



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 308 868**

② Número de solicitud: 200500966

⑤ Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **13.04.2005**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2008**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
01.12.2008

⑦ Solicitante/s:
**Universidad de Santiago de Compostela
Edificio CACTUS - Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

⑦ Inventor/es: **Barros Angueira, Francisco;
Carracedo Álvarez, Ángel y
Torres Español, María**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Uso de arrays de secuencias específicas de genoma mitocondrial humano sobre soporte sólido y procedimiento para la detección de mutaciones asociadas a la Neuropatía Óptica de Leber.**

⑤ Resumen:

Uso de arrays de secuencias específicas de genoma mitocondrial humano sobre soporte sólido y procedimiento para la detección de mutaciones asociadas a la Neuropatía Óptica de Leber, mediante chips de ADN. El procedimiento se basa en la amplificación de los fragmentos que contienen las mutaciones y polimorfismos de interés y la determinación de la base implicada en los mismos mediante una reacción de minisequenciación empleando cebadores que en su extremo 5' portan una cola (tag), para su posterior detección mediante la hibridación de los productos de la reacción de minisequenciación con un microarray constituido por las secuencias complementarias a las colas (cTag).

ES 2 308 868 A1

DESCRIPCIÓN

Uso de arrays de secuencias específicas de genoma mitocondrial humano sobre soporte sólido y procedimiento para la detección de mutaciones asociadas a la Neuropatía Óptica de Leber.

Uso de arrays de secuencias específicas de genoma mitocondrial humano sobre soporte sólido y procedimiento para la detección de mutaciones asociadas a la Neuropatía Óptica de Leber, mediante chips de ADN. Son de aplicación en genética, y en particular, diagnóstico molecular y genética de poblaciones.

Estado de la técnica

El ADN mitocondrial humano es una cadena circular de 16,6 kb que contiene 37 genes, de los cuales solo 13 codifican polipéptidos componentes de la cadena respiratoria (sistema de fosforilación oxidativa, OXPHOS), siendo los restantes genes responsables de la formación de los ARN de transferencia y ribosómicos. Las mitocondrias se caracterizan por su herencia materna, aparecer en un número variable de entre cientos a miles en cada célula y el que la replicación del ADN mitocondrial y su herencia en los linajes somáticos es aleatoria. Dentro de cada mitocondria coexisten cientos o miles de cadenas circulares de ADN mitocondrial, de manera que la aparición de mutaciones puede llevar a la coexistencia de dos o más genotipos dentro de una célula, órgano o individuo, fenómeno denominado heteroplasmia. En general para una mutación patógena, la proporción de moléculas mutadas en la población heteroplásmica (carga mutacional) repercute en la severidad del defecto y en la clínica, aunque no de una manera lineal. Dado el carácter aleatorio de la replicación y herencia del ADN mitocondrial, la carga mutacional puede cambiar durante la vida del paciente y pueden darse diferentes cargas mutacionales en diferentes células y tejidos. Al tener estos diferentes requerimientos energéticos la heteroplasmia y la segregación al azar explica la variable presentación clínica y gravedad de las mutaciones en el genoma mitocondrial.

Las enfermedades asociadas a alteraciones del genoma mitocondrial tienen como base común un defecto en la biosíntesis de ATP, ya sea por mutaciones o deleciones que afectan a los genes codificantes o por mutaciones o deleciones que afectan ARNs ribosómicos o transferentes específicos que son requeridos para la síntesis de los polipéptidos codificados por los primeros (DIMAURO S., SCHON E.A. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am J Med Genet.* 2001, Vol 106, páginas 18-26; SMEITINK J. *et al.* The genetics and pathology of oxidative phosphorylation. *Nat Rev Genet.* 2001, Vol 2, páginas 342-352). Estas enfermedades presentan una clínica muy variada y pueden afectar a todos los órganos y tejidos (WONG L.-J. C., BOLES R.G. Mitochondrial DNA analysis in clinical laboratory diagnostics. *Clin Chim Acta.* 2005, Vol 354, páginas 1-20). En ciertos casos aparecen con unos aspectos clínicos, morfológicos y bioquímicos muy concretos que dan lugar a síndromes bien caracterizados. Sin embargo, en la mayoría de los casos los síntomas son poco informativos, siendo orientativo de una enfermedad de origen mitocondrial la presencia de anomalías neurológicas, a veces con aumento de ácido láctico y otros síntomas, así como una herencia materna. Por ello son enfermedades de estudio complejo, interviniendo estudios morfológicos, histoquímicos y bioquímicos, necesarios para asegurar su naturaleza. Estos estudios son a veces incluyentes y muchas veces traumáticos para el paciente, como el caso de biopsias, con lo que el estudio genético resulta la confirmación de la patología de una forma más segura y económica.

En Europa los defectos del ADN mitocondrial son causa de enfermedad en 6,57 de cada 100.000 individuos adultos, estimándose que 1 de cada 8.000 individuos tienen o presentan un riesgo de padecer una enfermedad causada por daños en este ADN. Estos valores hacen que la prevalencia de estas enfermedades sea equivalente a la de otras enfermedades neurológicas, como la Corea de Huntington, o incluso superior como en el caso de la distrofia de Duchenne, por citar dos entidades muy estudiadas molecularmente. Existen pocos datos sobre la prevalencia de la Neuropatía Óptica de Leber. Es la causa de la ceguera en 0,42-2% de los casos registrados en Australia, y en el noroeste de Inglaterra 11,8 de cada 100000 personas porta una mutación primaria o causal, presentando la enfermedad 3,22 de cada 100000. Se calcula que uno en 140000 varones adultos tienen defectos visuales como consecuencia de esta patología. Por otro lado la frecuencia relativa de las mutaciones que causan la Neuropatía Óptica de Leber varía en el mundo. La mutación G11778A es la más prevalente, siendo responsable del 70% de los casos. Esta mutación, junto con T14484C y A3460G, es considerada del grupo de mutaciones inequívocamente causales o primarias, y en conjunto se encuentra en el 95% de los casos diagnosticados.

Desde que en 1988 se publicaron las primeras mutaciones han sido descritas una gran cantidad de mutaciones y polimorfismos en el genoma mitocondrial: unas 180 mutaciones, y un número cercano de deleciones, algunas de ellas extremadamente raras, asociadas a una gran variedad de patologías. Una base de datos pública (WALLACE D.C., LOTT M.T. MITOMAP: a human mitochondrial genome database: <http://www.mitomap.org/>) recoge información de todas las mutaciones descubiertas hasta el momento y se va actualizando con aportación de datos clínicos.

La existencia de polimorfismos y de mutaciones no patogénicas en el genoma mitocondrial, aunque de menor interés en el campo diagnóstico, sí tiene aplicaciones prácticas en el campo de la genética de poblaciones, para el estudio de filogenias de poblaciones humanas y del origen y prevalencia de alteraciones mitocondriales. Además, dichos polimorfismos y mutaciones no patógenas pueden tener un efecto modificador de la expresión de otras mutaciones presentes en el genoma mitocondrial, lo que puede tener un potencial interés en el diagnóstico, pronóstico y terapia de afectados por dichas patologías (TORRONI A. *et al.* Haplotype and phylogenetic analyses suggest that one European-

ES 2 308 868 A1

specific mtDNA background plays a role in the expression of Leber hereditary optic neuropathy by increasing the penetrance of the primary mutations 11778 and 14484. *Am J Hum Genet.* 1997, Vol 60, N° 5, páginas 1107-11021).

5 Las mutaciones puntuales en el ADN mitocondrial se diagnostican actualmente mediante secuenciación del genoma mitocondrial. Su excesivo tamaño (16,6 kb) hace difícil el acceder a la secuenciación completa del mismo, de forma que normalmente se secuencian únicamente aquellos fragmentos para los cuales hay inicialmente una sospecha, lo que muchas veces es una estrategia inadecuada dada la variabilidad en expresión de las patologías mitocondriales ya comentada. Todavía se utilizan otras técnicas, como los RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), cuando la alteración afecta a un punto de corte de una enzima de restricción, y la PCR alelo específica. El problema de ambos
10 métodos es la dificultad de automatización del análisis, imprescindible cuando el número de mutaciones a analizar es elevado.

En la Tabla 1 se indican las mutaciones y polimorfismos más importantes del genoma mitocondrial humano teniendo en cuenta la prevalencia de las distintas mutaciones, la importancia diagnóstica de las patologías a las que se asocian y por el interés de ciertos polimorfismos y mutaciones no patógenas o de trascendencia dudosa. Todas estas mutaciones y polimorfismo, al igual que los responsables de la Neuropatía Óptica de Leber, pueden incluirse simultáneamente en un chip de mutaciones como el propuesto siguiendo el mismo procedimiento al descrito. Estas mutaciones se asocian generalmente a patologías de origen mitocondrial y de gran trascendencia clínica: Síndrome de Kearns-Sayre, Enfermedad de Leigh, Neuropatía óptica de Leber (LHON), MELAS (Encefalopatía mitocondrial con acidosis láctica), MERRF (Epilepsia mioclónica), NARP (Neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa), PEO (Oftalmoplegia externa progresiva), entre otras. Sin embargo la experiencia clínica demuestra que la mayoría de los individuos con patologías mitocondriales no se ajustan con exactitud a uno de los síndromes específicos definidos y que la correlación genotipo-fenotipo en medicina mitocondrial es pobre (WONG L-J. C., BOLES R. G. *op. cited*).

25

(Tabla pasa a página siguiente)

30

35

40

45

50

55

60

65

TABLA 1

	Mutación	Patología	Referencia
5	1 3243G	MELAS Kearns-Sayre	Goto Y.I., <i>et al.</i> Nature 1990; 348:651-653
	2 3256T	MELAS	Sato W., <i>et al.</i> Biochem Mol Biol Int 1994; 33:1055-1061
10	3 3271C	MELAS	Goto Y.I., <i>et al.</i> Biochim Biophys Acta 1991; 1097:238-240
	4 3291C	MELAS	Goto Y.I., <i>et al.</i> Biochem Biophys Res Commun 1994; 202:1624-1630
15	5 3316A	NIDDM LHON PEO	Lam C. <i>et al.</i> Journal of Medical Genetics. 2001; 38 (3): E10
20	6 3397G	ADPD	Brown M.D., <i>et al.</i> American Journal of Human Genetics 1996; 61 (3): 283-289
	7 3460A	LHON	Howell N., <i>et al.</i> Am J Hum Genet 1991;49: 939-950
25	8 3496T	LHON	Matsumoto M., <i>et al.</i> A. Ophthalmic Genetics. 1999; 20 (3): 153-160
	9 3497T	LHON	Matsumoto M., <i>et al.</i> Ophthalmic Genetics. 1999; 20 (3): 153-160
30	10 4136G	LHON	Riordan-Eva P., Harding, A.E. Journal of Medical Genetics. 1995; 32 (2): 81-87
	11 4160C	LHON	Howell N., <i>et al.</i> Am J Hum Genet 1991; 48:935-942
35	12 4216C	LHON	Johns D.R., Berman J. Biochem Biophys Res Commun 1991; 174:1324-1330
	13 4917G	LHON	Johns D.R., Berman J. Biochem Biophys Res Commun 1991; 174:1324-1330
40	14 5244A	LHON	Brown M.D., <i>et al.</i> Genetics 1992; 130:163-173
	15 5920A	Myoglobinuria	Karadimas, C.L., <i>et al.</i> Neurology. 2000; 55 (5): 644-649
45	16 6930A	Multisystem disorder	Bruno, C., <i>et al.</i> American Journal of Human Genetics. 1999;65 (3): 611-620
	17 7444A	LHON	Brown MD, <i>et al.</i> Am J HumGenet 1992; 51:378-385
50	18 7587C	Encefalopatía mitochondrial	Clark, K.M., <i>et al.</i> American Journal of Human Genetics. 1999; 64 (5): 1330-1339
	19 7671A	Miopatía mitochondrial	Rahman, S., <i>et al.</i> American Journal of Human Genetics. 1999;65 (4): 1030-1039
55	20 7896A	Multisystem disorder	Campos, Y., <i>et al.</i> Annals of Neurology. 2001;50 (3): 409-413
	21 8042del2	Acidosis láctica	Wong, L.J., <i>et al.</i> American Journal of Medical Genetics. 2001; 102 (1): 95-99
60	22 8344G	MERRF	Shoffner JM, <i>et al.</i> Cell 1990; 61:931-937
	23 8356C	MERRF	Silvestri G, <i>et al.</i> Am J Hum Genet 1992; 51:1213-1217
	24 8993C	Leigh(MILS)	Devries DD, <i>et al.</i> Ann Neurol 1993; 34:410-412
65	25 8993G	NARP	Holt IJ, <i>et al.</i> Am J Hum Genet 1990; 46:428-433

26	9101C	LHON	Lamminen T, <i>et al.</i> Am J Hum Genet 1995; 56:1238-1240
27	9176C	Enfermedad de Leigh	Campos, Y., <i>et al.</i> Neurology. 1997;49 (2): 595-597
28	9176G	Enfermedad de Leigh	Carozzo, R., <i>et al.</i> FEBS Letters. 2000;486 (3): 297-299
29	9438A	LHON	Johns DR, Neufeld MJ. Biochem Biophys Res Commun 1993;196: 810-815
30	9537insC	Leigh-like síndrome	Tiranti, V., <i>et al.</i> Human Molecular Genetics. 2000;9 (18): 2733-2742
31	9738T	LHON	Johns, D.R., <i>et al.</i> Journal of Neuro-ophthalmology. 1994; 14 (3): 135-140
32	9804A	LHON	Johns DR, Neufeld MJ. Biochem Biophys Res Commun 1993;196: 810-815
33	9952A	Encefalopatía mitocondrial	Hanna, M.G., <i>et al.</i> American Journal of Human Genetics. 1998;63 (1): 29-36
34	9957C	MELAS	Manfredi G, <i>et al.</i> Neuromuscular Disord 1995; 5:391-398
35	10191C	Leigh-like síndrome ESOC	Lebon, S., <i>et al.</i> Journal of Medical Genetics. 2003; 40 (12): 896-899
36	10663C	LHON	Brown, M.D., <i>et al.</i> Human Genetics. 2002;110 (2): 130-138
37	11778A	LHON	Wallace DC, <i>et al.</i> Science 1988; 242:1427-1430
38	11832A	Intolerancia al ejercicio	Andreu, A.L., <i>et al.</i> Annals of Neurology. 1999; 45 (6): 820-823
39	13513A	MELAS Enfermedad de Leigh	Chol, M., <i>et al.</i> A. Journal of Human Genetics. 2003;40 (3): 188-191
40	13514G	MELAS	Lebon, S., <i>et al.</i> Journal of Medical Genetics. 2003; 40 (12): 896-899
41	13528G	LHON-like	Batandier, C., <i>et al.</i> Human Mutation. 2000; 16 (6): 532
42	13708A	LHON	Johns DR, Berman J. Biophys Res Commun 1991; 174:1324-1330
43	13730A	LHON	Howell N, <i>et al.</i> Am J Hum Genet 1994; 53:959-963
44	14453G		
45	14459A	LHON	Jun AS, <i>et al.</i> Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:6206-6210
46	14482A	LHON	Valentino, <i>et al.</i> Annals of Neurology. 2002;51 (6): 774-778
47	14482G	LHON	Valentino, <i>et al.</i> Annals of Neurology. 2002;51 (6): 774-778
48	14484C	LHON	Johns DR, Neufeld MJ, Park RD. Res Commun 1992; 187:1551-1557
49	14495G	LHON	Chinnery, P.F., <i>et al.</i> Brain. 2001; 124 (Pt 1): 209-218
50	14498C	LHON	Leo-Kottler, B., <i>et al.</i> German Journal of

			Ophthalmology. 1996; 5 (4): 233-240
51	14568T	LHON	Fausser, S., <i>et al.</i> Ophthalmic Genetics. 2002; 23 (3): 191-197
52	14596A	LHON	De Vries, D.D., <i>et al.</i> American Journal of Human Genetics. 1996; 58 (4): 703-711
53	14787del4	PD MELAS	de Coo, I.F., <i>et al.</i> Annals of Neurology. 1999;45 (1): 130-133
54	15059A	Miopatía mitocondrial	Andreu, A.L., <i>et al.</i> Annals of Neurology. 1999;45 (1): 127-130
55	15150A	Intolerancia al ejercicio	Legros, F., <i>et al.</i> European Journal of Human Genetics. 2001; 9 (7): 510-581
56	15197C	Intolerancia al ejercicio	Legros, F., <i>et al.</i> European Journal of Human Genetics. 2001; 9 (7): 510-581
57	15242A	Encefalomiop atía mitocondrial	Keightley, J.A., <i>et al.</i> American Journal of Human Genetics. 2000; 67 (6): 1400-1410
58	15257A	LHON	Brown MD, <i>et al.</i> Genetics 1992; 130:163-173
59	15615A	Intolerancia al ejercicio	Dumoulin, R., <i>et al.</i> Molecular and Cellular Probes. 1996; 10 (5): 389-391
60	15762A	Miopatía mitocondrial	Andreu, A.L., <i>et al.</i> Neurology. 1998;51 (5): 1444-1447
	Polimor- fismo	Patología asociada	Referencia
1	3394C	LHON	Vittecoq D., <i>et al.</i> Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes 2002; 31 (3): 299-308
2	3635A	LHON	Mitomap (no publicada)
3	4640A	LHON	Mitomap (no publicada)
4	5460A	Enfermedad de Alzheimer	Kosel S., <i>et al.</i> Biochemical and Biophysical Research Communications 1994;203 (2): 745-749
5	11084G	MELAS	Sakuta R., <i>et al.</i> American Journal of Human Genetics 1993;53: 964-965
6	11696G	LHON	Mitomap (no publicada)
7	12026G	Encefalomiop atía mitocondrial	Ikebe S., <i>et al.</i> Molecular Brain Research 1995;28 (2): 281-295
8	15812A	LHON	Rose G., <i>et al.</i> European Journal of Human Genetics 2001;9 (9): 701-707

Para lograr la generalización del diagnóstico molecular de patologías mitocondriales es necesario tipar un alto número de mutaciones y polimorfismos, siendo imprescindible la utilización de tecnologías que nos permitan analizar muchas variantes del ADN mitocondrial simultáneamente y de la manera más rápida, económica y automatizada posible. En la actualidad, existe un gran número de tecnologías disponibles para el genotipado de mutaciones puntuales y polimorfismos de base única ó SNPs (SYVANEN A.C. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. Nat Rev Genet. 2001, Vol 2, N° 12, páginas 930-942).

La elección del método de genotipado adecuado para cada aplicación depende del número de SNPs y muestras que sea necesario analizar, la flexibilidad de la tecnología, el fácil manejo y el coste. Una tecnología prometedora es la de los *chips* o *microarrays* de ADN (SOUTHERN E.M. DNA chips: analysing sequence by hybridization to oligonucleotides on a large scale. Trends Genet. 1996, Vol 12, N° 3, páginas 110-115; HACIA J.G. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide *microarrays*. Nat Genet. 1999, Vol 21, N° 1, páginas 42-47). Los chips de ADN consisten en la disposición ordenada de fragmentos de ADN sobre un soporte sólido mediante su inmovilización o síntesis *in situ*, para su posterior hibridación con el ADN marcado fluorescentemente de la muestra que queremos analizar.

En los últimos años se ha producido un avance importante en el desarrollo de esta tecnología. La mayoría de los métodos de genotipado descritos hasta el momento se basan en tres tipos de reacción: la hibridación con sondas alelo-específicas (ASO, Allelic Specific Oligonucleotide) (HACIA J.G. *op. cited*); minisequenciación (también llamada

Single Base Extensión, SBE) (PASTINEN T. *et. al.* Minisequencing: a specific tool for DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide arrays. *Genome Res.* 1997, Vol 7, N° 6, páginas 606-614); y ligamiento de oligonucleótidos alelo-específicos (OLA, Oligonucleotide Ligation Assay) (GERRY N. P. *et. al.* Universal DNA *microarray* method for multiplex detection of low abundance point mutations. *J Mol Biol.* 1999, Vol 292, N° 2, páginas 251-262). Todos estos métodos pueden ser utilizados con *microarrays*.

El genotipado simultáneo de múltiples SNPs mediante hibridación con sondas ASO resulta difícil y no siempre fiable (WANG D.G., *et. al.* Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science.* 1998 Vol 280, páginas 1077-1082; CHO R.J., *et. al.* Genome-wide mapping with biallelic markers in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Genet.* 1999, Vol. 23, N° 2, páginas 203-207). Sin embargo, los métodos basados en reacciones enzimáticas, como son los otros dos mencionados anteriormente, tienen mayor aceptación como alternativas más específicas que la hibridación con sondas ASO (RAITIO M., *et. al.* Y-chromosomal SNPs in Finno-Ugric-speaking populations analyzed by minisequencing on *microarrays*. *Genome Res.* 2001 Vol 11, N° 3, páginas 471-482; PASTINEN T., *et. al.* A system for specific, high-throughput genotyping by allele-specific primer extension on *microarrays*. *Genome Res.* 2000, Vol 10, páginas 1031-1042; FORTINA P., *et. al.* Simple two-color array-based approach for mutation detection. *Eur J Hum Genet.* 2000, Vol 8, N° 11, páginas 884-894; SOUTHERN E., *et. al.* Molecular interactions on *microarrays*. *Nat Genet.* 1999, Vol 21, N° 1, páginas 5-9).

En las reacciones de minisequenciación una ADN polimerasa es usada para extender el *primer* o cebador, diseñado de tal forma que el extremo 3' es complementario a la base anterior al SNP que queremos analizar. Los cebadores son extendidos con distintos análogos de nucleótidos marcados que son complementarios a los nucleótidos de la base polimórfica. Este método fue descrito en un principio para ser llevado a cabo en placas de microtitulación, donde los productos de PCR eran inmovilizados (SYVANEN A.C., *et. al.* A primer-guided nucleotide incorporation assay in the genotyping of apolipoprotein E. *Genomics* 1990, Vol 8, N° 4, páginas 684-692; SYVANEN A.C., *et. al.* Identification of individuals by analysis of biallelic DNA markers, using PCR and solid-phase minisequencing. *Am J Hum Genet.* 1993, Vol 52, N° 1, páginas 46-59). Más tarde, la minisequenciación fue adaptada a los *microarrays* uniendo el cebador covalentemente a la superficie del *microarray*. Los dideoxinucleótidos (ddNTPs) usados en la extensión estaban marcados con radioactividad o fluorocromos (PASTINEN T., *op. cited*; RAITIO M., *op. cited*).

Una alternativa a estas estrategias de minisequenciación es el uso de oligonucleótidos genéricos denominados *cTags* que son inmovilizadas sobre la superficie del *microarray* en lugar de los *primers* o cebadores. En este caso, los cebadores utilizados en la reacción de minisequenciación finalizan en su extremo 3' en la base anterior a la posición polimórfica, y en el extremo 5' tienen una cola o *tag* de unos 25-27 nucleótidos, que son complementarias a las *cTags* que constituyen el *microarray*. Estas colas son secuencias no homólogas con el genoma humano con temperaturas de *melting* similares, lo que facilita la hibridación. La reacción de minisequenciación tiene lugar en un termociclador mediante la incorporación de dideoxinucleótidos marcados con distintos fluorocromos, de forma que podamos detectar que base se ha incorporado. A continuación, el producto de la minisequenciación se hibrida con el *microarray* para genotipar todos los SNPs, identificando la base incorporada en cada una de las posiciones del *microarray* (Figura 1).

El uso de *tag-primers* fue descrito por primera vez para el análisis de la expresión génica en levaduras mediante PCR (SHOEMAKER D.D., *et. al.* Quantitative phenotypic analysis of yeast deletion mutants using a highly parallel molecular bar-coding strategy. *Nat Genet.* 1996, Vol 14, N° 4, páginas 450-456) y ha sido aplicada más tarde para el genotipado de SNPs mediante minisequenciación con micropartículas (CAI H., *et. al.* Flow cytometry-based minisequencing: a new platform for high-throughput single-nucleotide polymorphism scoring. *Genomics* 2000, Vol. 66, N° 2, páginas 135-143), en los chips de alta densidad de Affymetrix (GenFlex™ array) (FAN J.B., *et. al.* Parallel genotyping of human SNPs using generic high-density oligonucleotide tag arrays. *Genome Res.* 2000, Vol 10, N° 6, páginas 853-860) y en los chips de media densidad (HIRSCHHORN J.N., *et. al.* SBE-TAGS: an array-based method for efficient single-nucleotide polymorphism genotyping. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000, Vol 97, N° 22, páginas 12164-12169).

Esta última estrategia denominada SBE-TAGs (Single Base Extensión con Tags) nos permite tipar al mismo tiempo un gran número de SNPs porque además de ser un método enzimático, y por lo tanto mucho más específico que las sondas ASO, el uso de *Tags* con temperaturas de *melting* similares, facilita en gran medida la hibridación de los productos de la reacción de minisequenciación con el *microarray*. El hecho de que el *microarray* esté constituido por las *cTags*, en lugar de por cebadores específicos de cada locus, nos permite que el mismo *microarray* pueda ser utilizado para distintos grupos de marcadores, teniendo que cambiar únicamente los cebadores que se utilizan en la reacción de minisequenciación que tiene lugar en el termociclador.

Para la minisequenciación con *microarrays* pueden estar los cuatro ddNTPs marcados con el mismo fluorocromo y usarse en reacciones separadas, o bien cada uno de ellos marcado con un fluorocromo distinto, y llevarse a cabo una única reacción. Por un lado, resulta más ventajoso el uso de cuatro fluorocromos distintos porque únicamente es necesaria una reacción de minisequenciación. Sin embargo puede ser necesario separar las reacciones cuando puede existir interferencia entre los cebadores específicos, como es el caso de SNPs muy próximos (1 a 20 pares de bases de separación). Por otro lado, si usamos un solo fluorocromo estamos facilitando la posibilidad de usar esta tecnología en un mayor número de laboratorios, ya que se puede usar un escáner que lea únicamente para dos longitudes de onda, como pueden ser los que se dedican al análisis de expresión génica. Antes de la reacción de minisequenciación ha de llevarse a cabo una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (MULLIS K.B., FALOONA F.A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987, Vol 155, páginas 335-350) para amplificar los fragmentos de ADN que contienen los SNPs de interés.

En el chip de ADN de la invención se puede aplicar el concepto de “*array de arrays*” (PASTINEN T. *op. cited* 2000), que nos permitiría hibridar simultáneamente los productos de reacciones de minisequenciación de varias muestras sobre el mismo soporte al utilizar un molde de silicona que forma pocillos de hibridación independientes (Figura 2). Esto permite a su vez una gran capacidad a la hora de incluir mutaciones y polimorfismos nuevos para esta y otras patologías mitocondriales.

El objeto de la propuesta de invención consiste en un chip y un procedimiento que nos permita genotipar simultáneamente las mutaciones responsables de la Neuropatía Óptica de Leber, así como otras mutaciones y polimorfismos asociados. La novedad de la invención estriba en el hecho de proporcionar al usuario la secuencia de los *primers* o cebadores que permiten identificar el alelo de cada mutación y su posterior detección mediante *microarrays*. El procedimiento utilizado se caracteriza por la facilidad con que son detectados todos los marcadores seleccionados simultáneamente, lo que supone un gran ahorro de tiempo, reactivos y de muestra de partida para realizar el análisis. Este último punto es de gran importancia, tanto en diagnóstico molecular, donde la muestra de partida suele estar limitada, como en estudios de genética de poblaciones, en los que se trabaja muchas veces con muestras muy valiosas y difíciles de conseguir.

Modo de realización

La presente invención describe un chip y un procedimiento para el genotipado de las mutaciones responsables de la Neuropatía Óptica de Leber, mediante una reacción de minisequenciación combinada con el uso de *microarrays*. El procedimiento se caracteriza por:

- la amplificación de los fragmentos de ADN mitocondrial que contienen las mutaciones de interés mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- La determinación de la base implicada en la mutación mediante una reacción de minisequenciación empleando *primers* o cebadores que en su extremo 5' portan una cola (*Tag*)
- y por la detección de los productos de la minisequenciación mediante la hibridación de los mismos con un *microarray* previamente fabricado con las secuencias complementarias a las colas (*cTags*) situadas en el extremo 5' de los cebadores de la minisequenciación.

El procedimiento consta de las etapas que se detallan a continuación y que se muestran en la Figura 3.

1. Fabricación de los *microarrays*.
2. Amplificación del ADN mitocondrial en 3 fragmentos mediante PCR larga.
3. Comprobación de la amplificación.
4. Mezcla de los productos de las PCRs larga.
5. Purificación de los productos de PCR.
6. Reacción de minisequenciación o *Single Base Extensión* (SBE).
7. Hibridación de los productos de la reacción de minisequenciación con el *microarray*.
8. Escaneado del *microarray*.
9. Análisis de los resultados mediante un software de análisis de imagen.
10. Interpretación de los resultados.

A continuación se describe detalladamente cada una de las etapas anteriores:

1. Fabricación de los *microarrays*

Los *microarrays* son fabricados con un robot o “*arrayer*” que deposita de forma ordenada y precisa sobre un soporte sólido los oligonucleótidos (*cTags*) complementarios a las *tags* que van unidas a los extremos 5' de los *primers* o cebadores de minisequenciación. Estos oligonucleótidos se unen al soporte sobre el que se fabrican los *microarrays* por el extremo 3'. Para esta unión, dependiendo del tipo de soporte sobre el que se depositen, será necesario que en dicho extremo porten una modificación.

El sistema, al ser de una gran flexibilidad, permite la fabricación de gran variedad de chips de mutaciones a partir de una librería de secuencias específicas. Para las mutaciones y polimorfismos incluidos en la Tabla 1 hemos comprobado el funcionamiento en la práctica de una serie de secuencias *cTag*. En la Tabla 2 se muestra que *cTag* es usada para detectar cada mutación y polimorfismo y su correspondencia con las secuencias recogidas en la Lista de secuencias.

ES 2 308 868 A1

TABLA 2

	Mutación	cTag
5	1 3243G	SEC. ID. N°: 1
	2 3256T	SEC. ID. N°: 2
	3 3271C	SEC. ID. N°: 3
	4 3291C	SEC. ID. N°: 4
10	5 3316A	SEC. ID. N°: 5
	6 3397G	SEC. ID. N°: 6
	7 3460A	SEC. ID. N°: 7
	8 3496T	SEC. ID. N°: 8
15	9 3497T	SEC. ID. N°: 9
	10 4136G	SEC. ID. N°: 10
	11 4160C	SEC. ID. N°: 11
	12 4216C	SEC. ID. N°: 12
20	13 4917G	SEC. ID. N°: 13
	14 5244A	SEC. ID. N°: 14
	15 5920A	SEC. ID. N°: 15
	16 6930A	SEC. ID. N°: 16
25	17 7444A	SEC. ID. N°: 17
	18 7587C	SEC. ID. N°: 18
	19 7671A	SEC. ID. N°: 19
	20 7896A	SEC. ID. N°: 20
30	21 8042del2	SEC. ID. N°: 21
	22 8344G	SEC. ID. N°: 22
	23 8356C	SEC. ID. N°: 23
35	24 8993C	SEC. ID. N°: 24
	25 8993G	SEC. ID. N°: 25
	26 9101C	SEC. ID. N°: 26
	27 9176C	SEC. ID. N°: 27
40	28 9176G	SEC. ID. N°: 28
	29 9438A	SEC. ID. N°: 29
	30 9537insC	SEC. ID. N°: 30
	31 9738T	SEC. ID. N°: 31
45	32 9804A	SEC. ID. N°: 32
	33 9952A	SEC. ID. N°: 33
	34 9957C	SEC. ID. N°: 34
	35 10191C	SEC. ID. N°: 13
50	36 10663C	SEC. ID. N°: 35
	37 11778A	SEC. ID. N°: 36
	38 11832A	SEC. ID. N°: 37
	39 13513A	SEC. ID. N°: 38
55	40 13514G	SEC. ID. N°: 39
	41 13528G	SEC. ID. N°: 40
	42 13708A	SEC. ID. N°: 41
60	43 13730A	SEC. ID. N°: 42
	44 14453A	SEC. ID. N°: 14
	45 14459A	SEC. ID. N°: 43
	46 14482A	SEC. ID. N°: 44
65	47 14482G	SEC. ID. N°: 45
	48 14484C	SEC. ID. N°: 46
	49 14495G	SEC. ID. N°: 47
	50 14498C	SEC. ID. N°: 48

ES 2 308 868 A1

51	14568T	SEC. ID. N°: 49
52	14596T	SEC. ID. N°: 50
53	14787del4	SEC. ID. N°: 51
54	15059A	SEC. ID. N°: 52
55	15150A	SEC. ID. N°: 53
56	15197C	SEC. ID. N°: 54
57	15242A	SEC. ID. N°: 55
58	15257A	SEC. ID. N°: 12
59	15615A	SEC. ID. N°: 56
60	15762A	SEC. ID. N°: 57
	Polimorfismo	cTag
1	3394C	SEC. ID. N°: 58
2	3635A	SEC. ID. N°: 59
3	4640A	SEC. ID. N°: 60
4	5460A	SEC. ID. N°: 43
5	11084G	SEC. ID. N°: 43
6	11696G	SEC. ID. N°: 58
7	12026G	SEC. ID. N°: 33
8	15812A	SEC. ID. N°: 61

Para el chip de diagnóstico de la Neuropatía Óptica de Leber, que comprende las mutaciones G11778A, T14484C y A3460G (primarias) y las mutaciones y polimorfismos asociados 3316A, 3496T, 3497T, 4136G, 4160C, 4216C, 4917G, 5244A, 7444A, 9101C, 9438A, 9738T, 9804A, 10663C, 13528G, 13708A, 13730A, 14459A, 14482A, 14482G, 14495G, 14498C, 14568T, 14596A, 15257A, 3394C, 3635A, 4640A y 11696G, se han empleado las secuencias cTag siguientes: Sec. ID. N°: 5, Sec. ID. N°: 7, Sec. ID. N°: 8, Sec. ID. N°: 9, Sec. ID. N°: 10, Sec. ID. N°: 11, Sec. ID. N°: 12, Sec. ID. N°: 13, Sec. ID. N°: 14, Sec. ID. N°: 17, Sec. ID. N°: 26, Sec. ID. N°: 27, Sec. ID. N°: 28, Sec. ID. N°: 29, Sec. ID. N°: 31, Sec. ID. N°: 32, Sec. ID. N°: 35, Sec. ID. N°: 36, Sec. ID. N°: 40, Sec. ID. N°: 41, Sec. ID. N°: 42, Sec. ID. N°: 43, Sec. ID. N°: 44, Sec. ID. N°: 45, Sec. ID. N°: 46, Sec. ID. N°: 47, Sec. ID. N°: 48, Sec. ID. N°: 49, Sec. ID. N°: 50, Sec. ID. N°: 12, Sec. ID. N°: 58, Sec. ID. N°: 59, Sec. ID. N°: 60 y Sec. ID. N°: 58.

Los *microarrays* son fabricados según el modelo de “*array de arrays*”. Esto consiste en que sobre un mismo portaobjetos se depositan las *cTags* necesarias en distintas posiciones del portaobjetos, de forma que el mismo *array* (que pasaremos a llamarle *subarray*) está repetido varias veces. Cada muestra, para tipar las 32 mutaciones y polimorfismos, necesita emplear tres *subarrays*. Usando un molde de silicona y una cámara de hibridación adecuados, que nos permitan aislar cada uno de los *subarrays*, podremos hibridar, simultáneamente sobre el mismo portaobjetos, varias muestras, con el consiguiente ahorro de tiempo y dinero.

En la Figura 2 se muestra la disposición de cada *subarray*, así como un ejemplo de una posible distribución de las mutaciones (aunque sobre el *microarray* está unida la *cTag* correspondiente a cada mutación).

2. Amplificación de los 3 fragmentos de ADN mitocondrial mediante PCR larga

El ADN mitocondrial se somete a la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con objeto de obtener la cantidad suficiente de cada fragmento de ADN de manera que sea posible la detección de todas mutaciones que presenta cada individuo. Una ventaja de esta estrategia es que permitiría detectar cualesquiera mutaciones en genoma mitocondrial, no solamente las de la Neuropatía Óptica de Leber, sin necesidad de nuevas PCRs. Los cebadores y la reacción de amplificación utilizados se describen en las Tablas 3 y 4.

ES 2 308 868 A1

TABLA 3

	Cebadores		Tamaño producto de la PCR (pb)	Conc. (μM)
	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')		
5				
10	MT1 SEC. ID. N°: 188	SEC. ID. N°: 189	4000	0.15
	MT2 SEC. ID. N°: 190	SEC. ID. N°: 191	4000	0.15
15	MT3 SEC. ID. N°: 192	SEC. ID. N°: 193	4000	0.15

TABLA 4

Reactivos	[Final]	Programa
Tampón (10X Expand buffer)	1x	94°C 2 minutos 94°C 10 segundos 10 ciclos 60°C 30 segundos 68°C 4 minutos 94°C 10 segundos 20 ciclos 60°C 30 segundos* 68°C 4 minutos 65°C 15 minutos * 15 segundos incremento por ciclo
dNTPs	350 μM	
Cebadores	ver Tabla 5	
ADN polimerasa ^a	2 U	
ADN	10 ng	
H ₂ O	Hasta 25 μL	

^a Expand Long Template PCR System (Roche)

55 Las PCR largas se llevaron a cabo en 25 μL de volumen final. Para su realización se preparan dos premixes que se mezclan en el momento de introducir las en el termociclador:

60	<u>Premix I:</u>	<u>Premix II:</u>
	ADN	10x Tampón de reacción
	Cebadores	Enzima
	dNTPs	Agua
65	Agua	

ES 2 308 868 A1

3. Comprobación de la amplificación

La eficacia de la amplificación puede ser comprobada con cualquier técnica apropiadas aunque por el tamaño de los fragmentos amplificados se recomienda el uso de geles de agarosa al 1%. Para comprobar los tamaños de los fragmentos amplificados se utiliza un marcador de peso molecular.

10

En esta etapa ya se pueden detectar en ciertos casos mutaciones por duplicación o delección del genoma mitocondrial, como la delección común de 5 Kb en el Síndrome de Kearns-Sayre, al desaparecer fragmentos o aparecer fragmentos de distinto tamaño (mayores o menores respectivamente) al de los controles.

4. Mezcla de los productos de las PCRs largas y alternativamente concentración del ADN mediante evaporación

Se procede a la concentración de la mezcla de los productos de PCR evaporando la muestra mediante incubación a 37°C hasta obtener un volumen final suficiente para llevar a cabo la reacción de minisequenciación.

Este paso solamente es necesario si la cantidad de material de partida es muy escaso y se requiere concentración de la muestra. Como sólo se emplean 5 fragmentos de ADN amplificado no es necesario mezclar y concentrar los productos de las PCRs para evitar que cada fragmento de ADN amplificado quede muy diluido como en otros *arrays* basados en multiplex.

20

5. Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR deben ser purificados para eliminar los posibles restos de cebadores y dNTPs de la PCR para evitar que interfieran en la reacción de minisequenciación. Esto puede realizarse con cualquier método apropiado para esta aplicación.

6. Reacción de minisequenciación o *Single Base Extensión* (SBE)

La minisequenciación se lleva a cabo en tres reacciones para las 32 mutaciones y polimorfismos, siempre a partir de los tres productos de PCR previamente mezclados. Los cebadores de estas reacciones se han diseñado de manera que el extremo 3' del cebador sea complementario a la base anterior a la mutación o polimorfismo. Al existir mutaciones muy próximas es necesario separar ambas reacciones para impedir competencia entre los cebadores. En otros casos este problema se soluciona al disponer el cebador de la primera mutación en sentido *sense* y el de la segunda en *antisense*. La región de ADN mitocondrial comprendida entre los nucleótidos 14453 y 14498 es especialmente compleja pues acumula 7 mutaciones, lo que ha obligado a introducir una tercera reacción. De esta manera, en las tres reacciones de minisequenciación, el cebador se extenderá con el dideoxinucleótido (ddNTP) complementario a la base mutada o polimórfica. Detectando el ddNTP que ha sido añadido podremos determinar el alelo de dicha mutación. Además, el cebador porta en el extremo 5' una cola (*tag*) o secuencia no homologa a secuencias humanas, cuya función es la de permitir la hibridación con el *microarray* (Figura 2). Cada mutación o polimorfismo tiene su propia *tag* para una mezcla de reacción dada. Las tres mezclas de reacción hibridan en *subarrays* o cámaras específicas dentro del chip. Entre *subarrays* se pueden compartir *cTags*, con el correspondiente ahorro de material.

45

Para el diseño de los cebadores se utilizó un software propio (OligoTags) de forma que la temperatura de *melting* de todos los cebadores fuese similar para facilitar la minisequenciación de todos los marcadores en la misma reacción. La posible formación de estructuras secundarias en los cebadores ha sido comprobada con el software OligoTags.

Para todas las mutaciones listadas en la Tabla 1 se han comprobado experimentalmente el funcionamiento de distintos cebadores de minisequenciación, tanto en la amplificación como en la hibridación a sus correspondientes *cTags* listadas en la Tabla 2. En la Tabla 5 se muestra la correspondencia entre cada una de las partes de los cebadores de minisequenciación de cada mutación y polimorfismo con las secuencias recogidas en la Lista de secuencias.

55

60

65

ES 2 308 868 A1

TABLA 5

	Mutaciones	Cebadores de minisequenciación	
		<i>tag</i>	Parte específica
1	3243G	SEC. ID. N°: 62	SEC. ID. N°: 123
2	3256T	SEC. ID. N°: 63	SEC. ID. N°: 124
3	3271C	SEC. ID. N°: 64	SEC. ID. N°: 125
4	3291C	SEC. ID. N°: 65	SEC. ID. N°: 126
5	3316A	SEC. ID. N°: 66	SEC. ID. N°: 127
6	3397G	SEC. ID. N°: 67	SEC. ID. N°: 128
7	3460A	SEC. ID. N°: 68	SEC. ID. N°: 129
8	3496T	SEC. ID. N°: 69	SEC. ID. N°: 130
9	3497T	SEC. ID. N°: 70	SEC. ID. N°: 131
10	4136G	SEC. ID. N°: 71	SEC. ID. N°: 132
11	4160C	SEC. ID. N°: 72	SEC. ID. N°: 133
12	4216C	SEC. ID. N°: 73	SEC. ID. N°: 134
13	4917G	SEC. ID. N°: 74	SEC. ID. N°: 135
14	5244A	SEC. ID. N°: 75	SEC. ID. N°: 136
15	5920A	SEC. ID. N°: 76	SEC. ID. N°: 137
16	6930A	SEC. ID. N°: 77	SEC. ID. N°: 138
17	7444A	SEC. ID. N°: 78	SEC. ID. N°: 139
18	7587C	SEC. ID. N°: 79	SEC. ID. N°: 140
19	7671A	SEC. ID. N°: 80	SEC. ID. N°: 141
20	7896A	SEC. ID. N°: 81	SEC. ID. N°: 142
21	8042del2	SEC. ID. N°: 82	SEC. ID. N°: 143
22	8344G	SEC. ID. N°: 83	SEC. ID. N°: 144
23	8356C	SEC. ID. N°: 84	SEC. ID. N°: 145
24	8993C	SEC. ID. N°: 85	SEC. ID. N°: 146
25	8993G	SEC. ID. N°: 86	SEC. ID. N°: 146
26	9101C	SEC. ID. N°: 87	SEC. ID. N°: 147
27	9176C	SEC. ID. N°: 88	SEC. ID. N°: 148
28	9176G	SEC. ID. N°: 89	SEC. ID. N°: 148
29	9438A	SEC. ID. N°: 90	SEC. ID. N°: 149
30	9537insC	SEC. ID. N°: 91	SEC. ID. N°: 150
31	9738T	SEC. ID. N°: 92	SEC. ID. N°: 151
32	9804A	SEC. ID. N°: 93	SEC. ID. N°: 152
33	9952A	SEC. ID. N°: 94	SEC. ID. N°: 153
34	9957C	SEC. ID. N°: 95	SEC. ID. N°: 154
35	10191C	SEC. ID. N°: 74	SEC. ID. N°: 155

ES 2 308 868 A1

36	10663C	SEC. ID. N°: 96	SEC. ID. N°: 156
37	11778A	SEC. ID. N°: 97	SEC. ID. N°: 157
38	11832A	SEC. ID. N°: 98	SEC. ID. N°: 158
39	13513A	SEC. ID. N°: 99	SEC. ID. N°: 159
40	13514G	SEC. ID. N°: 100	SEC. ID. N°: 160
41	13528G	SEC. ID. N°: 101	SEC. ID. N°: 161
42	13708A	SEC. ID. N°: 102	SEC. ID. N°: 162
43	13730A	SEC. ID. N°: 103	SEC. ID. N°: 163
44	14453A	SEC. ID. N°: 113	SEC. ID. N°: 164
45	14459A	SEC. ID. N°: 75	SEC. ID. N°: 165
46	14482A	SEC. ID. N°: 104	SEC. ID. N°: 166
47	14482G	SEC. ID. N°: 105	SEC. ID. N°: 166
48	14484C	SEC. ID. N°: 106	SEC. ID. N°: 167
49	14495G	SEC. ID. N°: 107	SEC. ID. N°: 168
50	14498C	SEC. ID. N°: 108	SEC. ID. N°: 169
51	14568T	SEC. ID. N°: 109	SEC. ID. N°: 170
52	14596T	SEC. ID. N°: 110	SEC. ID. N°: 171
53	14787del4	SEC. ID. N°: 111	SEC. ID. N°: 172
54	15059A	SEC. ID. N°: 113	SEC. ID. N°: 173
55	15150A	SEC. ID. N°: 114	SEC. ID. N°: 174
56	15197C	SEC. ID. N°: 115	SEC. ID. N°: 175
57	15242A	SEC. ID. N°: 116	SEC. ID. N°: 176
58	15257A	SEC. ID. N°: 73	SEC. ID. N°: 177
59	15615A	SEC. ID. N°: 117	SEC. ID. N°: 178
60	15762A	SEC. ID. N°: 118	SEC. ID. N°: 179
	Polimorfismos		
1	3394C	SEC. ID. N°: 119	SEC. ID. N°: 180
2	3635A	SEC. ID. N°: 120	SEC. ID. N°: 181
3	4640A	SEC. ID. N°: 121	SEC. ID. N°: 182
4	5460A	SEC. ID. N°: 104	SEC. ID. N°: 183
5	11084G	SEC. ID. N°: 104	SEC. ID. N°: 184
6	11696G	SEC. ID. N°: 119	SEC. ID. N°: 185
7	12026G	SEC. ID. N°: 94	SEC. ID. N°: 186
8	15812A	SEC. ID. N°: 122	SEC. ID. N°: 187

Para el diagnóstico de la Neuropatía Óptica de Leber se emplean las siguientes secuencias: 3316A (SEC. ID. N°: 66 + SEC. ID. N°: 127); 3460A (SEC. ID. N°: 68 + SEC. ID. N°: 129); 3496T (SEC. ID. N°: 69 + SEC. ID. N°: 130); 3497T (SEC. ID. N°: 70 + SEC. ID. N°: 131); 4136G (SEC. ID. N°: 71 + SEC. ID. N°: 132); 4160C (SEC. ID. N°: 72 + SEC. ID. N°: 133); 4216C (SEC. ID. N°: 73 + SEC. ID. N°: 134); 4917G (SEC. ID. N°: 74 + SEC. ID. N°: 135); 5244A (SEC. ID. N°: 75 + SEC. ID. N°: 136); 7444A (SEC. ID. N°: 78 + SEC. ID. N°: 139); 9101C (SEC. ID. N°: 87 + SEC. ID. N°: 147); 9176C (SEC. ID. N°: 88 + SEC. ID. N°: 148); 9176G (SEC. ID. N°: 89 + SEC. ID. N°: 148); 9438A (SEC. ID. N°: 90 + SEC. ID. N°: 149); 9738T (SEC. ID. N°: 92 + SEC. ID. N°: 151); 9804A (SEC. ID. N°: 93 + SEC. ID. N°: 152); 10663C (SEC. ID. N°: 96 + SEC. ID. N°: 156); 11778A (SEC. ID. N°: 97 + SEC. ID. N°: 157); 13528G (SEC. ID. N°: 101 + SEC. ID. N°: 161); 13708A (SEC. ID. N°: 102 + SEC. ID. N°: 162); 13730A (SEC. ID. N°: 103 + SEC. ID. N°: 163); 14459A (SEC. ID. N°: 75 + SEC. ID. N°: 165); 14482A (SEC. ID. N°: 104 + SEC. ID. N°: 166); 14482G (SEC. ID. N°: 105 + SEC. ID. N°: 166); 14484C (SEC. ID. N°: 106 + SEC. ID. N°: 167); 14495G (SEC. ID. N°: 107 + SEC. ID. N°: 168); 14498C (SEC. ID. N°: 108 + SEC. ID. N°: 169); 14568T (SEC. ID. N°: 109 + SEC. ID. N°: 170); 14596T (SEC. ID. N°: 110 + SEC. ID. N°: 171); 15257A (SEC. ID. N°: 73 + SEC. ID. N°: 177); 3394C (SEC. ID. N°: 119 + SEC. ID. N°: 180); 3635A (SEC. ID. N°: 120 + SEC. ID. N°: 181); 4640A (SEC. ID. N°: 121 + SEC. ID. N°: 182); 11696G (SEC. ID. N°: 119 + SEC. ID. N°: 185).

La minisequenciación se puede llevar a cabo bien utilizando los cuatro ddNTPs, marcados cada uno de ellos con un fluorocromo distinto, o bien, utilizando el mismo fluorocromo para los cuatro ddNTPs. En el primer caso se realizan tres reacciones de minisequenciación por muestra, a la que se añaden los cuatro ddNTPs con marcajes distintos; mientras que en el segundo caso serían necesarias doce reacciones de minisequenciación por muestra, teniendo cada una de ellas uno de los cuatro ddNTPs marcado y los otros tres sin marcar (en realidad, y dado que la tercera reacción de minisequenciación comprende sólo dos mutaciones ambas las cuales incorporan únicamente ddTTP y ddCTP, sólo son necesarios diez reacciones, ver Figura 2). Utilizando *microarrays* constituidos por varios *subarrays* (Figura 2), en el caso de reacciones con cuatro fluorocromos distintos podremos analizar un número de muestras cuatro veces superior por *microarray* al que analizaríamos con un único fluorocromo. Por otro lado, la posibilidad de usar un único fluorocromo hace esta técnica más flexible, permitiendo que se pueda realizar en laboratorios que no disponen de escáner que lea a cuatro longitudes de onda distintas.

7. *Hibridación de los productos de la reacción de minisequenciación con el microarray*

Los productos de la reacción de minisequenciación son hibridados con el *microarray*. Las colas (*tag*) situadas en el extremo 5' de los cebadores de minisequenciación hibridarán con las secuencias reversas y complementarias de dichas colas (*cTag*) que constituyen el *microarray* (Figura 1 y Figura 2). Para hibridar de forma independiente cada *subarray* se utiliza un molde de silicona que nos permite aislar cada *subarray* de los demás, formando cámaras de hibridación independientes para cada uno de ellos. El producto de cada reacción de minisequenciación es añadido a la cámara de hibridación que le corresponda por su situación sobre el *microarray*. La hibridación tiene lugar a 42°C durante 180 minutos. Transcurrido este tiempo se procede a lavar el *microarray* para retirar los restos de los productos de las reacciones de minisequenciación que no se han unido.

8. *Escaneado del microarray*

El *microarray* se escanea para detectar en que posiciones del *microarray* hay fluorescencia. Esto se realiza siguiendo las instrucciones del escáner usado en cada caso. Cuando la minisequenciación se ha hecho con los cuatro ddNTPs marcados con el mismo fluorocromo, solamente es necesario leer a la longitud de onda de dicho fluorocromo. Sin embargo, si hemos utilizado cuatro marcajes distintos deberemos escanear el *microarray* para cada una de las longitudes de onda de los fluorocromos.

9. *Análisis de los resultados mediante un software de análisis de imagen*

Las imágenes obtenidas con el escáner deben ser analizadas para cuantificar la fluorescencia en cada uno de los puntos del *microarray*. Esto se puede realizar con cualquier software apropiado para esta aplicación.

10. *Interpretación de los resultados*

En la Tabla 6 se muestran los alelos descritos para cada uno de las mutaciones y polimorfismos asociados a la Neuropatía Óptica de Leber, así como el ddNTP incorporado en reacción de minisequenciación, que no siempre coincide con los alelos descritos, ya que depende de la dirección de diseño del primer.

TABLA 6

		Alelos		ddNTP incorporado	
		normal	mutado	normal	mutado
1	3316A	G	A	G	A
2	3460A	G	A	G	A
3	3496T	G	T	G	T
4	3497T	C	T	C	T

ES 2 308 868 A1

5	4136G	A	G	T	C
6	4160C	T	C	T	C
7	4216C	T	C	T	C
8	4917G	A	G	T	C
9	5244A	G	A	G	A
10	7444A	G	A	C	T
11	9101C	T	C	T	C
12	9438A	G	A	C	T
13	9738T	G	T	C	A
14	9804A	G	A	C	T
15	10663C	T	C	A	G
16	11778A	G	A	G	A
17	13528G	A	G	A	G
18	13708A	G	A	C	T
19	13730A	G	A	G	A
20	14459A	G	A	G	A
21	14482A	C	A	G	T
22	14482G	C	G	G	C
23	14484C	T	C	T	C
24	14495G	A	G	A	G
25	14498C	T	C	T	C
26	14568T	A	T	A	T
27	14596T	A	T	T	A
28	15257A	G	A	G	A
29	3394C	T	C	A	G
30	3635A	G	A	C	T
31	4640A	C	A	C	A
32	11696G	G	G	G	G

El siguiente ejemplo sirve para ilustrar la invención y no debe ser considerado como limitativo del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Diagnóstico de una Neuropatía Óptica de Leber (LHON)

El siguiente ejemplo ilustra como usar “Mito Chip” en un laboratorio de diagnóstico molecular o de genética clínica.

Se reciben en el laboratorio una muestra de sangre procedente de un paciente con sospecha clínica de una Neuropatía Óptica de Leber.

1. Fabricación del microarray

Se prepara una placa de 96 ó 384 pocillos con las *cTags* con las que se va a fabricar el *microarray* (Sec. ID. N°: 5, Sec. ID. N°: 7, Sec. ID. N°: 8, Sec. ID. N°: 9, Sec. ID. N°: 10, Sec. ID. N°: 11, Sec. ID. N°: 12, Sec. ID. N°: 13, Sec. ID. N°: 14, Sec. ID. N°: 17, Sec. ID. N°: 26, Sec. ID. N°: 27, Sec. ID. N°: 28, Sec. ID. N°: 29, Sec. ID. N°: 31, Sec. ID. N°: 32, Sec. ID. N°: 35, Sec. ID. N°: 36, Sec. ID. N°: 40, Sec. ID. N°: 41, Sec. ID. N°: 42, Sec. ID. N°: 43, Sec. ID. N°: 44, Sec. ID. N°: 45, Sec. ID. N°: 46, Sec. ID. N°: 47, Sec. ID. N°: 48, Sec. ID. N°: 49, Sec. ID. N°: 50, Sec. ID. N°: 12, Sec. ID. N°: 58, Sec. ID. N°: 59, Sec. ID. N°: 60 y Sec. ID. N°: 58 de la Lista de secuencias) para que el robot las pueda recoger y depositar sobre el soporte sólido, según se muestra en la Figura 2. Se utilizaron como soporte los “CodeLink Activated Slides” de Amersham Biosciences, y el Arrayer 417 de Affymetrix como robot. Las *cTags*

ES 2 308 868 A1

se diluyeron en tampón de impresión (fosfato sódico pH 8.5, 50 mM) hasta una concentración de 20 μ M. Las *cTags* tienen en el extremo 3' un grupo amino que se va a unir covalentemente a la superficie de los "CodeLink Activated Slides". Una vez que se han depositado las *cTags* sobre los portaobjetos se dejan secar de 4 a 72 horas.

5 A continuación es necesario bloquear los grupos amino-reactivos de la superficie del *microarray* a la que no se han unido las *cTags*. Esto se lleva a cabo mediante una serie de pasos que consisten en:

a) Colocar los *microarrays* en un tubo tipo Falcon de 50 mL y añadir la solución de bloqueo (0.1 M Tris, 50 mM etanolamina, pH 9.0) precalentada a 50°C durante 30 minutos.

10

b) Tirar la solución de bloqueo.

c) Enjuagar los *microarrays* dos veces con agua destilada.

15

d) Lavar los *microarrays* con 4x SSC (NaCl 0.6 M, citrato sódico 0.06 M), 0.1% SDS (dodecil sulfato sódico) (precalentado a 50°C) durante 30 minutos con agitación.

e) Tirar la solución de lavado y enjuagar con agua destilada.

20

f) Centrifugar los *microarrays* a 800 r.p.m. durante 3 minutos. Para ello los *microarrays* se colocan en una caja para portaobjetos y esta caja se centrifuga en una centrífuga de placas, o bien, se meten los *microarrays* en tubos Falcon de 50 mL y se centrifugan en una centrífuga con un rotor para este tipo de tubos.

g) Se guardan a temperatura ambiente hasta que vayan a ser usados.

25

En este ejemplo se ha utilizado un *microarray*. El Arrayer 417 de Affymetrix permite fabricar hasta 42 *microarrays*, que pueden ser guardados hasta su uso (10 meses en el caso de los "CodeLink Activated Slides").

30 2. Extracción del ADN de la muestra de sangre

La extracción del ADN de la muestra se puede realizar por cualquier método de extracción o utilizando cualquier kit de extracción apropiado para este tipo de muestras. Al amplificarse únicamente 3 fragmentos de ADN mitocondrial la cantidad de muestra necesaria es muy pequeña (unos 10 microlitros de ADN a una concentración de entre 100 y 35 200 nanogramos/microlitro es más que suficiente), con el consiguiente ahorro de muestra. De hecho todo el análisis se puede realizar con unas pocas gotas de sangre (< 300 microlitros de sangre total).

40 3. Amplificación de los fragmentos

Una vez extraído el ADN de la sangre, se procede a amplificar los 3 fragmentos del ADN mitocondrial. Esto se hace según el protocolo descrito anteriormente empleando el sistema "Expand Long Template PCR" de Roche. En la Tabla 3 se muestran los cebadores de para cada fragmento.

45

Las PCR largas se llevaron a cabo en 25 μ L de volumen final. Las condiciones de las PCRs para los tres fragmentos se muestran en la Tabla 4. Para su realización se preparan dos premixes que se mezclan en el momento de introducirlas en el termociclador, tal y como se ha indicado anteriormente.

50 4. Comprobación de la amplificación

Se comprobó la amplificación mediante electroforesis en geles de agarosa standar al 1%. Los geles se prepararon manualmente en el laboratorio añadiéndose al mismo bromuro de etidio para la visualización del ADN. Su composición es:

55

- 0.3 g de Agarosa DNA Typing Grade

- 30 mL de TAE 1x (Tris Acético EDTA 0.5 M, pH 8.5)

60

- 1.5 μ L de Bromuro de Etidio (10 mg/mL) (concentración final de BrEt de 0.5 mg/mL).

Se carga en el gel 2 μ L del producto de PCR con 10 μ L de Solución de Carga (Tris-Acetato-EDTA pH 8.3, azul de bromofenol, sacarosa y glicerol).

65

La determinación del tamaño de los fragmentos obtenidos se hizo comparando con un marcador de peso molecular (1 Kb DNA Ladder, New England BioLabs).

En esta etapa se puede detectar la presencia de deleciones o duplicaciones.

ES 2 308 868 A1

5. Mezcla de los productos de las 3 PCRs largas

Los productos de las tres reacciones de PCR de cada muestra se mezclan en un único tubo y se dejan evaporando a 37°C hasta llegar a un volumen final de 30 µL.

6. Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR deben ser purificados para eliminar los posibles restos de cebadores y dNTPs de la PCR para evitar que interfieran en la reacción de minisequenciación. Para ello, se añaden 4 µL de Exo-SapIT (Amersham Bioscience) a 10 µL de los productos de PCR mezclados y concentrados, y se incuban a 37°C durante 15 minutos, seguido de otros 15 minutos a 85°C.

7. Reacción de minisequenciación o *Single Base Extensión* (SBE)

En este caso se ha utilizado el mismo fluorocromo para los cuatro ddNTPs y por lo tanto son necesarias diez reacciones por muestra. Cada una de las reacciones se llevó a cabo en un volumen final de 15 µL. Las concentraciones de cada uno de los reactivos se muestran en la Tabla 7. Los 32 cebadores utilizados en la minisequenciación se recogen en la Tabla 5 y son los siguientes: 3316A (SEC. ID. N°: 66 + SEC. ID. N°: 127); 3460A (SEC. ID. N°: 68 + SEC. ID. N°: 129); 3496T (SEC. ID. N°: 69 + SEC. ID. N°: 130); 3497T (SEC. ID. N°: 70 + SEC. ID. N°: 131); 4136G (SEC. ID. N°: 71 + SEC. ID. N°: 132); 4160C (SEC. ID. N°: 72 + SEC. ID. N°: 133); 4216C (SEC. ID. N°: 73 + SEC. ID. N°: 134); 4917G (SEC. ID. N°: 74 + SEC. ID. N°: 135); 5244A (SEC. ID. N°: 75 + SEC. ID. N°: 136); 7444A (SEC. ID. N°: 78 + SEC. ID. N°: 139); 9101C (SEC. ID. N°: 87 + SEC. ID. N°: 147); 9176C (SEC. ID. N°: 88 + SEC. ID. N°: 148); 9176G (SEC. ID. N°: 89 + SEC. ID. N°: 148); 9438A (SEC. ID. N°: 90 + SEC. ID. N°: 149); 9738T (SEC. ID. N°: 92 + SEC. ID. N°: 151); 9804A (SEC. ID. N°: 93 + SEC. ID. N°: 152); 10663C (SEC. ID. N°: 96 + SEC. ID. N°: 156); 11778A (SEC. ID. N°: 97 + SEC. ID. N°: 157); 13528G (SEC. ID. N°: 101 + SEC. ID. N°: 161); 13708A (SEC. ID. N°: 102 + SEC. ID. N°: 162); 13730A (SEC. ID. N°: 103 + SEC. ID. N°: 163); 14459A (SEC. ID. N°: 75 + SEC. ID. N°: 165); 14482A (SEC. ID. N°: 104 + SEC. ID. N°: 166); 14482G (SEC. ID. N°: 105 + SEC. ID. N°: 166); 14484C (SEC. ID. N°: 106 + SEC. ID. N°: 167); 14495G (SEC. ID. N°: 107 + SEC. ID. N°: 168); 14498C (SEC. ID. N°: 108 + SEC. ID. N°: 169); 14568T (SEC. ID. N°: 109 + SEC. ID. N°: 170); 14596T (SEC. ID. N°: 110 + SEC. ID. N°: 171); 15257A (SEC. ID. N°: 73 + SEC. ID. N°: 177); 3394C (SEC. ID. N°: 119 + SEC. ID. N°: 180); 3635A (SEC. ID. N°: 120 + SEC. ID. N°: 181); 4640A (SEC. ID. N°: 121 + SEC. ID. N°: 182); 11696G (SEC. ID. N°: 119 + SEC. ID. N°: 185).

TABLA 7

Reactivos	[Final]	Programa
Tampón	1x	
ddNTPs mix ^{a,b,c,d}	0.5 µM	95°C 3 minutos
Cebadores (Tabla 5)	0.05 µM cada uno	95°C 20 segundos
ADN polimerasa ^e	2 U	55°C 20 segundos
Productos de PCR	2.5 µL	X 35
H ₂ O	Hasta 15 µL	

^a ddATP-Tamra, ddTTP, ddCTP, ddGTP

^b ddATP, ddTTP-Tamra, ddCTP, ddGTP

^c ddATP, ddTTP, ddCTP-Tamra, ddGTP

^d ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP-Tamra

^e Thermosequenase polimerase (Amersham Bioscience)

ES 2 308 868 A1

Por cada muestra se realizaron tres reacciones de minisequenciación, cambiando únicamente las mezclas de cebadores:

- 5 - Mezcla 1: con los cebadores de las mutaciones y polimorfismos 3316A, 3460A, 3496T, 4136G, 4160C, 4216C, 4917G, 5244A, 7444A, 9101C, 9438A, 9738T, 9804A, 10663C, 11778A, 13708A, 13730A, 14482A, 14484C, 14568T, 15257A, 3394C, 3635A, 4640A, 11696G.
- Mezcla 2: con los cebadores de las mutaciones 3497T, 13528G, 14482G, 14498C y 14596T.
- 10 - Mezcla 3: con los cebadores de las mutaciones 14459A y 14495G.

8. Hibridación de los productos de la reacción de minisequenciación con el microarray

15 Se coloca el *microarray* en la cámara de hibridación con la silicona formando las cámaras de hibridación independientes. Se preparan las muestras a hibridar mezclando 7 μL de los productos de la reacción de minisequenciación con el tampón de hibridación (4x SSC, 0.1% SDS) en un volumen final de 15 μL . Se introducen los 15 μL de cada muestra en cada una de las cámaras de hibridación formadas por el molde de silicona. La disposición de las muestras sobre el *microarray* se realiza según la Figura 2, de forma que cada fila representa una muestra y las columnas las reacciones de minisequenciación con uno de los cuatro ddNTP marcados. En este caso, la primera columna son las muestras con ddATP-Tarara, la segunda columna con ddTTP-Tamra, la tercera con ddCTP-Tamra y la cuarta con ddGTP-Tamra. Se deja incubar el *microarray* en un horno de hibridación a 42°C durante 180 minutos, aproximadamente. Pasado este tiempo se retira el *microarray* de la cámara de hibridación y se lava siguiendo los siguientes pasos:

- 25 a) Colocar el *microarray* en un tubo tipo Falcon de 50 mL y enjuagar brevemente con 4x SSC.
- b) Pasar el *microarray* a otro tubo de 50 mL y lavar con 2x SSC y 0.1% SDS a 42°C durante 5 minutos.
- 30 c) Tirar la solución de lavado y repetir el paso b.
- d) Tirar la solución.
- e) Lavar con 0.2x SSC a temperatura ambiente durante 1 minuto. Tirar la solución.
- 35 f) Lavar con 0.1x SSC a temperatura ambiente durante 1 minuto. Tirar la solución.
- g) Centrifugar los *microarrays* a 1000 r.p.m. durante 5 minutos. Para ello los *microarrays* se colocan en una caja para portaobjetos y esta caja se centrifuga en una centrifuga de placas, o bien, se meten los *microarrays* en tubos Falcon de 50 mL y se centrifugan en una centrifuga con un rotor para este tipo de tubos.
- 40 h) Se guardan en la oscuridad hasta ser escaneados.

45 9. Escaneado del microarray

Se escanea el *microarray* a la longitud de onda del fluorocromo utilizado en la reacción de minisequenciación. En este caso hemos usado el “Scanner 418 de Affymetrix”.

50 10. Análisis de los resultados mediante un software de análisis de imagen

Se cuantificó la fluorescencia con el Image 4.1 (BioDiscovery Inc.).

55 11. Interpretación de los resultados

En la Tabla 8 se representan los resultados obtenidos. Dado que los resultados obtenidos a partir de la muestra de sangre del paciente se corresponden para las mutaciones asociadas a la Neuropatía óptica de Leber con la mutación 11778A, considerada patológica, podemos confirmar esta patología. La presencia de dos alelos raros no tiene significación clínica clara y en ausencia de otros datos clínicos de interés no se deben informar.

65

TABLA 8

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55

		Paciente	
		Alelos	
		normal	mutado
1	3316A	G	
2	3460A	G	
3	3496T	G	
4	3497T	C	
5	4136G	T	
6	4160C	T	
7	4216C		C
8	4917G	T	
9	5244A	G	
10	7444A	C	
11	9101C	T	
12	9438A	C	
13	9738T	C	
14	9804A	C	
15	10663C	A	
16	11778A		A
17	13528G	A	
18	13708A	C	
19	13730A	G	
20	14459A	G	
21	14482A	G	
22	14482G	G	
23	14484C	T	
24	14495G	A	
25	14498C	T	
26	14568T	A	
27	14596T	T	
28	15257A	G	
29	3394C	A	
30	3635A	C	
31	4640A	C	
32	11696G	G	

60 **Descripción de las figuras**

Figura 1. Esquema del procedimiento de SBE-Tags para genotipado de variantes de copia única. La reacción de minisequenciación unirá un nucleótido al cebador de minisequenciación específico para cada mutación (A), el cual a su vez se unirá por su cola o Tag a una secuencia complementaria (cTag) fijada al soporte en la fase de hibridación (B). Cada mutación queda fijada a un punto específico del soporte.

ES 2 308 868 A1

Figura 2. Diseño del *microarray*. El rectángulo de la izquierda representa el portaobjetos sobre el que se fabrica el *microarray*. En el interior de este rectángulo hay una matriz de círculos. Cada uno de estos círculos representa un *subarray*. Cada *subarray* está formado por las *cTags* correspondientes a cada SNP (cada uno de los puntos del *subarray*). La situación de cada una de las *cTags* en el *subarray* tiene que ser conocida, aunque puede variar de un *microarray* a otro. En esta figura se muestra una de las disposiciones posibles incluyendo otras mutaciones además de las asociadas a la Neuropatía Óptica de Leber.

Figura 3. Esquema del protocolo a seguir para el genotipado mutaciones y polimorfismos del ADN mitocondrial mediante el procedimiento descrito.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la detección en una muestra biológica de la Neuropatía Óptica de Leber, patología de origen mitocondrial, mediante el uso de secuencias específicas del genoma mitocondrial humano mediante chips de ADN para la detección de la alteración causante de la patología que puede ser alguna de las mutaciones primarias G 11778A, T 14484C y A3460G y de las mutaciones y polimorfismos asociados a la misma: 3316A, 3496T, 3497T, 4136G, 4160C, 4216C, 4917G, 5244A, 7444A, 9101C, 9438A, 9738T, 9804A, 10663C, 13528G, 13708A, 13730A, 14459A, 14482A, 14482G, 14495G, 14498C, 14568T, 14596A, 15257A, 3394C, 3635A, 4640A y 11696G, **caracterizado** por la amplificación del ADN mitocondrial, y la determinación de dichas mutaciones mediante una reacción de minisequenciación o *Single Base Extension* (SBE) utilizando los cebadores de minisequenciación que finalizan en su extremo 3' en la base anterior a la posición alterada y en el extremo 5' portan una cola o *tag* y cuyas secuencias se corresponden con los siguientes identificadores: 3316A (SEQ. ID. N°: 66 + SEQ. ID. N°: 127); 3460A (SEQ. ID. N°: 68 + SEQ. ID. N°: 129); 3496T (SEQ. ID. N°: 69 + SEQ. ID. N°: 130); 3497T (SEQ. ID. N°: 70 + SEQ. ID. N°: 131); 4136G (SEQ. ID. N°: 71 + SEQ. ID. N°: 132); 4160C (SEQ. ID. N°: 72 + SEQ. ID. N°: 133); 4216C (SEQ. ID. N°: 73 + SEQ. ID. N°: 134); 4917G (SEQ. ID. N°: 74 + SEQ. ID. N°: 135); 5244A (SEQ. ID. N°: 75 + SEQ. ID. N°: 136); 7444A (SEQ. ID. N°: 78 + SEQ. ID. N°: 139); 9101C (SEQ. ID. N°: 87 + SEQ. ID. N°: 147); 9176C (SEQ. ID. N°: 88 + SEQ. ID. N°: 148); 9176G (SEQ. ID. N°: 89 + SEQ. ID. N°: 148); 9438A (SEQ. ID. N°: 90 + SEQ. ID. N°: 149); 9738T (SEQ. ID. N°: 92 + SEQ. ID. N°: 151); 9804A (SEQ. ID. N°: 93 + SEQ. ID. N°: 152); 10663C (SEQ. ID. N°: 96 + SEQ. ID. N°: 156); 11778A (SEQ. ID. N°: 97 + SEQ. ID. N°: 157); 13528G (SEQ. ID. N°: 101 + SEQ. ID. N°: 161); 13708A (SEQ. ID. N°: 102 + SEQ. ID. N°: 162); 13730A (SEQ. ID. N°: 103 + SEQ. ID. N°: 163); 14459A (SEQ. ID. N°: 75 + SEQ. ID. N°: 165); 14482A (SEQ. ID. N°: 104 + SEQ. ID. N°: 166); 14482G (SEQ. ID. N°: 105 + SEQ. ID. N°: 166); 14484C (SEQ. ID. N°: 106 + SEQ. ID. N°: 167); 14495G (SEQ. ID. N°: 107 + SEQ. ID. N°: 168); 14498C (SEQ. ID. N°: 108 + SEQ. ID. N°: 169); 14568T (SEQ. ID. N°: 109 + SEQ. ID. N°: 170); 14596T (SEQ. ID. N°: 110 + SEQ. ID. N°: 171); 15257A (SEQ. ID. N°: 73 + SEQ. ID. N°: 177); 3394C (SEQ. ID. N°: 119 + SEQ. ID. N°: 180); 3635A (SEQ. ID. N°: 120 + SEQ. ID. N°: 181); 4640A (SEQ. ID. N°: 121 + SEQ. ID. N°: 182); 11696G (SEQ. ID. N°: 119 + SEQ. ID. N°: 185), para su posterior detección mediante la hibridación de los productos de la reacción de minisequenciación con un *microarray* constituido por las secuencias complementarias a las colas (*cTag*) siguientes: SEQ. ID. N°: 5, SEQ. ID. N°: 7, SEQ. ID. N°: 8, SEQ. ID. N°: 9, SEQ. ID. N°: 10, SEQ. ID. N°: 11, SEQ. ID. N°: 12, SEQ. ID. N°: 13, SEQ. ID. N°: 14, SEQ. ID. N°: 17, SEQ. ID. N°: 26, SEQ. ID. N°: 27, SEQ. ID. N°: 28, SEQ. ID. N°: 29, SEQ. ID. N°: 31, SEQ. ID. N°: 32, SEQ. ID. N°: 35, SEQ. ID. N°: 36, SEQ. ID. N°: 40, SEQ. ID. N°: 41, SEQ. ID. N°: 42, SEQ. ID. N°: 43, SEQ. ID. N°: 44, SEQ. ID. N°: 45, SEQ. ID. N°: 46, SEQ. ID. N°: 47, SEQ. ID. N°: 48, SEQ. ID. N°: 49, SEQ. ID. N°: 50, SEQ. ID. N°: 58, SEQ. ID. N°: 59, SEQ. ID. N°: 60 y SEQ. ID. N°: 58, oligonucleótidos complementarios a las colas que portan los cebadores de minisequenciación en su extremo 5'. Las *cTags* se encuentran unidas al soporte sobre el que se fabrica el *microarray* por el extremo 3'. Dicho procedimiento comprende las siguientes etapas:

- a) Fabricación de los *microarrays*.
- b) Amplificación mediante PCR larga de los fragmentos de ADN que incluyen las mutaciones y polimorfismos seleccionados.
- c) Comprobación de la amplificación.
- d) Mezcla de los productos de PCR y concentración del ADN mediante evaporación.
- e) Purificación de los productos de PCR.
- f) Reacción de minisequenciación o *Single Base Extension* (SBE).
- g) Hibridación de los productos de la reacción de minisequenciación con el *microarray*.
- h) Escaneado del *microarray* a la longitud de onda correspondiente, según los fluorocromos utilizados en la reacción de minisequenciación.
- i) Análisis de los resultados mediante un software de análisis de imagen.
- j) Interpretación de los resultados.

2. El chip de mutaciones, según reivindicación 1, **caracterizado** por estar constituido por los *microarrays* fabricados con las secuencias identificadas en la lista de secuencias como SEQ. ID. N°: 5, SEQ. ID. N°: 7, SEQ. ID. N°: 8, SEQ. ID. N°: 9, SEQ. ID. N°: 10, SEQ. ID. N°: 11, SEQ. ID. N°: 12, SEQ. ID. N°: 13, SEQ. ID. N°: 14, SEQ. ID. N°: 17, SEQ. ID. N°: 26, SEQ. ID. N°: 27, SEQ. ID. N°: 28, SEQ. ID. N°: 29, SEQ. ID. N°: 31, SEQ. ID. N°: 32, SEQ. ID. N°: 35, SEQ. ID. N°: 36, SEQ. ID. N°: 40, SEQ. ID. N°: 41, SEQ. ID. N°: 42, SEQ. ID. N°: 43, SEQ. ID. N°: 44, SEQ. ID. N°: 45, SEQ. ID. N°: 46, SEQ. ID. N°: 47, SEQ. ID. N°: 48, SEQ. ID. N°: 49, SEQ. ID. N°: 50, SEQ. ID. N°: 58, SEQ. ID. N°: 59, SEQ. ID. N°: 60 y SEQ. ID. N°: 58, y por los cebadores de minisequenciación,

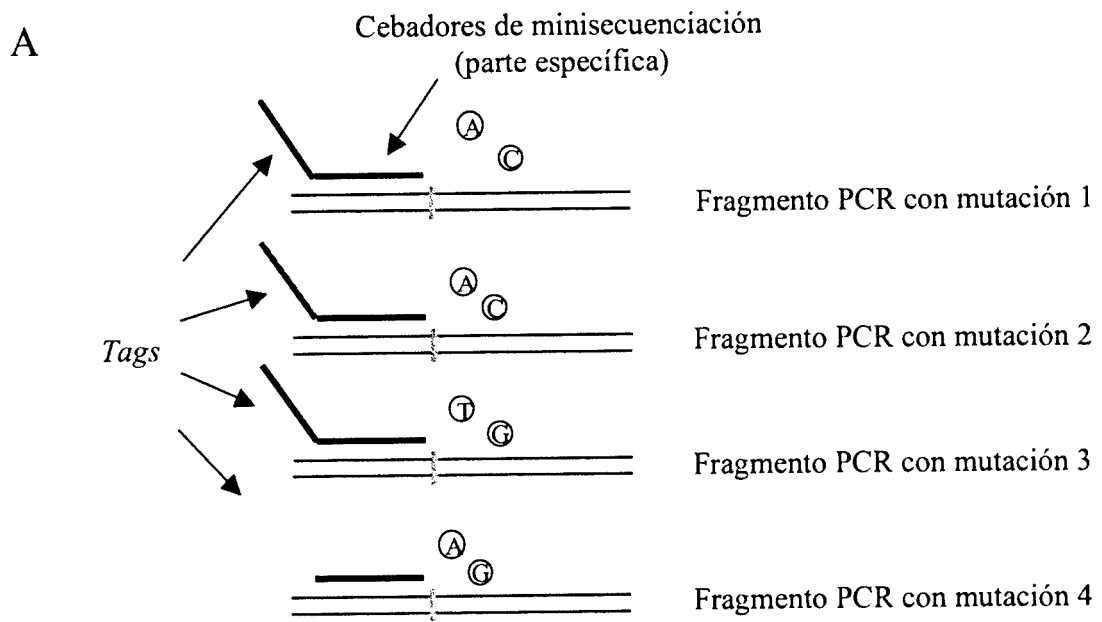
ES 2 308 868 A1

SEQ. ID. N°: 66, SEQ. ID. N°: 127, SEQ. ID. N°: 68, SEQ. ID. N°: 129, SEQ. ID. N°: 69, SEQ. ID. N°: 130, SEQ. ID. N°: 70, SEQ. ID. N°: 131, SEQ. ID. N°: 71, SEQ. ID. N°: 132, SEQ. ID. N°: 72, SEQ. ID. N°: 133, SEQ. ID. N°: 73, SEQ. ID. N°: 134, SEQ. ID. N°: 74, SEQ. ID. N°: 135, SEQ. ID. N°: 75, SEQ. ID. N°: 136, SEQ. ID. N°: 78, SEQ. ID. N°: 139, SEQ. ID. N°: 87, SEQ. ID. N°: 147, SEQ. ID. N°: 88, SEQ. ID. N°: 148, SEQ. ID. N°: 89, SEQ. ID. N°: 148, SEQ. ID. N°: 90, SEQ. ID. N°: 149, SEQ. ID. N°: 92, SEQ. ID. N°: 151, SEQ. ID. N°: 93, SEQ. ID. N°: 152, SEQ. ID. N°: 96, SEQ. ID. N°: 156, SEQ. ID. N°: 97, SEQ. ID. N°: 157, SEQ. ID. N°: 101, SEQ. ID. N°: 161, SEQ. ID. N°: 102, SEQ. ID. N°: 162, SEQ. ID. N°: 103, SEQ. ID. N°: 163, SEQ. ID. N°: 75, SEQ. ID. N°: 165, SEQ. ID. N°: 104, SEQ. ID. N°: 166, SEQ. ID. N°: 105, SEQ. ID. N°: 166, SEQ. ID. N°: 106, SEQ. ID. N°: 167, SEQ. ID. N°: 107, SEQ. ID. N°: 168, SEQ. ID. N°: 108, SEQ. ID. N°: 169, SEQ. ID. N°: 109, SEQ. ID. N°: 170, SEQ. ID. N°: 110, SEQ. ID. N°: 171, SEQ. ID. N°: 73, SEQ. ID. N°: 177, SEQ. ID. N°: 119, SEQ. ID. N°: 180, SEQ. ID. N°: 120, SEQ. ID. N°: 181, SEQ. ID. N°: 121, SEQ. ID. N°: 182, SEQ. ID. N°: 119, SEQ. ID. N°: 185.

3. Procedimiento de amplificación del ADN mitocondrial según reivindicación 1 **caracterizado** por el empleo de los cebadores de amplificación SEQ. ID N°: 188 a 193.

4. Aplicaciones del array de mutaciones, fabricado según las reivindicaciones anteriores, para análisis genético en casos de pacientes de neuropatía óptica de Leber, con patología probada o con sospecha clínica de patología, dentro del campo del diagnóstico molecular, así como para todos los estudios genético-poblacionales en los que estos marcadores sean de interés.

Figura 1.



B

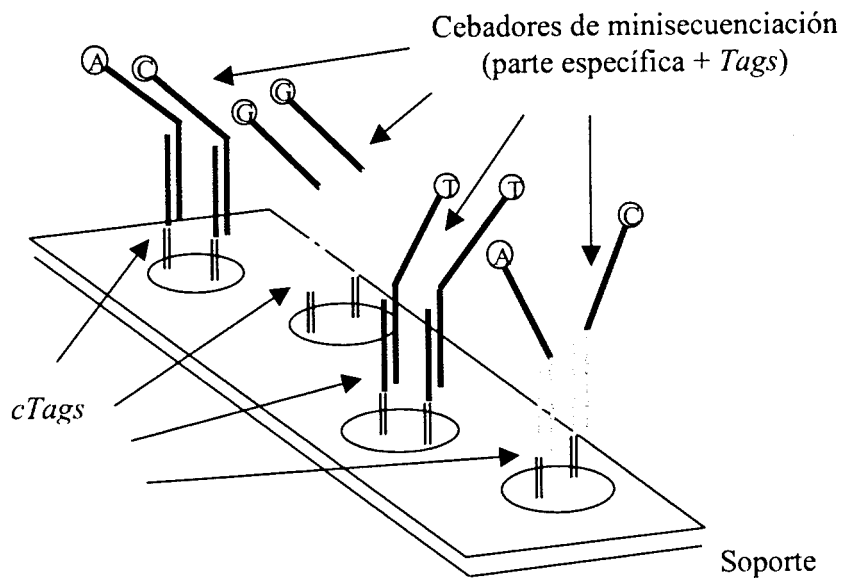


Figura 2.

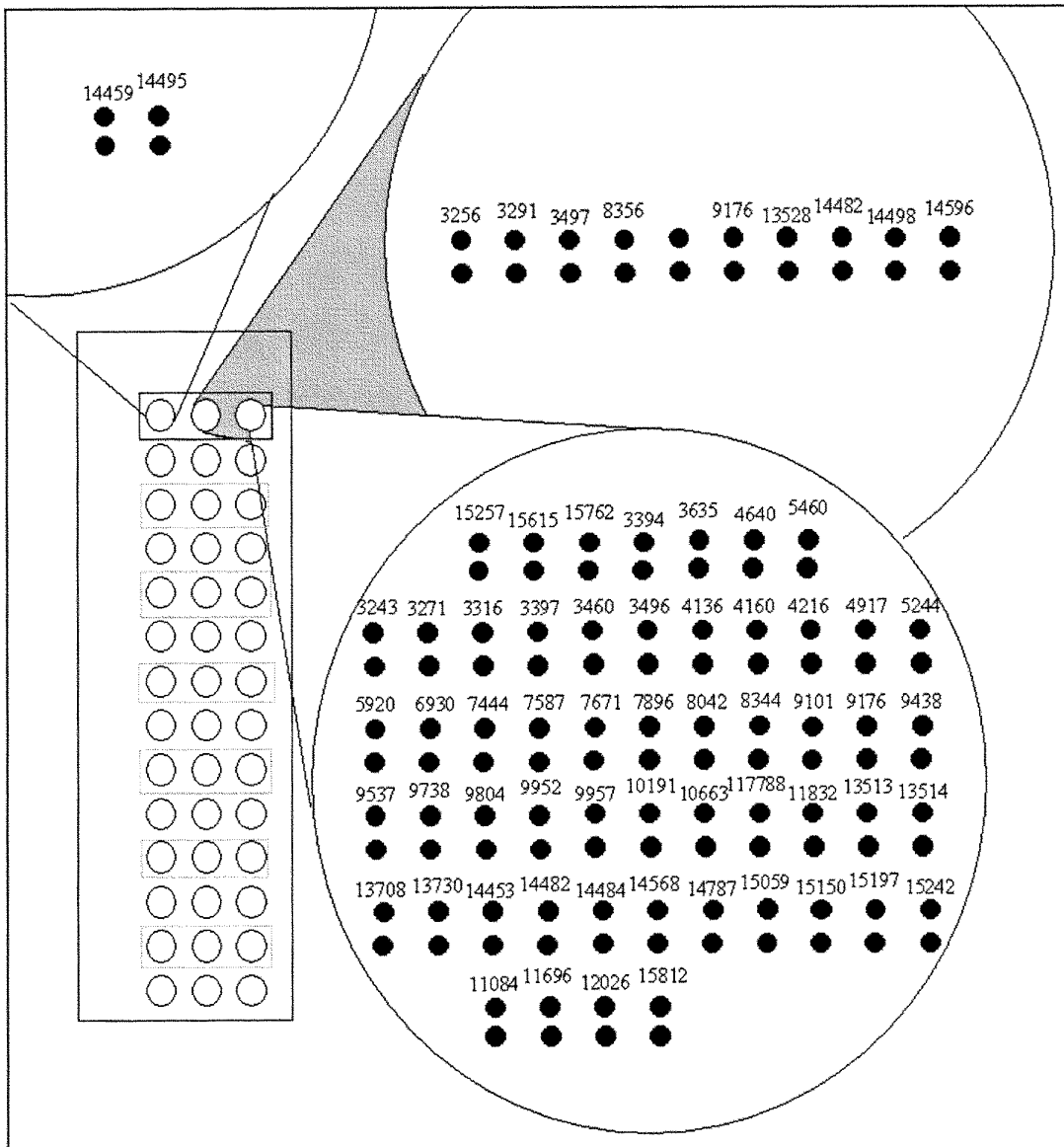
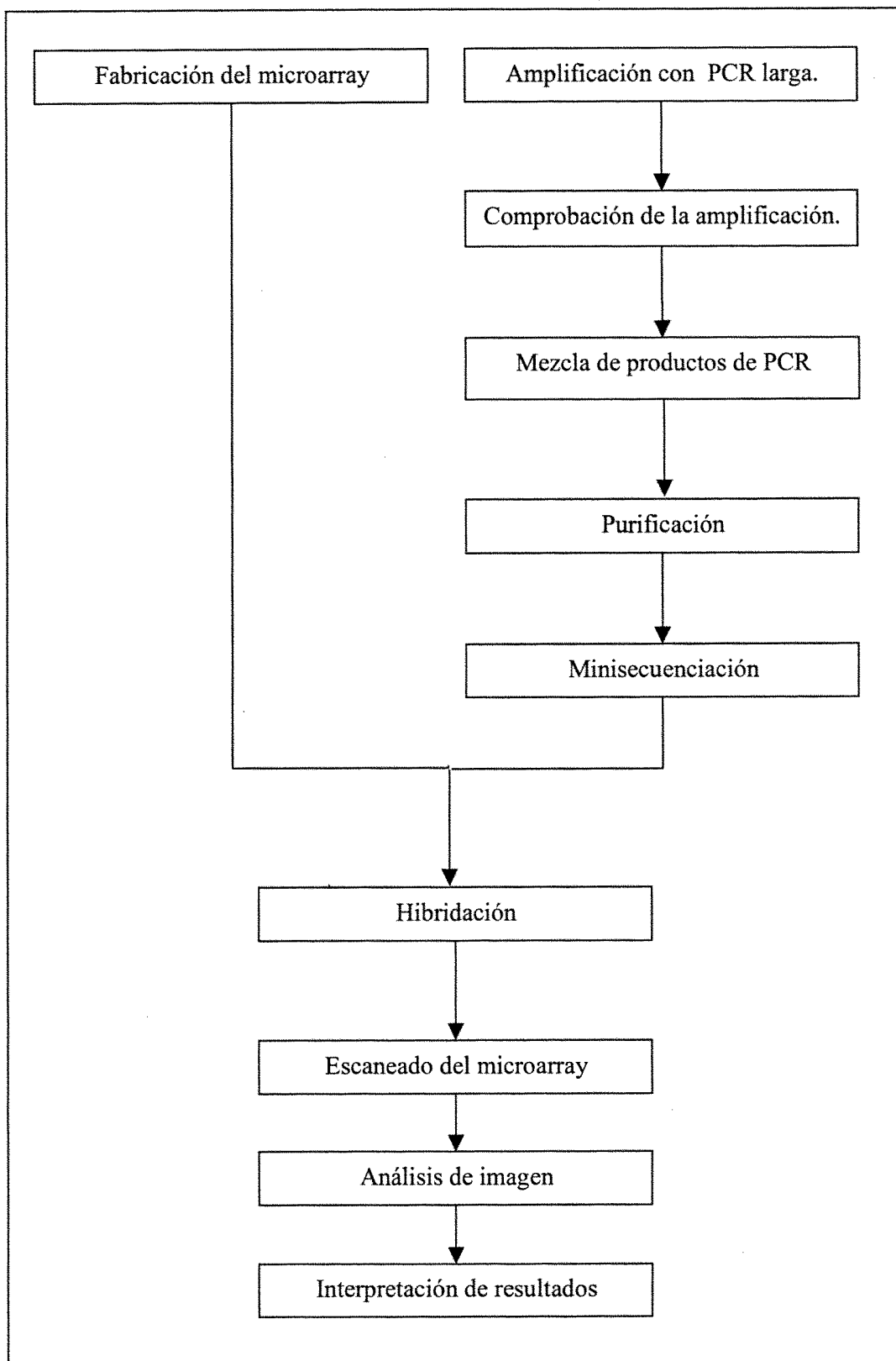


Figura 3.





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 308 868

② N° de solicitud: 200500966

③ Fecha de presentación de la solicitud: **13.04.2005**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12Q 1/68** (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	HIRSCHHORN, J N, et al. SBE-TAGS: an array-based method for efficient single-nucleotide polymorphism genotyping. Proc. Nat. Acad. Sci. 24-10-2000, vol. 97, número 22, páginas 12164-12169. Ver todo el documento.	1-4
X	FAN, J-B, et al. Paralell genotyping of human SNPs using generic high-density oligonucleotide tag arrays. Genome Res. 2000, vol. 10, páginas 853-860. Ver todo el documento, especialmente páginas 853,854,858 y figura 1.	1-4
A	US 5670320 A (WALLACE, D C, et al.) 23.09.1997, todo el documento.	1-4
A	US 5185244 A (WALLACE, D C) 09.02.1993, todo el documento.	1-4

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

03.11.2008

Examinador

B. Pérez Esteban

Página

1/1