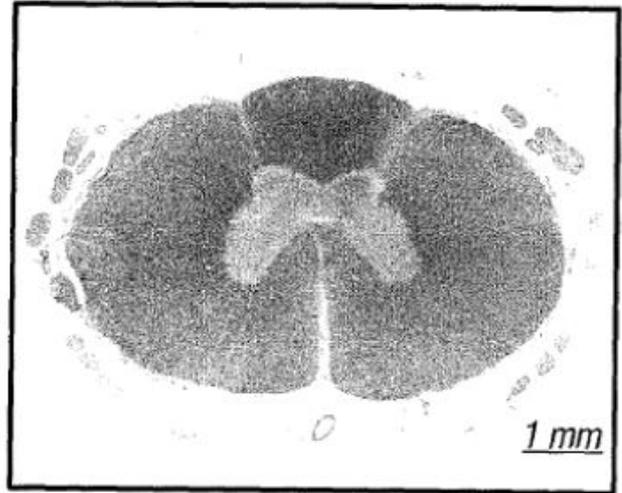


FIG. 2B

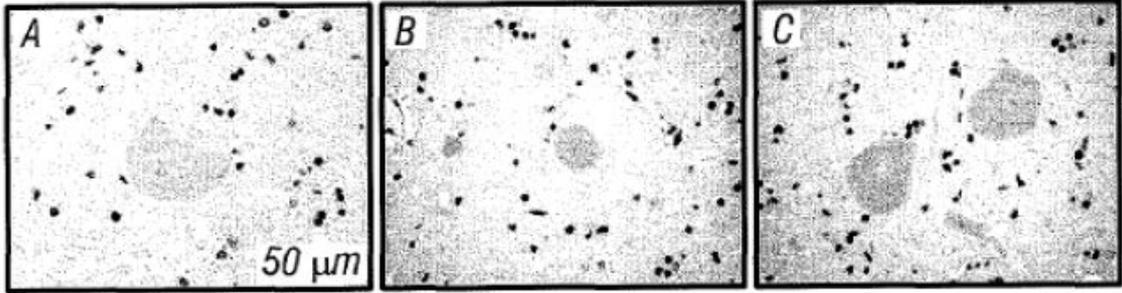


FIG. 3A

FIG. 3B

FIG. 3C

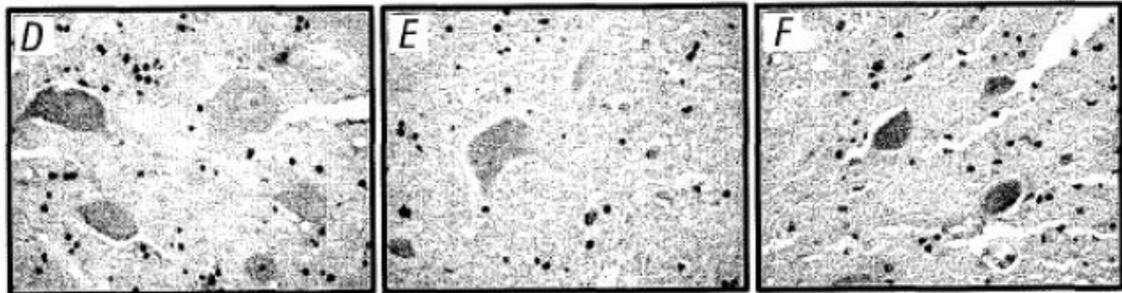


FIG. 3D

FIG. 3E

FIG. 3F

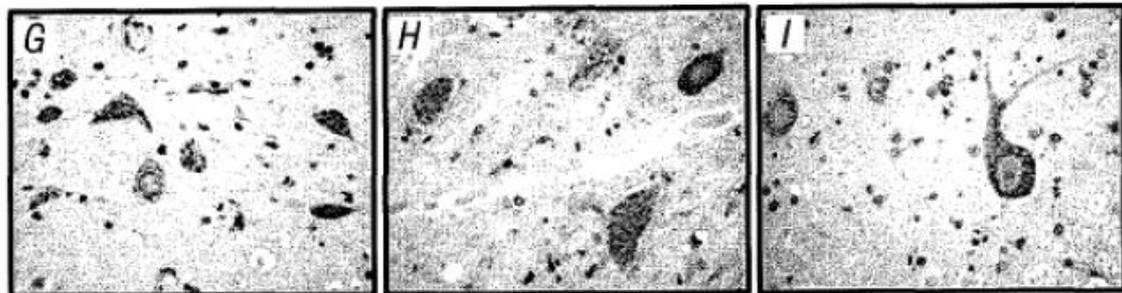


FIG. 3G

FIG. 3H

FIG. 3I

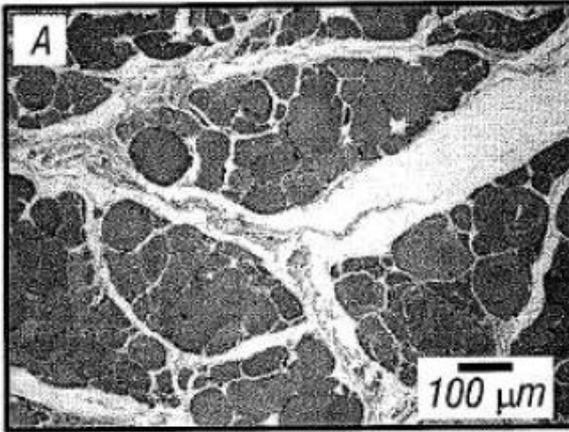


FIG. 4A

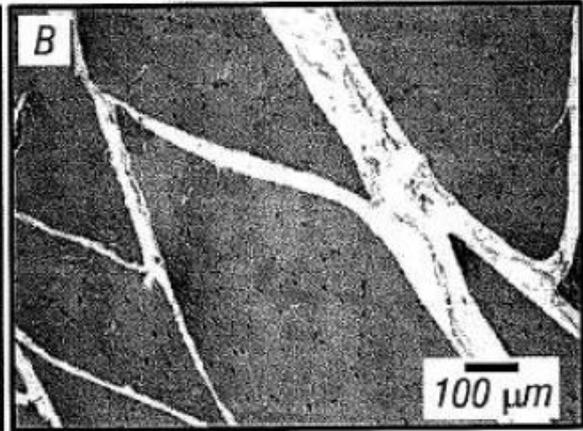


FIG. 4B

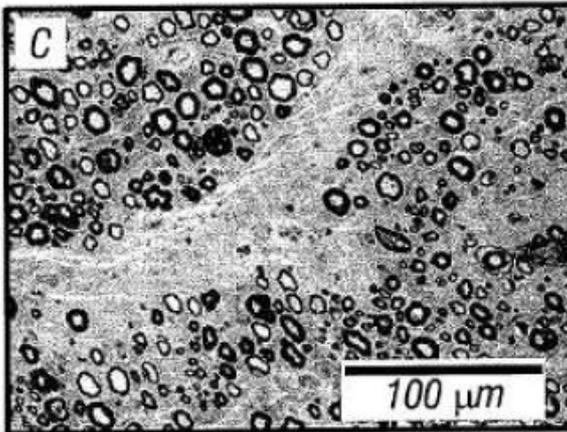


FIG. 4C

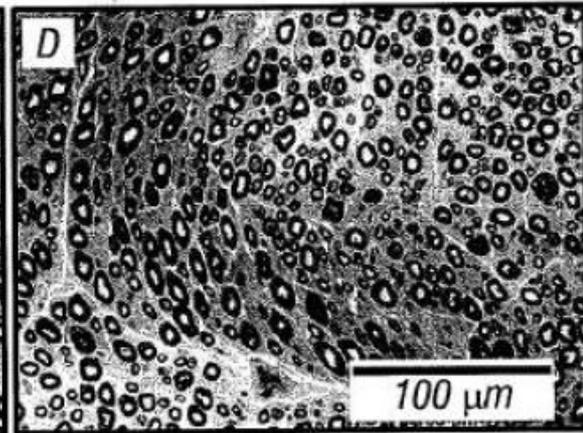


FIG. 4D

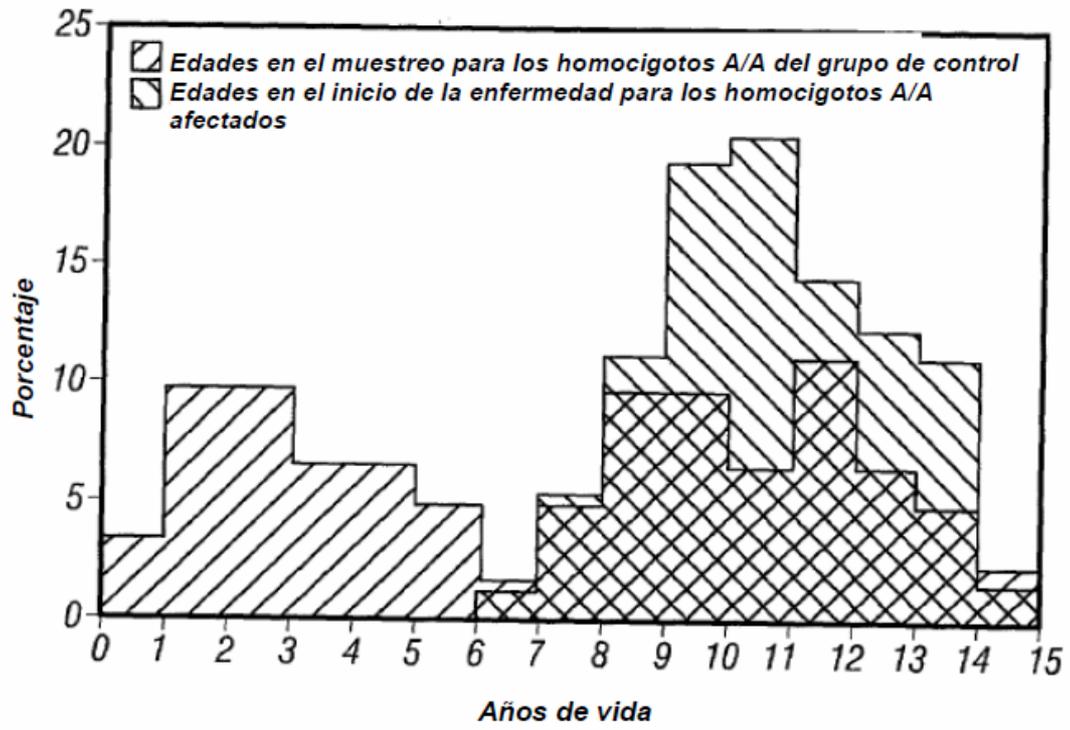


FIG. 5