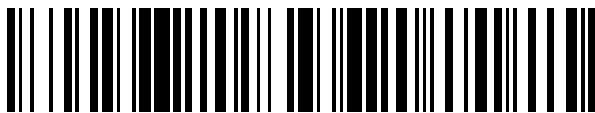


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 566 982**

(21) Número de solicitud: 201500899

(51) Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

(12)

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación:

16.12.2015

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

18.04.2016

(71) Solicitantes:

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID (100.0%)**  
**Sección de Contratos y Patentes, OTRI-UCM,**  
**C/Donoso Cortés, 65**  
**28015 Madrid ES**

(72) Inventor/es:

**DUNNER BOXBERGER, Helene Susana;**  
**CAÑÓN FERRERAS, Javier y**  
**SEVANE FERNÁNDEZ, Natalia**

(54) Título: **Método para detectar individuos de la especie equina portadores de la causa genética responsable de las capas perlino o isabelo**

(57) Resumen:

Método para detectar individuos de la especie equina portadores de la causa genética responsable de las capas perlino o isabelo.

La presente invención se refiere a un método in vitro para detectar a los individuos de la especie equina portadores del alelo Pearl (C<sup>r1</sup>) para la selección de la coloración de la capa en caballo de acuerdo a las demandas del mercado, preferencias personales o los requisitos para la inclusión en el libro genealógico de las distintas razas, así como para verificar la segregación de este alelo en pedigríes particulares. Dicho método comprende la detección de una mutación puntual identificada en el gen MATP (membrane-associated transporter protein), la sustitución no sinónima de Águila G por una A en la posición c.100G>A en el exón 4 del gen MATP, lo cual da lugar al cambio del aminoácido alanina por treonina en la posición 329 de la proteína MATP del individuo.

## DESCRIPCIÓN

Método para detectar individuos de la especie equina portadores de la causa genética responsable de las capas perlino o isabelo.

5

### **Sector de la técnica**

La presente invención pertenece al sector de la genética animal y más concretamente a la aplicación de técnicas diagnósticas de biología molecular para la identificación y la 10 selección de patrones específicos de coloración de la capa en caballo.

### **Antecedentes de la invención**

Las preferencias humanas sobre las distintas coloraciones de la capa de los animales 15 han jugado un papel fundamental en el desarrollo de la gran variedad de patrones de coloración de la capa que exhiben las especies domésticas, como es el caso del caballo, favoreciendo alelos raros mediante la cría selectiva. La mayoría de los colores de capa y piel siguen modelos de herencia mendeliana relativamente simples, con unos pocos genes implicados en fenotipos particulares actuando sobre la síntesis de pigmentos o sobre la función de los melanocitos, las células que producen los pigmentos (Sponenberg, D.P. (2009) *Equine Color Genetics*, 3rd edn. *Iowa State University Press*. Ames, IA). En caballos se han descrito cuatro loci como responsables de la dilución de las coloraciones básicas de la capa (revisado en Rieder, S. (2009) *Molecular tests for coat colours in horses. Journal of Animal Breeding and Genetics* 126, 415-24): Dun o pardo (D), Silver Dapple o moteado plateado (Z), Champagne o champán (CH) y Cream o crema (C). Tanto los loci pardo como moteado plateado producen un patrón de dilución 20 de la capa fácilmente distinguible de los fenotipos champán o crema. Los loci champán y crema pueden dar lugar a fenotipos diluidos afectando tanto a la feomelanina como a la eumelanina, los dos tipos de melanina más abundantes. La coloración de la capa producida por el alelo  $CH^{CH}$  puede ser difícil de distinguir del efecto producido por la dilución del locus crema. Las principales diferencias son: i) el heterocigoto  $CH^{CH}$  diluye tanto la feomelanina como la eumelanina; ii) los efectos del homocigoto  $CH^{CH}$  y del heterocigoto  $CH^{CH}$  son difíciles de distinguir fenotípicamente; y iii) el fenotipo champán 25 normalmente presenta un brillo metálico. El alelo  $C^{Cr}$  del locus C actúa de forma codominante, diluyendo una capa alazana a palomina y una capa castaña a baya en heterocigosis, pero con efecto fenotípico escaso sobre el pigmento negro (dando en ocasiones la capa negro cenizo). El homocigoto  $C^{Cr}$  diluye todos los colores básicos a los fenotipos cremello, perla o crema cenizo, caracterizados por piel rosada, capas de color crema que pueden parecer casi blancas y ojos azul claro. Mariat *et al.* (2003) (Mariat, D., Taourit, S. & Guérin, G. (2003) A mutation in the MATP gene causes the cream coat colour in the horse. *Genetics Selection and Evolution* 35, 119-33) localizaron una sustitución de una sola base en el exón 2 del gen *membrane-associated transponer protein (MATP)*, también conocido como *solute carrier family 45, member 2 (SLC45A2)*, totalmente asociada con los fenotipos que segregaban con el alelo  $C^{Cr}$ . 30 35 40 45

Aparte de esas variaciones, se ha descrito otro patrón de dilución de la capa en el caballo, el *pearl*. Hasta la fecha, esta capa parece segregar solamente en las razas ibéricas Pura Raza Española (P.R.E.) y Lusitano, y también ha sido descrita en razas de origen ibérico como el Quarter Horse, donde se denomina "Barlink Factor", o en caballos Paint. Este fenotipo segregaba de forma autosómica recesiva y se parecía a algunos de los patrones de capa producidos por el alelo champán  $CH^{CH}$  y el crema  $C^{Cr}$ , siendo a veces

5 difícil distinguir entre ellos. Los animales portadores de dos copias del alelo *pearl* exhiben una dilución de la eumelanina y la feomelanina similar a la que produce el alelo champagne CH<sup>CH</sup> y el genotipo heterocigoto del alelo C<sup>Cr</sup> del crema. El efecto del alelo pearl en heterocigosis no se puede apreciar a menos que se combine con el alelo C<sup>Cr</sup> del crema, produciendo un fenotipo pseudo-doble-diluido difícil de distinguir del homocigoto C<sup>Cr</sup>C<sup>Cr</sup>. Sin embargo, el mecanismo genético causante de los fenotipos perlino e isabelo todavía no se conoce.

### 10 Explicación de la invención

10 Método para detectar individuos de la especie equina portadores de la causa genética responsable de las capas perlino o isabelo.

15 La presente invención se refiere a un método *in vitro* para detectar un individuo de la especie equina con capa perlino o isabelo o un individuo de la especie equina portador del alelo causante de las capas perlino e isabelo pero que no muestra dichos fenotipos. Para ello, el método se sirve de una mutación puntual identificada en el gen MATP (*membrane-associated transponer protein*) que conlleva una modificación en la proteína MATP del individuo. Se trata de la mutación c.100>A localizada en el exón 4, caracterizado por SEQ ID N°: 17, y que implica el cambio en la secuencia aminoacídica, caracterizada por SEQ ID N°: 18, localizado en p.Ala329Thr en la proteína MATP, caracterizada por SEQ ID N°: 19.

20 Además, se han detectado otras dos mutaciones puntuales asociadas al fenotipo Pearl y localizadas en el gen MATP: una es la mutación c.48T>C en el intrón 1 del gen, caracterizado por SEQ ID N°: 15 y la otra es la mutación c.266C>T en el exón 3 del gen MATP, caracterizado por SEQ ID N°: 16, que da lugar a un cambio en la secuencia aminoacídica, localizado en p.Asp153Asn en la proteína MATP, caracterizada por SEQ ID N°: 19, es decir, da lugar a la sustitución del aminoácido polar ácido aspártico por el aminoácido polar neutral asparagina.

25 Por lo tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* para detectar un individuo de la especie equina con capa perlino o isabelo (C<sup>pri</sup>) o portador del alelo causante de las capas perlino e isabelo, tanto si muestra como si no muestra dichos fenotipos, el cual comprende detectar la mutación c.100G>A del exón 4 del gen *MATP* y/o el cambio de aminoácido p.Ala329Thr en la proteína MATP del individuo. El método, además, puede incluir la detección de cualquiera de las mutaciones puntuales que se encuentran en desequilibrio de ligamiento con la mutación c.100G>A del exón 4, especialmente la mutación c.48T>C en el intrón 1, caracterizado por SEQ ID N°: 15, y la mutación c.266C>T en el exón 3 del gen MATP, caracterizado por SEQ ID N°: 16. Otras mutaciones puntuales en desequilibrio de ligamiento con la mutación c.100G>A del exón 4 pueden ser las descritas anteriormente, como la mutación A>C que da lugar al cambio p.His11Pro, la mutación T>A localizada en p.Ile249Ile, o la mutación A>C que da lugar al cambio Lys291Thr, y que se han reflejado en SEQ ID N°: 19 y señalado con texto libre en dicha secuencia.

30 Este método de detección se realiza sobre muestras aisladas de ácidos nucleicos extraídos a partir de una muestra biológica del individuo, macho o hembra, de la especie equina y, especialmente, del grupo formado por las razas: Pura Raza Española (P.R.E.), Lusitano, Quarter Horse, Paint o cualquier otra población o raza que presente un fenotipo de dilución de la coloración de la capa.

Por otro lado, las muestras biológicas pueden proceder de cualquier tipo de tejido o células, por ejemplo: sangre, folículos pilosos, frotis bucal.

- 5 La detección de la mutación c.100G>A del exón 4 del gen *MATP* se puede realizar mediante cualquiera de las técnicas conocidas en el estado de la técnica. Entre ellas, se pueden citar: la técnica de análisis del polimorfismo en la conformación de las cadenas simples (ADN monocatenario - ADNmC) de ADN de regiones amplificadas por PCR (PCR-SSCP, *PCR Single Strand Conformational Polymorphism*), la técnica del análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP, *PCR Restriction Fragment Length Polymorphism*), la secuenciación directa, la pirosecuenciación, la reacción de ligado por oligonucleótidos (OLA), la técnica de *high resolution melting* (HRM), el ensayo de discriminación alélica por TaqMan, la hibridación en microarray, o la extensión del cebador o *primer extension* (PE).
- 10 15 Otro aspecto de la invención se refiere a una molécula de ADN aislada que comprende la secuencia nucleotídica caracterizada por SE ID N°: 17. La invención también se refiere a una molécula polipeptídica que comprende la secuencia aminoacídica caracterizada por SEQ ID N°: 18.
- 20 25 La identificación de los animales portadores del alelo causante de las capas perlino e isabelo ( $C^{prl}$ ) se puede utilizar para seleccionar patrones de coloración de la capa en caballo de acuerdo con las demandas del mercado, preferencias personales o los requisitos para la inclusión en el Libro Genealógico de las distintas razas equinas, así como para verificar la segregación de este alelo en pedigree particulares, proporcionando información acerca del posible cruce entre razas portadoras de dicho alelo y razas en las que está ausente, o sirviendo para la verificación del parentesco entre algunos individuos (por ejemplo, padres  $C^{prl}C^{prl}$  no pueden tener un descendiente portador del alelo  $C^{prl}$ ).
- 30 35 40 45 50 Otro aspecto de la invención, por lo tanto, se refiere a un método *in vitro* para la verificación del parentesco entre individuos de la especie equina que incluye detectar la mutación c.100G>A del exón 4 del gen *MATP*, caracterizado por SEQ ID N°: 17, y/o el cambio de aminoácido p.Ala329Thr en la proteína *MATP* de dos o más individuos. Este método, además, puede incluir la detección de cualquiera de las mutaciones puntuales que se encuentran en desequilibrio de ligamiento con la mutación c.100G>A del exón 4, especialmente la mutación c.48T>C en el intrón 1, caracterizado por SEQ ID N°: 15 y la mutación c.266C>T en el exón 3 del gen *MATP*, caracterizado por SEQ ID N°: 16. Otras mutaciones puntuales en desequilibrio de ligamiento con la mutación c.100G>A del exón 4 pueden ser las descritas anteriormente, como la mutación A>C que da lugar al cambio p.His11Pro, la mutación T>A localizada en p.Ile249Ile, o la mutación A>C que da lugar al cambio Lys291Thr, cambios que se han reflejado en SEQ ID N°: 19 y señalado con texto libre en dicha secuencia.
- 45 El método de verificación del parentesco se realiza sobre muestras aisladas de ácidos nucleicos extraídos a partir de una muestra biológica de los individuos, machos o hembras, de la especie equina y, especialmente, del grupo formado por las razas: Pura Raza Española (P.R.E.), Lusitano, Quarter Horse, Paint o cualquier otra población o raza que presente un fenotipo de dilución de la coloración de la capa.
- 50 Por otro lado, las muestras biológicas pueden proceder de cualquier tipo de tejido o células, por ejemplo: sangre, folículos pilosos, frotis bucal.

La detección de la mutación c.100G>A del exón 4 del gen *MATP* se puede realizar mediante cualquiera de las técnicas conocidas en el estado de la técnica. Entre ellas, se pueden citar: PCR-SSCP, PCR-RFLP, secuenciación directa, pirosecuenciación, reacción de ligado por oligonucleótidos (OLA), HRM, ensayo de discriminación alélica por TaqMan, hibridación en microarray, o extensión del cebador o *primer extension* (PE).

También es importante resaltar que la mutación que define el alelo de la capa *pearl* ( $C^{prl}$ ) es un cambio de una G por una A, y es prácticamente nula la probabilidad de que se haya producido por azar en dos individuos de la misma raza. Está descrito que la probabilidad de que una mutación ocurra por gen, generación y base es entre  $10^{-7}$  y  $10^{-9}$ , por lo tanto, la probabilidad de que haya habido un cambio de una G por una A en esa misma posición del gen es muy baja, y que haya ocurrido en dos animales diferentes es prácticamente imposible.

El desequilibrio de ligamiento es la propiedad de algunos genes de no segregar de forma independiente, es decir, poseen una frecuencia de recombinación menor del 50% esperado entre dos *loci* no sintéticos. La tendencia que tienen dos genes situados en el mismo cromosoma a segregar juntos se incrementa cuando los dos *loci* están muy próximos entre sí, ya que desciende la probabilidad de recombinación. De esta forma, la probabilidad de heredar en bloque los alelos provenientes de los gametos paterno y materno aumenta. Como resultado medible hay un desequilibrio en las frecuencias alélicas respecto a lo esperado por la ley de Hardy-Weinberg. De esta manera, un alelo selectivamente neutro puede transmitirse de generación en generación debido a que está ligado a un alelo que presenta una ventaja selectiva.

### Breve descripción de los dibujos

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

Figura 1.- Muestra el gel de acrilamida resultado de la técnica de análisis del polimorfismo en la conformación de las cadenas simples (ADN monocatenario - ADNmC) de ADN de regiones amplificadas por PCR (PCR-SSCP, *PCR Single Strand Conformational Polymorphism*) que permite la identificación de los individuos portadores del alelo *pearl* ( $C^{prl}$ ), como se muestra en el Ejemplo 2.

### Modo de realización de la invención

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

#### Ejemplo 1. Detección del alelo $C^{prl}$ .

Se analizó la secuencia nucleotídica del gen *membrane-associated transponer protein* (*MATP*). Para ello, se utilizó ADN genómico aislado a partir de muestras de sangre de caballo estabilizadas en el conservante *Magic Buffer* (ES225130782), y se llevó a cabo la amplificación mediante PCR de los siete exones del gen *MATP* utilizando cebadores diseñados a partir de la secuencia públicamente disponible en la base de datos *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y la

herramienta primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>). Los cebadores utilizados fueron: exón 1 directo 5'-ATCATCTCTGTTGGCTGCT-3' (caracterizado por SEQ ID Nº: 1), exón 1 inverso 5'-TTCGCACTCTCCTICTATGG-3' (caracterizado por SEQ ID Nº: 2), exón 2 directo 5'-CTTGATTGCTGACCGAAGG-3' (caracterizado por SEQ ID Nº: 3), exón 2 inverso 5'-CCCTACCTGTGAAGAGAGC-3' (caracterizado por SEQ ID Nº: 4), exón 3 directo 5'-TGATGAAAGGGAGAGAGTC-3' (caracterizado por SEQ ID Nº: 5), exón 3 inverso 5'-AAGAAGAAAGGGTAAGAACAGAA-3' (caracterizado por SEQ ID Nº: 6), exón 4 directo 5'-GTAACATGGCTGTGCTCT-3' (caracterizado por SEQ ID Nº: 7), exón 4 inverso 5'-CTTGACAGGTGCTGAATGAG-3' (caracterizado por SEQ ID Nº: 8), exón 5 directo 5'-CAACAACCCCAAATCTCT-3' (caracterizado por SEQ ID Nº: 9), exón 5 inverso 5'-TCCAACACTTCACCATCTT-3' (caracterizado por SEQ ID Nº: 10), exón 6 directo 5'-CACAGATAGGGAAGTTCTTTG-3' (caracterizado por SEQ ID Nº: 11), exón 6 inverso 5'-CAGATGTTACCCAGCACAGA-3' (caracterizado por SEQ ID Nº: 12), exón 7 directo 5'-TCAAATGCTGTCCTGTGTT-3' (caracterizado por SEQ ID Nº: 13), exón 7 inverso 5'-TACCGCCCCTAAAATCATAA-3' (caracterizado por SEQ ID Nº: 14).

Las muestras utilizadas incluyeron un total de 16 caballos P.R.E.: 4 caballos con fenotipos compatibles con los genotipos  $C^{Cr}C^{Cr}$  o  $C^{Prl}C^{Prl}$  pero que no eran portadores del alelo  $C^{Cr}$ ; 6 muestras de caballos con capa cremella o perla pero que no eran portadores de dos copias del alelo  $ce'$ ; 5 muestras de caballos que no mostraron un fenotipo diluido como controles. Todas las muestras incluidas en el estudio fueron genotipadas para la mutación crema (Tabla 1). Las secuencias del gen *MATP* fueron analizadas utilizando el software *Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems)* y alineadas con el genoma equino EquCab2 como secuencia de referencia.

25

**Tabla 1.** Fenotipos y genotipos de las muestras de Pura Raza Española (P.R.E.) incluidas en el estudio de detección de la mutación causal de las capas perlino e isabelo ( $C^{Prl}$ ) del Ejemplo 1.

ID	Fenotipo	<i>MC1R</i> <sup>1</sup> c.901C>T (castaño/ alazán)	<i>ASIP</i> <sup>2</sup> 11del (negro)	<i>STX17</i> <sup>3</sup> duplicación intrón 6 (gris)	<i>MATP</i> <sup>4</sup> c.457G>A (crema)	<i>MATP</i> c.100G>A (pearl)
1	perla	EEE <sup>E</sup>	AAA <sup>A</sup>	-	$C^{Cr}C^{Cr}$	$C^{Prl}C^{Prl}$
2	isabelo	EEE <sup>E</sup>	A <sup>A</sup> A <sup>a</sup>	-	$C^{Cr}C^{Cr}$	$C^{Prl}C^{Prl}$
3	isabelo	EEE <sup>e</sup>	A <sup>a</sup> A <sup>a</sup>	G <sup>g</sup> G <sup>g</sup>	$C^{Cr}C^{Cr}$	$C^{Prl}C^{Prl}$
4	isabelo	EEE <sup>E</sup>	AAA <sup>a</sup>	G <sup>g</sup> G <sup>g</sup>	$C^{Cr}C^{Cr}$	$C^{Prl}C^{Prl}$
5	perlino	E <sup>e</sup> E <sup>e</sup>	AAA <sup>A</sup>	-	$C^{Cr}C^{Cr}$	$C^{Prl}C^{Prl}$
6	tordo* perlino	EEE <sup>E</sup>	A <sup>A</sup> A <sup>a</sup>	G <sup>GG</sup> G	$C^{Cr}C^{Cr}$	$C^{Prl}C^{Prl}$
7	perlino	EEE <sup>E</sup>	AAA <sup>A</sup>	G <sup>g</sup> G <sup>g</sup>	$C^{Cr}C^{Cr}$	$C^{Prl}C^{Prl}$
8	tordo* perlino	EEE <sup>E</sup>	AAA <sup>A</sup>	G <sup>g</sup> G <sup>g</sup>	$C^{Cr}C^{Cr}$	$C^{Prl}C^{Prl}$
9	perlino	EEE <sup>E</sup>	AAA <sup>A</sup>	G <sup>g</sup> G <sup>g</sup>	$C^{Cr}C^{Cr}$	$C^{Prl}C^{Prl}$
10	tordo* perlino	EEE <sup>E</sup>	A <sup>A</sup> A <sup>a</sup>	G <sup>GG</sup> G	$C^{Cr}C^{Cr}$	$C^{Prl}C^{Prl}$
11	negro	EEE <sup>E</sup>	A <sup>A</sup> A <sup>a</sup>	G <sup>g</sup> G <sup>g</sup>	$C^{Cr}C^{Cr}$	$C^{Prl}C^{Prl}$
12	Alazán	E <sup>e</sup> E <sup>e</sup>	A <sup>A</sup> A <sup>a</sup>	-	$C^{Cr}C^{Cr}$	$C^{Prl}C^{Prl}$
13	Alazán	E <sup>e</sup> E <sup>e</sup>	A <sup>A</sup> A <sup>a</sup>	-	$C^{Cr}C^{Cr}$	$C^{Prl}C^{Prl}$
14	Castaño	EEE <sup>E</sup>	AAA <sup>A</sup>	-	$C^{Cr}C^{Cr}$	$C^{Prl}C^{Prl}$
15	Castaño	EEE <sup>E</sup>	A <sup>A</sup> A <sup>a</sup>	G <sup>g</sup> G <sup>g</sup>	$C^{Cr}C^{Cr}$	$C^{Prl}C^{Prl}$
16	Alazán	E <sup>e</sup> E <sup>e</sup>	A <sup>A</sup> A <sup>a</sup>	G <sup>g</sup> G <sup>g</sup>	$C^{Cr}C^{Cr}$	$C^{Prl}C^{Prl}$

\*Encanecimiento progresivo con la edad

<sup>1</sup>Gen *melanocortin 1 receptor*. Alelos: E<sup>E</sup> (alelo salvaje); E<sup>a</sup> (alelo alazán)

<sup>2</sup>Gen *agouti signaling protein*. Alelos: A<sup>A</sup> (alelo salvaje); A<sup>a</sup> (alelo negro)

30

<sup>3</sup>Gen *syntaxin 17*. Alelos: G<sup>g</sup> (alelo salvaje); G<sup>G</sup> (alelo tordo)

<sup>4</sup>Gen *membrane-associated transporter protein*. Alelos: C<sup>cr</sup> (alelo salvaje); C<sup>Cr</sup> (alelo crema); C<sup>prl</sup> (alelo salvaje); C<sup>prl</sup> (alelo pearl)

Se localizaron tres nuevos polimorfismos de un solo nucleótido (single nucleotide polymorphism, SNP) en el gen MATP: i) c.48T>C en el intrón 1 ii) c.266C>Ten el exón 3; y ii) c.100G>A en el exón 4. El SNP en el exón 3 es sinónimo, mientras el SNP en el exón 4 causa la sustitución del aminoácido hidrofóbico Alanina por el aminoácido polar Treonina en la posición 329 de la proteína (p.Ala329Thr), localizada en la hélice 7 transmembrana (TM). La variante mutada probablemente afecta la especificidad del sustrato y/o la actividad de transporte de la proteína MATP (Ward R.J. & Milligan G.

5 (2002) Reciprocal mutations of highly conserved residues in transmembrane helices 2 and 7 of the alpha(2A)-adrenoceptor restore agonist activation of G(i1)alpha. *Cellular Signalling* 14, 139-44; Haimeur A., Conseil G., Deeley R.G. & Cole S.P. (2004) Mutations of charged amino acids in or near the transmembrane helices of the second membrane spanning domain differentially affect the substrate specificity and transport activity of the

10 multidrug resistance protein MRP1 (ABCC1). *Molecular Pharmacology* 65, 1375-85). El reemplazo producido por la mutación p.Asp153Asn en el exón 3 del gen *MATP* (alelo C<sup>cr</sup>), da lugar a la sustitución del aminoácido polar ácido aspártico por el aminoácido polar neutral asparagina en la hélice 4 TM. Teniendo en cuenta el modo de herencia codominante comparado con el modo de herencia recesivo y el fenotipo diluido más

15 extremo causado por el alelo C<sup>cr</sup> cuando se compara con el alelo C<sup>prl</sup>, la mutación causal del crema debe tener un efecto más severo en la funcionalidad de esta proteína de transporte implicada en la síntesis de melanina. La combinación de los alelos C<sup>cr</sup> y C<sup>prl</sup> puede causar también una disrupción severa del producto génico, lo que lleva a la manifestación de una capa muy similar a la producida por el homocigoto C<sup>cr</sup>C<sup>cr</sup>.

20 25 El SNP c.100G>A en el exón 4 del gen *MATP* se separa de forma perfecta con los fenotipos perlino e isabelo (Tabla 1). Entre las muestras analizadas, uno de los caballos que exhibía una capa negra resultó ser portador de un alelo C<sup>prl</sup>. Este nuevo alelo puede explicar también la capa palomino muy claro de uno de los caballos portadores de una sola copia del alelo C<sup>cr</sup> del artículo de Mariat *et al.* (Mariat, D., Taourit, S. & Guerin, G.

30 (2003) A mutation in the *MATP* gene causes the cream coat colour in the horse. *Genetics Selection and Evolution* 35, 119-33).

35 Por lo tanto, la mutación c.100G>A (p.Ala329Thr) en el exón 4 del gen *MATP*, caracterizada por SEQ ID N°: 17, es la mutación causal de las coloraciones de capa perlino e isabelo y de los fenotipos parecidos al cremello, perla y crema cenizo asociados con el genotipo doble heterocigoto C<sup>cr</sup> y C<sup>prl</sup>. Este patrón de capa puede ser difícil de diferenciar de los efectos de los alelos crema C<sup>cr</sup> y champán CH<sup>CH</sup>, y puede también ser enmascarado por el locus gris (G), cuyo alelo G<sup>g</sup> dominante produce un encanecimiento progresivo con la edad independientemente de la base de color que tenga el animal. Por lo tanto, la caracterización de la mutación *pearl* permite a los criadores identificar a los portadores del alelo C<sup>prl</sup> y seleccionar este color de capa específico de acuerdo con las demandas del mercado, las preferencias personales o los requerimientos del libro Genealógico de la raza, así como verificar su segregación dentro de pedigríes particulares.

40 45 50 La aplicación comercial de esta técnica se puede llevar a cabo en cualquier laboratorio con equipos de biología molecular y con personal técnico formado en este tipo de técnicas. La detección del alelo *pearl* (C<sup>prl</sup>) se puede llevar a cabo en cualquier raza equina, pero esta especialmente indicado en las razas ibéricas P.R.E. y Lusitano, y en razas de origen ibérico como el Quarter Horse o Paint. El objetivo de su aplicación es

permitir a los criadores interesados identificar a los portadores del alelo  $C^{prl}$  y seleccionar este color de capa específico de acuerdo a las demandas del mercado, las preferencias personales o los requerimientos del Libro Genealógico de la raza, así como verificar su segregación dentro de pedigríes particulares.

5

**Ejemplo 2. Detección de animales portadores del alelo causante de las capas perlino e isabelo ( $C^{prl}$ ).**

- 10 La detección del alelo causante de las capas perlino e isabelo ( $C^{prl}$ ) puede llevarse a cabo mediante cualquiera de los procedimientos comúnmente conocidos y utilizados de biología molecular; se incluye un ejemplo de realización, sin estar limitado a éste los métodos diagnósticos que se pueden emplear en la detección del alelo *pearl*.
- 15 Se utilizó la técnica de análisis del polimorfismo en la conformación de las cadenas simples (ADN monocatenario - ADNm) de ADN de regiones amplificadas por PCR (PCR-SSCP, *PCR Single Strand Conformational Polymorphism*). El cambio de un único nucleótido en una secuencia no se puede distinguir en una electroforesis normal porque las propiedades físicas de las dos hebras son casi idénticas para ambos alelos. Sin embargo, la técnica de PCR-SSCP permite detectar ese cambio al basarse en la relación 20 entre la movilidad electroforética de una hebra de ADNm y su conformación, que es un reflejo de su secuencia nucleotídica (Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. & Sekiya, T. (1989a) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as 25 single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86, 2776-2770). En esta técnica, el ADN bicatenario (ADNb) se 30 desnaturaliza para obtener las dos hebras de ADNm que, a continuación, se separan mediante electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones no desnaturalizantes. Cada hebra de ADNm asume una configuración tridimensional única basada en su secuencia de ADN (conformero), de manera que cualquier diferencia en la secuencia da lugar a un cambio en la movilidad de las moléculas de ADNm, con lo que migran de forma diferente al someterlas a electroforesis a pesar de que el número de nucleótidos sea el mismo.
- 35 Se extrajo el ADN de muestras de sangre aisladas utilizando un método estándar fenol-cloroformo (Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, New York). La cuantificación de la concentración y calidad del ADN obtenido se realizó mediante 40 electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio 1% en buffer TBE1X (Tris-HCl 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 2 mM, pH = 8). Para determinar la concentración se comparó visualmente la intensidad de la banda de ADN problema con bandas de patrones de concentración conocida, en este caso con el patrón de concentración de ADN HyperLadder II (Bioline). La concentración final de las muestras de ADN se llevó a 5-10 ng/ $\mu$ l para ser utilizadas en la PCR.
- 45 Las reacciones PCR se prepararon con 0,75 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 U de Taq Polymerasa (Biotoools), 0,3 mM dNTPs, 0,5  $\mu$ M de cada cebador y 10 ng de ADN en un volumen final de 10  $\mu$ l. Las reacciones de amplificación comenzaron a 94°C durante 4 minutos, seguidos de 30 ciclos compuestos por 50 segundos a 94°C, 50 segundos a 57°C y 40 segundos a 72°C, y finalizaron con una extensión a 72°C durante 10 minutos.
- 50 A cada uno de los productos amplificados se le añadieron 10  $\mu$ l de tampón de carga (EDTA 5,5 M, xilen-cianol 0,05%, azul de bromofenol 0,005%, pH = 8) y se

desnaturalizaron a 96°C durante 5 minutos. Posteriormente, se enfriaron colocándolos en hielo durante otros 5 minutos y se sometieron a electroforesis en geles al 12% de acrilamida-bisacrilamida 29:1, TBE 0,5X, persulfato amónico 0,5% y TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletilenediamina) 0,05%, de acuerdo con la técnica descrita por Barroso *y col* (1999) (Barroso A, Dunner S, Cañón J. (1999) Technical note: Use of PCR-single-strand conformation polymorphism analysis for detection of bovine beta-casein variants A1, A2, A3, and B. *Journal of Animal Science* 77, 2629-2632). El tampón de electroforesis es TBE 1X y los productos PCR se sometieron a electroforesis a 300 V durante 5 horas, manteniendo una temperatura constante de 15°C a lo largo de todo el proceso.

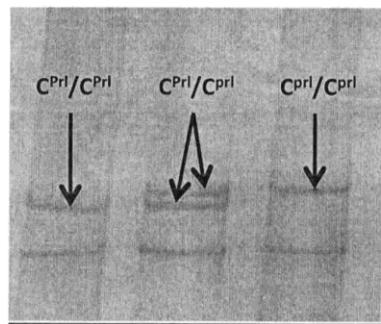
Finalmente, los geles se tiñeron con nitrato de plata siguiendo el procedimiento modificado por Barroso *y col.* (1999). Los patrones de bandas de ADN obtenidos se analizaron visualmente. En la Figura 1 se puede ver un gel de acrilamida en el que se visualiza el patrón electroforético característico del alelo salvaje ( $C^{Pr1}$ ) y el alelo mutado *pearl* ( $C^{Pr1}$ ).

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Método *in vitro* para detectar individuos de la especie equina portadores de la causa genética responsable de las capas perlino o isabelo, que comprende detectar la mutación c.100G>A del exón 4 del gen MATP y/o el cambio de aminoácido p.Ala329Thr en la proteína MATP del individuo.
- 10 2. Método según la reivindicación 1 en el que la secuencia del exón 4 mutado del gen MATP está **caracterizada** por SEQ ID Nº: 17 y la secuencia de la proteína MATP esta **caracterizada** por SEQ 1D Nº: 19.
- 15 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que incluye la detección de cualquiera de las mutaciones puntuales que se encuentran en desequilibrio de ligamiento con la mutación c.100G>A del exón 4.
- 20 4. Método según la reivindicación 3 que incluye la detección de la mutación c.48T>C en el intrón 1 y/o de la mutación c.266C>T en el exón 3 del gen *MATP*.
- 25 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el individuo de la especie equina es macho o hembra y pertenece al grupo formado por las razas: Pura Raza Española (P.R.E.), Lusitano, Quarter Horse, Paint o cualquier otra población o raza que presente un fenotipo de dilución de la coloración de la capa.
- 30 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que se realiza sobre muestras aisladas de ácidos nucleicos extraídos a partir de una muestra biológica de un individuo de la especie equina.
- 35 7. Método según la reivindicación 6 en el que la muestra biológica es de sangre, folículos pilosos, frotis bucal, o cualquier tejido que contenga ADN viable.
- 40 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la mutación c.100G>A del exón 4 del gen MATP se detecta mediante la técnica de análisis del polimorfismo en la conformación de las cadenas simples (ADN monocatenario - ADNm) de ADN de regiones amplificadas por PCR (PCR-SSCP, PCR *Single Strand Conformational Polymorphism*), la técnica del análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP, PCR *Restriction Fragment Length Polymorphism*), la secuenciación directa, la pirosecuenciación, la reacción de ligado por oligonucleótidos (OLA), la técnica de *high resolution melting* (HRM), el ensayo de discriminación alélica por TaqMan, la hibridación en microarray, la extensión del cebador o *primer extension* (PE), o cualquier otra técnica.
- 45 9. Método *in vitro* para la verificación del parentesco entre individuos de la especie equina que incluye detectar la mutación c.100G>A del exón 4 del gen MATP y/o el cambio de aminoácido p.Ala329Thr en la proteína MATP de dos o mas individuos.
10. Método según la reivindicación 9 en el que la secuencia del exón 4 del gen MATP mutado está **caracterizada** por SEQ ID Nº: 17 y la secuencia de la proteína MATP mutada está **caracterizada** por SEQ ID Nº: 19.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9-10 que incluye la detección de cualquiera de las mutaciones puntuales que se encuentran en desequilibrio de ligamiento con la mutación c.100G>A del exón 4.
- 5 12. Método según la reivindicación 11 que incluye la detección de la mutación c.48T>C en el intrón 1 y/o de la mutación c.266C>T en el exón 3 del gen *MATP*.
- 10 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9-12 en el que cada individuo de la especie equina es macho o hembra y pertenece al grupo formado por las razas: Pura Raza Española (P.R.E.), Lusitano, Quarter Horse, Paint o cualquier otra población o raza que presente un fenotipo de dilución de la coloración de la capa.
- 15 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9-13 que se realiza sobre muestras aisladas de ácidos nucleicos extraídos a partir de una muestra biológica de un individuo de la especie equina.
- 15 15. Método según la reivindicación 14 en el que la muestra biológica es de sangre, folículos pilosos, frotis bucal, o cualquier tejido que contenga ADN viable.
- 20 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9-15 en el que la mutación c.100G>A del exón 4 del gen *MATP* se detecta mediante la técnica de análisis del polimorfismo en la conformación de las cadenas simples (ADN monocatenario - ADNm) de ADN de regiones amplificadas por PCR (PCR-SSCP, *PCR Single Strand Conformational Polymorphism*), la técnica del análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción de regiones amplificadas por PCR (PCR-RFLP, *PCR Restriction Fragment Length Polymorphism*), la secuenciación directa, la pirosecuenciación, la reacción de ligado por oligonucleótidos (OLA), la técnica de *high resolution melting* (HRM), el ensayo de discriminación alélica por TaqMan, la hibridación en microarray, la extensión del cebador o *primer extension* (PE), o cualquier otra técnica.
- 25 17. Molécula de ADN aislado que comprende la secuencia nucleotídica **caracterizada** por SEQ ID N°: 17.
- 30 18. Molécula polipeptídica que comprende la secuencia aminoacídica **caracterizada** por SEQ ID N°: 18.
- 35

Figura 1



## Listado de Secuencias

<110> Universidad Complutense de Madrid  
 <120> Método para detectar individuos de la especie equina portadores de la causa genética responsable de las capas perlino e isabelo  
 <160> 19  
 <170> BISSAP 1.0  
 <210> 1  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Equus caballus  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..19  
 <223> /mol\_type="DNA"  
     /organism="Equus caballus"  
 <400> 1  
     atcatctctg ttggctgct 19  
  
 <210> 2  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Equus caballus  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..20  
 <223> /mol\_type="DNA"  
     /organism="Equus caballus"  
 <400> 2  
     ttcgcactct ctttctatgg 20  
  
 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Equus caballus  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..20  
 <223> /mol\_type="DNA"  
     /organism="Equus caballus"  
 <400> 3  
     ctttgattgc tgaccgaagg 20  
  
 <210> 4  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> Equus caballus  
 <220>  
 <221> source  
 <222> 1..19  
 <223> /mol\_type="DNA"  
     /organism="Equus caballus"  
 <400> 4  
     ccctacctgt gaagagagc 19

<210> 5		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Equus caballus		
<220>		
<221> source		
<222> 1..20		
<223> /mol_type="DNA"		
<223> /organism="Equus caballus"		
<400> 5		
tgatgaaagg gagagagtcc		20
<210> 6		
<211> 24		
<212> DNA		
<213> Equus caballus		
<220>		
<221> source		
<222> 1..24		
<223> /mol_type="DNA"		
<223> /organism="Equus caballus"		
<400> 6		
aagaagaaaag ggtaagaaca agaa		24
<210> 7		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Equus caballus		
<220>		
<221> source		
<222> 1..20		
<223> /mol_type="DNA"		
<223> /organism="Equus caballus"		
<400> 7		
gtaacatggc tgtgtgctct		20
<210> 8		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Equus caballus		
<220>		
<221> source		
<222> 1..20		
<223> /mol_type="DNA"		
<223> /organism="Equus caballus"		
<400> 8		
cttgacaggt gctgaatgag		20
<210> 9		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Equus caballus		
<220>		
<221> source		

<222> 1..20		
<223> /mol_type="DNA"		
/organism="Equus caballus"		
<400> 9		20
caacaacccc aaatctctct		
<210> 10		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Equus caballus		
<220>		
<221> source		
<222> 1..20		
<223> /mol_type="DNA"		
/organism="Equus caballus"		
<400> 10		20
tccaaacactt caccatcttg		
<210> 11		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> Equus caballus		
<220>		
<221> source		
<222> 1..22		
<223> /mol_type="DNA"		
/organism="Equus caballus"		
<400> 11		22
cacagatagg gaagttcttt tg		
<210> 12		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Equus caballus		
<220>		
<221> source		
<222> 1..20		
<223> /mol_type="DNA"		
/organism="Equus caballus"		
<400> 12		20
cagatgttac ccagcacaga		
<210> 13		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> Equus caballus		
<220>		
<221> source		
<222> 1..20		
<223> /mol_type="DNA"		
/organism="Equus caballus"		
<400> 13		20
tcaaatgctg ttcctgtgtt		
<210> 14		



ataggagacg gagcccaaca gtctgttta acaaatcgta caagtgtatgg ttaagcatgc	1260
taaagttgc gaagcactgc attggggcgc aaaaatccac ccctatctgg atatgtcag	1320
gtgcgtgaag ggatgtctga aggatgacca tcactgggc tggacttga agcattccc	1380
tcagctttc tgcttcgttg gaatggttc caataagcat gcataagttt ttaagtggct	1440
ttttaaaaaa gagagagatg attcacatac cataaaaatc accatttaaa actcagtgc	1500
tttagtttta ttctcaaggt tggcaacca tcaccgctat ctaattccac gacatttca	1560
tcacaccaaa aagaaaccca gtgactgtga gtagtcactc ctcacttcct cctcgccca	1620
gccctaggta accgctaat caactttctg tctctctaga tttgcctttt ctggacattc	1680
acaggcgtaa ttttaaaac ctgaaaatat aatgaagcta ttttattt gaaaaacaaa	1740
gcaaaatgaa agcaaaggaa gagagcttga tgacaggaag tttggtgaa aataaaaaac	1800
gtgggtcatt ctaaaccagg attgatgtga ggtatgtta tttctgtttt ag	1852

<210> 16  
 <211> 323  
 <212> DNA  
 <213> Equus caballus

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..323  
 <223> /mol\_type="DNA"  
       /organism="Equus caballus"

<220>  
 <221> exon  
 <222> 1..323

<400> 16  
 gtctcgagg tgccctggc tacatggc ggcattgtatgc ctggcgcat ctgaaactgg 60  
 gaagaatgct gggcacagaa ttccaggtca tttttttttt ctccgccttg atgcttactt 120  
 tgtgtgtgttattcatctg tgcaatattc ctgaagcccc acttagagat gttgcaaagg 180  
 atatwccccc ccagcaagac tcccaagacc ctctttgtc atcagacaga atgtatgagt 240  
 atgggtctat cgagaaagtt aaaaatggtt atataaacc agagatggtg ctgcagggag 300  
 agaaaaacaam aaatacccaa cag 323

<210> 17  
 <211> 144  
 <212> DNA  
 <213> Equus caballus

<220>  
 <221> source  
 <222> 1..144  
 <223> /mol\_type="DNA"  
       /organism="Equus caballus"

<220>  
 <221> CDS  
 <222> 1..144  
 <223> /transl\_table=1  
       /translation="TRRTMTMKSLLRALVSMPPHYRYLCISHLLGWTTFLSNMLFFTDFMGQ"

<220>  
 <221> exon  
 <222> 1..144

<400> 17  
 actcgagga caatgaccat gaagtcactg ctgagggcac tggtagtat gcctccac 60  
 taccgctacc tttgcatcag ccacccctt gatggacca cttcctgtc caacatgctc 120  
 ttcttcacag atttcatggg ccag 144

<210> 18  
 <211> 48  
 <212> PRT  
 <213> Equus caballus

<220>  
 <221> SOURCE  
 <222> 1..48  
 <223> /mol\_type="protein"  
     /note="[CDS]:1..144 from SEQ ID NO 17"  
     /organism="Equus caballus"

<400> 18  
 Thr Arg Arg Thr Met Thr Lys Ser Leu Leu Arg Ala Leu Val Ser 1  
     5                   10                   15  
 Met Pro Pro His Tyr Arg Tyr Leu Cys Ile Ser His Leu Leu Gly Trp 20  
     25                   30  
 Thr Thr Phe Leu Ser Asn Met Leu Phe Phe Thr Asp Phe Met Gly Gln 35  
     40                   45

<210> 19  
 <211> 530  
 <212> PRT  
 <213> Equus caballus

<220>  
 <221> SOURCE  
 <222> 1..530  
 <223> /mol\_type="protein"  
     /organism="Equus caballus"

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 291  
 <223> /  
     Lys291Thr due to A>C SNP

<220>  
 <221> VARIANT  
 <222> 11  
 <223> His11Pro due to A>C SNP

<400> 19  
 Met Gly Gly Asn Ser Gly Gln Pro Gly Val Pro Thr Tyr Lys Ser Leu 1  
     5                   10                   15  
 Ala Glu Asp Gly Pro Phe Gly Ser Val Glu Leu Pro Lys Arg Ser Thr 20  
     25                   30  
 Gly Arg Leu Val Met His Ser Met Ala Met Phe Gly Arg Glu Phe Cys 35  
     40                   45  
 Tyr Ala Val Glu Ala Ala Tyr Val Thr Pro Val Leu Leu Ser Val Gly 50  
     55                   60  
 Leu Pro Lys Arg Leu Tyr Ser Val Val Trp Leu Leu Ser Pro Val Leu 65  
     70                   75                   80  
 Gly Phe Leu Leu Gln Pro Val Val Gly Ser Ala Ser Asp His Cys Arg 85  
     90                   95  
 Ala Arg Trp Gly Arg Arg Pro Tyr Ile Leu Ala Leu Ser Val Ile

# ES 2 566 982 A1

	100	105	110
Met Leu Leu Gly Met Ala Leu Tyr Leu Asn Gly Asp Ala Val Ile Ser			
115	120	125	
Ala Leu Ile Ala Asp Arg Arg Lys Lys Leu Thr Trp Ala Ile Thr Ile			
130	135	140	
Thr Met Ile Gly Val Val Leu Phe Asp Phe Ala Ala Asp Phe Ile Asp			
145	150	155	160
Gly Pro Ile Lys Ala Tyr Leu Phe Asp Val Cys Ser His Gln Asp Lys			
165	170	175	
Glu Arg Gly Leu His His Ala Leu Phe Thr Gly Leu Gly Gly Ala			
180	185	190	
Leu Gly Tyr Ile Leu Gly Ala Ile Asp Trp Ala His Leu Lys Leu Gly			
195	200	205	
Arg Met Leu Gly Thr Glu Phe Gln Val Met Phe Phe Ser Ala Leu			
210	215	220	
Met Leu Thr Leu Cys Val Val Ile His Leu Cys Ser Ile Pro Glu Ala			
225	230	235	240
Pro Leu Arg Asp Val Ala Lys Asp Ile Pro Pro Gln Gln Asp Ser Gln			
245	250	255	
Asp Pro Leu Leu Ser Ser Asp Arg Met Tyr Glu Tyr Gly Ser Ile Glu			
260	265	270	
Lys Val Lys Asn Gly Tyr Ile Asn Pro Glu Met Val Leu Gln Gly Glu			
275	280	285	
Lys Thr Thr Asn Thr Gln Gln Thr Arg Arg Thr Met Thr Met Lys Ser			
290	295	300	
Leu Leu Arg Ala Leu Val Ser Met Pro Pro His Tyr Arg Tyr Leu Cys			
305	310	315	320
Ile Ser His Leu Leu Gly Trp Thr Ala Phe Leu Ser Asn Met Leu Phe			
325	330	335	
Phe Thr Asp Phe Met Gly Gln Ile Val Tyr His Gly Asp Pro Tyr Ser			
340	345	350	
Ala His Asn Ser Thr Glu Phe Leu Ile Tyr Gln Arg Gly Val Glu Val			
355	360	365	
Gly Cys Trp Gly Leu Cys Ile Asn Ser Val Phe Ser Ser Leu Tyr Ser			
370	375	380	
Tyr Phe Gln Lys Val Leu Val Ser Tyr Val Gly Leu Lys Gly Leu Tyr			
385	390	395	400
Phe Met Gly Tyr Leu Leu Phe Gly Leu Gly Thr Gly Phe Ile Gly Leu			
405	410	415	
Phe Pro Asn Ile Tyr Ser Thr Leu Val Leu Cys Thr Ser Phe Gly Val			
420	425	430	
Met Ser Ser Thr Leu Tyr Thr Val Pro Phe Asn Leu Ile Ala Glu Tyr			
435	440	445	
His Arg Glu Glu Gln Glu Lys Gln Arg Arg Gln Ala Gln Gly Gly Asp			
450	455	460	
Val Asp Ser Ser Gly Arg Gly Gln Gly Leu Asp Cys Ala Ala Leu Thr			
465	470	475	480
Cys Met Val Gln Leu Ala Gln Ile Leu Val Gly Gly Gly Leu Gly Phe			
485	490	495	
Leu Val Asn Ile Ala Gly Ser Val Val Val Val Ile Thr Ala Ser			
500	505	510	
Val Val Ala Leu Ile Gly Cys Cys Phe Val Val Leu Phe Val Arg Tyr			
515	520	525	
Val Ala			
530			



②1 N.º solicitud: 201500899

②2 Fecha de presentación de la solicitud: 16.12.2015

③2 Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X		Base de Datos GENBANK [on line], 01.09.2008 [recuperado el 03.03.2016]. DEL VALLE, A. et al., "Equus caballus solute carrier family 45 member 2 (SLC45A2) gene, exon 4 and partial cds", Recuperado de GENBANK en NCBI ('The National Center for Biotechnology Information'): Código de acceso (ID): EU272794.1	1-18
X		Base de Datos GENBANK [on line], 01.09.2008 [recuperado el 03.03.2016]. DEL VALLE, A. et al., "Solute carrier family 45 member 2, partial [Equus caballus]", Recuperado de GENBANK en NCBI ('The National Center for Biotechnology Information'): Código de acceso (ID): ABZ81812.1	1-18
Y		HIROTA, K. et al., 'Construction and validation of parentage testing for thoroughbred horses by 53 single nucleotide polymorphisms', JOURNAL OF VETERINARY MEDICAL SCIENCE, 2010, Vol. 72, No. 6, Págs 719-726, ISSN: 0916-7250, Materiales y métodos; Resultados.	9-16
A		MARIAT, D. et al., 'A mutation in the MATP gene causes the cream coat colour in the horse', GENETICS SELECTION EVOLUTION, 2003, Vol. 35, No. 1, Págs. 119-133, ISSN: 0999-193X, todo el documento.	1-8,17,18
A		KAKOI , H. et al., 'Development of a method for simultaneously genotyping multiple horse coat colour loci and genetic investigation of basic colour variation in Thoroughbred and Misaki horses in Japan', JOURNAL OF ANIMAL BREEDING AND GENETICS, 2009, Vol. 126, No. 6, Págs 425-431, ISSN: 0931-2668, doi: 10.1111/j.1439-0388.2009.00841.x, todo el documento.	1-8,17,18
A		LOCKE, M.M. et al., 'The cream dilution gene, responsible for the palomino and buckskin coat colours, maps to horse chromosome 21', ANIMAL GENETICS, 2001, Vol. 32, No. 6, Págs 340-343, ISSN: 0268-9146, todo el documento.	1-8,17,18
A		PRUVOST, M. et al., 'From genes to phenotypes - evaluation of two methods for the SNP analysis in archaeological remains: pyrosequencing and competitive allele specific PCR (KASPar)', ANNALS OF ANATOMY, 2012, Vol. 194, No. 1, Págs 74-81, ISSN: 0940-9602 (print), ISSN: 1618-0402 (electronic), doi: 10.1016/j.aanat.2011.10.007, todo el documento.	1-8,17,18
A		TOZAKI, T. et al., 'Population study and validation of paternity testing for Thoroughbred horses by 15 microsatellite loci', JOURNAL OF VETERINARY MEDICAL SCIENCE, 2001, Vol. 63, No. 11, Págs 1191-1197, ISSN: 0916-7250, todo el documento.	9-16

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 08.04.2016	Examinador J. L. Vizán Arroyo	Página 1/5
--	----------------------------------	---------------

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL-EBI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 08.04.2016

**Declaración****Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)**

Reivindicaciones 9-16  
Reivindicaciones 1-8, 17, 18

SI  
NO

**Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)**

Reivindicaciones  
Reivindicaciones 9-16

SI  
NO

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

**Base de la Opinión.-**

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

**1. Documentos considerados.-**

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Base de Datos GENBANK [on line], 01.09.2008 [recuperado el 03.03.2016]. DEL VALLE, A. et al., "Equus caballus solute carrier family 45 member 2 (SLC45A2) gene, exon 4 and partial cds", Código de acceso (ID): EU272794.1	01.09.2008
D02	Base de Datos GENBANK [on line], 01.09.2008 [recuperado el 03.03.2016]. DEL VALLE, A. et al., "Solute carrier family 45 member 2, partial [Equus caballus]", Código de acceso (ID): ABZ81812.1	01.09.2008
D03	HIROTA, K. et al., <i>J. Vet. Med. Sci.</i> , (2010), 72(6): 719-26.	2010
D04	MARIAT, D. et al., <i>Genet. Sel. Evol.</i> , (2003), 35(1): 119-33.	2003
D05	KAKOI, H. et al., <i>J. Anim. Breed Genet.</i> , (2009), 126(6): 425-31.	2009
D06	LOCKE, M.M. et al., <i>Anim. Genet.</i> , (2001), 32(6): 340-3.	2001
D07	PRUVOST, M. et al., <i>Ann. Anat.</i> , (2012), 194(1): 74-81.	2012
D08	TOZAKI, T. et al., <i>J. Vet. Med. Sci.</i> , (2001), 63(11): 1191-7.	2001

En D01-D02, D04-D07 se describen mutaciones en el gen *MATP* (SLC45A2) de *Equus caballus*.

En D03 y D08 se describen marcadores genéticos empleados en pruebas de parentesco entre caballos pura sangre.

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

1. NOVEDAD (Art. 4.1. y Art. 6.1. de la Ley de Patentes) y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 4.1. y Art. 8.1. de la Ley de Patentes).

1.1. Reivindicaciones independientes 1, 17 y 18.

1.1.1. El objeto de la reivindicación 1 consiste en un método *in vitro* para detectar individuos de la especie equina portadores de la causa genética responsable de las capas perlina o isabelino que comprende detectar la mutación 100 G>A del exón 4 del gen *MATP* y/o el cambio de aminoácido Ala329Thr en la proteína *MATP*. Según la reivindicación 2, la secuencia del exón 4 mutado del gen *MATP* está caracterizada por SEQ ID NO: 17. El objeto de las reivindicaciones 17 y 18 es en una molécula de ADN y una molécula polipeptídica que comprenden respectivamente la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 17 y la de aminoácidos SEQ ID NO: 18.

En el estado de la técnica más próximo, constituido por los documentos D01-D02, se ha descrito y secuenciado una mutación en el exón 4 del gen *MATP* de *Equus caballus* asociada con el fenotipo de la capa de color perlino en la especie equina que es idéntica a la reivindicada en la solicitud de patente. En concreto, la mutación divulgada en D01-D02 consiste en la transición 100 G>A en la secuencia del exón 4 del gen *MATP* que se traduce en el cambio del aminoácido Ala329Thr en la proteína *MATP*. Además, las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos divulgadas en D01-D02 son idénticas a las secuencias SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, reivindicadas en la solicitud.

Por consiguiente, se considera que el objeto de las reivindicaciones independientes 1, 17 y 18, y el de las dependientes 2-8 no es nuevo sobre la base de los documentos D01-D02.

1.1.2. La presente solicitud no satisface el criterio de patentabilidad establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes en cuanto al objeto definido en las reivindicaciones 1-8, 17 y 18, pues no es nuevo según el Art. 6.1. de la Ley de Patentes.

2.1. Reivindicación independiente 9.

2.1.1. El objeto de la reivindicación 9 consiste en un método *in vitro* para la verificación del parentesco entre individuos de la especie equina que comprende detectar la mutación 100 G>A del exón 4 del gen *MATP* y/o el cambio de aminoácido Ala329Thr en la proteína *MATP*.

El problema técnico a resolver por el objeto de la reivindicación 9 puede ser considerado, por consiguiente, como la provisión de nuevos marcadores genéticos para la verificación del parentesco entre individuos de la especie equina.

En el estado de la técnica se ha descrito la mutación 100 G>A del exón 4 del gen *MATP* (cf. D01-D02). Además, se han divulgado procedimientos para la determinación del parentesco entre caballos pura sangre basados en la detección de SPNs y/o microsatélites como marcadores genéticos (cf. D03 y D08).

Por consiguiente, se puede estimar que, ante el problema técnico planteado, el experto en la materia combinaría las enseñanzas divulgadas en D01-D02 y en D03 llegando como resultado a la solución propuesta en la reivindicación 9 o a una equivalente.

Por otro lado, se estima que la solución propuesta en la solicitud es una mera alternativa no inventiva a la planteada en el estado de la técnica, puesto que en la solicitud no se describe ningún efecto inesperado y/o sorprendente asociado al uso de la mutación 100 G>A del exón 4 del gen *MATP* para la determinación del parentesco entre individuos de la especie equina frente al uso de las mutaciones descritas en D03 para el mismo fin.

Por todo ello, se considera que la reivindicación 9, y las reivindicaciones dependientes 10-16 no son inventivas sobre la base de los documentos D01-D02 y D03.

2.1.2. La presente invención no satisface el criterio de patentabilidad establecido en el Art. 4.1. de la Ley de Patentes en cuanto al objeto definido en las reivindicaciones 9-16, pues no implica actividad inventiva de acuerdo con el Art. 8.1. de la Ley de Patentes.